

**ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:**

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

Редакция журнала  
«Патологическая физиология  
и экспериментальная терапия».  
Home page: [www.pfiet.ru](http://www.pfiet.ru)  
E-mail: [path.physiol@yandex.ru](mailto:path.physiol@yandex.ru)

**Зав. редакцией**  
Н.Р.Соболь  
+7 906 793 5467  
**Техническая редакция**  
А.С.Акопов

ЛР №010215 от 29.04.97.

Издатель: Иришкин Дмитрий  
E-mail: [genius-media@mail.ru](mailto:genius-media@mail.ru)

Входит в Перечень ведущих рецензируе-  
мых научных журналов и изданий,  
рекомендованных ВАК России для пуб-  
ликации значимых результатов диссертаци-  
он на соискание ученой степени докто-  
ра и кандидата наук.

**5-летний ИФ РИНЦ 2015 0,690**

**Журнал включен в базу данных Scopus**

Журнал «Патологическая физиология и  
экспериментальная терапия» индексиру-  
ется в следующих иностранных изданиях:  
*PubMed; medline; Excerpta Medica;*  
*Apicultural Abstracts; Biological Abstracts;*  
*Biotechnology Research Abstracts;*  
*Chemical Abstracts; Index to Dental Literature;*  
*International Aerospace Abstracts;*  
*Nutrition Abstracts and Reviews;*  
*Ulrich's International Periodicals Directory*

Подписной индекс по каталогу  
агентства «Роспечать»: **71456**

Сдано в набор 16.11.2018  
Подписано в печать 21.11.2018

**ISSN 0031-2991**  
Пат. физиол. и экспер. тер.  
2018. Том 62. № 4. 1—284

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

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2018.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

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

# ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

## Том 62, № 4, 2018

октябрь—декабрь

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

**Главный редактор Б.Б. Мороз**

Ю.В. Архипенко, Е.И. Асташкин, С.В. Грачев,  
Н.С. Гурко (ответственный секретарь), Т.А. Гуськова,  
И.С. Гушин (зам. главного редактора),  
Г. Дауни (США), А.В. Ефремов, В.Б. Кошелев,  
Н.А. Крупина, А.А. Кубатиев, П.Ф. Литвицкий,  
Р. Маллет (США), О. Мацуо (Япония),  
В.В. Новицкий, Г.В. Порядин,  
В.К. Решетняк (зам. главного редактора),  
Р. Сьюелл (Великобритания)

**Редационный совет**

Ю.В. Балякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),  
В.Т. Долгих (Омск), А.М. Дыгай (Томск),  
Д.А. Еникеев (Уфа), В.П. Куликов (Барнаул),  
В.П. Михайлов (Ярославль), В.Г. Овсянников (Ростов-на-Дону),  
С.Н. Орлов (Москва), Н.Н. Петрищев (Санкт-Петербург),  
Л.А. Северьянова (Курск), В. Шварц (Германия),  
А.П. Ястребов (Екатеринбург)

125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

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

ЛР №010215 от 29.04.97.

E-mail: genius-media@mail.ru

ИФ РИНЦ 2015 0,690

ISSN 0031-2991  
Pathological  
physiology  
and experimental  
therapy  
2018. Vol. 62. № 4. 1–284

Moscow

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2018.

THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

---

# PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

---

*Pathological physiology and experimental therapy*

*Quarterly reviewed science and practical journal  
Published since 1957*

Vol. 62, № 4, 2018

October—December

**Editor in chief** B.B. Moroz

**Assistant editors in chief:**

I.S. Gushchin, V.K. Reshetnyak

**Executive editor, scientific editor:** N.S. Gourko

**Members of editorial board:**

Yu.V. Archipenko, E.I. Astashkin, H. Downey (USA),  
S.V. Grachev, T.A. Guskova, A.V. Efremov,  
V.B. Koshelev, N.A. Krupina, A.A. Kubatiev,  
P.F. Litvitskiy, R. Mallet (USA), O. Matsuo (Japan),  
V.V. Novitskiy, G.V. Poryadin, R. Sewell (UK)

**Staff**

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

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н.** Диазепам нормализует тревожность у крыс на модели тревожно-депрессивного состояния, вызванного введением дипротина А в первую постнатальную неделю развития . . . . . 5
- Захарова Е.И., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Монаков М.Ю., Дудченко А.М.** Специфичность холинергических механизмов обучения и памяти у крыс с различным уровнем способностей к пространственному обстановочному обучению в водном лабиринте Морриса . . . . . 13
- Московцева А.А., Клементьева Т.С., Зайченко Д.М., Колесов Д.В., Соколовская А.А., Кубатиев А.А.** Проадаптивная и проапоптотическая активности стресс-активируемой рибонуклеазы IRE1: разделение на временной шкале клеточного стресса . . . . . 21
- Кожевникова Л.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Барчук В.В., Мирошкина И.А., Крыжановский С.А.** Оценка экспрессии генов рецепторных и регуляторных белков в миокарде крыс с хронической сердечной недостаточностью . . . . . 28
- Кирова Ю.И., Германова Э.Л.** Новые аспекты энерготропного действия мексидола . . . . . 36
- Максимова М.Ю., Булгакова П.О., Иванов А.В., Вирус Э.Д., Александрин В.В., Никифорова К.А., Охтова Ф.Р., Суанова Е.Т., Пирадов М.А., Кубатиев А.А.** Низкомолекулярные аминокислоты плазмы крови в остром периоде ишемического инсульта . . . . . 41
- Мензиков С.А.** Эффект фенола на ГАМК<sub>A</sub>-связанную Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазу мозга крыс в экспериментах *in vitro* и *in vivo* . . . . . 48
- Шагиахметов Ф.Ш., Анохин П.К., Шамакина И.Ю., Давыдова Т.В.** Сравнительный анализ экспрессии генов опиоидной системы в мозге крыс с различным уровнем предпочтения алкоголя . . . . . 53
- Бурденный А.М., Уткин Д.О., Филиппова Е.А., Логинов В.И., Пронина И.В., Фридман М.В., Казубская Т.П., Кушлинский Н.Е., Брага Э.А.** Гиперметилирование группы генов микроРНК в первичных опухолях и перитонеальных метастазах рака яичников . . . . . 58
- Салеева Д.В., Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Виноградов В.В., Бахтин А.А., Акопян К.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д.** Функционирование регуляторных РНК, влияющих на развитие опухолевых клеток, у больных раком гортани. . . . . 67
- Соколовская А.А., Вирус Э.Д., Максимова М.Ю., Московцев А.А., Иванов А.В., Кубатиев А.А.** Апоптоз и фенотип тромбоцитов у больных с острым ишемическим инсультом . . . . . 75
- Кузник Б.И., Давыдов С.О., Гусева Е.С., Смоляков Ю.Н., Степанов А.В., Цыбиков Н.Н.** Роль форменных элементов крови в формировании гемокоагуляционных сдвигов при гипертонической болезни . . . . . 84
- Лычева Н.А., Шахматов И.И., Макушкина Д.А., Седов А.В.** Состояние системы гемостаза у крыс при действии однократной иммерсионной гипотермии . . . . . 93
- Шабалин В.В., Шатохина С.Н., Кубатиев А.А., Шабалин В.Н.** Структурный отклик сыворотки крови человека на воздействие электромагнитных излучений низкой интенсивности . . . . . 98
- Корсаков И.Н., Еремин И.И., Петрикина А.П., Чаузова Т.С., Гринаковская О.С., Ясиновский М.И., Устинов К.Д., Паплина О.В., Сетдикова Г.Р., Пулин А.А.** Сравнительный анализ терапевтической эффективности стромальных клеток, выделенных из различных источников . . . . . 104
- Сабурина И.Н., Коселева Н.В., Зурина И.М., Горкун А.А., Пулин А.А., Еремин И.И., Зорин В.Л., Колпин П.Б.** Динамика изменения миогенного потенциала стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки рта в 2D и 3D культуре . . . . . 111
- Труш В.В., Соболев В.И., Попов М.Н.** Оценка эффективности аргинина в компенсации стероидной миопатии у белых крыс, индуцированной длительным введением дексаметазона . . . . . 120
- Кашутин С.Л., Вилова К.Г., Шагров Л.Л., Шерстеникова А.К., Неклюдова В.С., Теддер Е.И., Утугова В.Н.** Морфофункциональная характеристика моноцитов, мигрировавших в кожу . . . . . 130
- Каграманова Ж.А., Ланщачкова П.Е., Малиновская В.В., Свистунов А.А., Выжлова Е.Н.** Влияние факторов риска на патогенез анэмбрионии на раннем сроке беременности . . . . . 136
- Поворознык В.В., Григорьева Н.В., Гопкалова И.В.** Показатели минеральной плотности костной ткани у самок-крыс Wistar различного возраста в условиях экспериментального гипертиреоза . . . . . 150
- Коваленко А.А., Титова Г.П., Хугаева В.К.** Гистологическое исследование тонкой кишки крысы после хирургического устранения обтурационной тонкокишечной непроходимости и стимуляции лимфоток пептидом . . . . . 157
- Мышкин В.А., Еникеев Д.А., Габдрахманова И.Д., Еникеев О.А., Срубиллин Д.В., Гимадиева А.Р.** Церебро-гепатопротекторная активность комплексного соединения янтарной кислоты с 1.3.6-триметил-5-гидроксипурицином при экспериментальной интоксикации натрия нитритом . . . . . 163
- Ганина Е.Б., Червинец Ю.В., Грудинин Н.В., Шестакова В.Г., Червинец В.М., Миронов А.Ю.** Новый подход к лечению стоматита белых крыс (экспериментальное исследование) . . . . . 168
- Абрамян Ш.М., Рожнова Е.В., Волкова Е.Н., Блохин С.Н., Морозов С.Г.** Роль клеток иммунной системы ротовой полости в послеоперационных осложнениях при лифтинге лица . . . . . 174
- Эйзенх И.А., Швец В.И., Кубатиев А.А., Мозес В.Г., Ильинская Е.В., Солюянов М.Ю.** Терапия препаратом с направленной депо-доставкой эрозий уретры после установки субуретральной петли . . . . . 179

## CONTENTS

### ORIGINAL ARTICLES

- Krupina N.A., Khlebnikova N.N.** Diazepam normalizes anxiety in rats with experimental anxiety-depressive state induced by diprotin A in the first postnatal week
- Zakharova E.I., Storozheva Z.I., Proshin A.T., Monakov M.Yu., Dudchenko A.M.** The specificity of cholinergic mechanisms of learning and memory in rats with different levels of ability for spatial contextual learning in the Morris water maze
- Moskovtsev A.A., Klementyeva T.S., Zaychenko D.M., Kolesov D.V., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A.** Time-restricted IRE1 activity: impact on cell survival
- Kozhevnikova L.M., Tsorin I.B., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Barchukov V.V., Miroshkina I.A., Kryzhanovskii S.A.** The evaluation of expression of receptor and regulatory proteins genes in the myocardium of rats with chronic heart failure
- Kirova Yu.I., Germanova E.L.** New aspects of the energy-tropic action of mexidol
- Maksimova M.Y., Bulgakova P.O., Ivanov A.V., Virus E.D., Alexandrin V.V., Nikiforova K.A., Ochtova F.R., Suanova E.T., Piradov M.A., Kubatiev A.A.** Plasma low molecular weight aminoacids in patients with acute ischemic stroke
- Menzikov S.A.** Effect of penol on the GABA<sub>A</sub> receptor-coupled Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ATPase from rat brain in vitro/in vivo experiments
- Shagiakhmetov F.Sh., Anokhin P.K., Shamakina I.Yu., Davydova T.V.** Comparative quantitative analysis of the brain opiate gene expression in rats with high and low voluntary alcohol consumption
- Burdenny A.M., Utkin D.O., Filippova E.A., Loginov V.I., Pronina I.V., Fridman M.V., Kazubskaya T.P., Kuslinskii N.E., Braga E.A.** Hypermethylation of a group of microRNA genes in primary tumors and peritoneal metastases of ovarian cancer
- Saleeva D.V., Mikhailov V.F., Shulenina L.V., Bakhtin A.A., Vinogradov V.V., Akopian K.V., Neznanova M.V., Zasukhina G.D.** Activities of regulatory RNAs that affect development of tumor cells in patients with laryngeal cancer
- Sokolovskaya A.A., Maksimova M.Y., Virus E.D., Moskovtsev A.A., Ivanov A.V., Aleksandrin V.V., Kubatiev A.A.** Platelet apoptosis and phenotype from patients with acute ischemic stroke
- Kuznik B.I., Davydov S.O., Guseva E.C., Smolyakov Y.N., Stepanov A.V., Tsybikov N.N.** The role of blood corpuscles in forming hemocoagulative shifts in essential hypertension
- Lycheva N.A., Shahmatov I.I., Makushkina D.A., Sedov A.V.** The state of rat hemostasis system under the action of a single exposure to immersion hypothermia
- Shabalin V.V., Shatokhina S.N., Kubatiev A.A., Shabalin V.N.** Structural response of human blood serum to the influence of electromagnetic radiation of low intensity
- Korsakov I.N., Eremin I.I., Petrikina A.P., Chauzova T.S., Grinakovskaya O.S., Yasinovskiy M.I., Ustinov K.D., Paklina O.V., Setdikova G.R., Pulin A.A.** Comparative analysis of therapeutic efficacy of stromal cells derived from different sources
- Saburina I.N., Kosheleva N.V., Zurina I.M., Gorkun A.A., Pulin A.A., Eremin I.I., Zorin V.L., Kopnin P.B.** The dynamics in changes of myogenic potential of stromal cells from alveolar oral mucosa in 2D and 3D culture
- Trush V.V., Sobolev V.I., Popov M.N.** Arginine efficiency evaluation in compensation of the steroid myopathy induced by long dexamethasone administration at white rats
- Kashutin S.L., Vilova K.G., Shagrov L.L., Sherstennikova A.K., Neklyudova V.S., Tedder E.I., Utyugova V.N.** Morphofunctional characteristics of monocytes migration into the skin
- Kagramanova Zh.A., Lanshchakova P.E., Malinovskaya V.V., Svistunov A.A., Vzhlova E.N.** Risk factors impact on pathogenesis of empty sac in early pregnancy loss
- Povoroznyuk V.V., Grygorieva N.V., Gopkalova I.V.** Bone mineral density indices in Wistar female rats of different ages with experimental hyperthyroidism
- Kovalenko A.A., Titova G.P., Khugaeva V.K.** Histological examination of rat small intestine after surgical removal of obturation small bowel obstruction and peptide stimulation of lymph flow
- Myshkin V.A., Enikeev D.A., Gabdrakhmanova I.D., Enikeev O.A., Srubilin D.V., Gimadieva A.R.** Cerebro-hepatic protective activity of complex compound of succinic acid with 1.3.6-trimethyl-5-hydroxyuracil in experimental intoxication by sodium nitrate
- Ganina E.B., Chervinets Yu.V., Grudin N.V., Shestakova V.G., Chervinets V.M., Mironov A.Yu.** A new approach to treatment of stomatitis in experiments on white rats (experimental research)
- Abramian Sh.M., Rozhnova E.V., Volkova E.N., Blokhin S.N., Morozov S.G.** The role of the oral cavity immune cells in the postoperative complications after face lifting
- Eyzenakh I.A., Shvetz V.I., Kubatiev A.A., Mozes V.G., Il'inskaya E.V., Soluyanov M.Ju.** Therapy with directed depo-transportation drug the urethra's erosion after setting the suburethral mesh

## ОБЗОРЫ

- Бывальцев В.А., Степанов И.А., Тетюшкин Н.А., Шамеева М.А., Алиев М.А.* Роль цитокинов воспаления в формировании и разрыве артерио-венозных мальформаций головного мозга . . . . . 185
- Круглова М.П., Иванов А.В., Введенская О.Ю., Кубатиев А.А.* Гипергомостеинемия и хроническая болезнь почек . . . . . 195
- Пальцын А.А.* Кишечная микробиота . . . . . 202
- Кандалова О.В., Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Гречко А.В., Морозов С.Г.* Микробиом кожи при atopическом дерматите у взрослых . . . . . 209

## МЕТОДИКА

- Хугаева В.К., Ардасенов А.В.* Сравнительный анализ возможностей и недостатков методов биомикроскопии и лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) при исследовании микроциркуляторного русла кожи. . . . . 215
- Вирус Э.Д., Иванов А.В., Булгакова П.О., Кубатиев А.А.* О некоторых особенностях целевой протеомики, основанной на применении жидкостной tandemной хромато-масс-спектрометрии с регистрацией селективных переходов . . . . . 219
- Каба С.И., Соколовская А.А.* Детекция наночастиц серебра во внутриклеточном пространстве с помощью проточной цитометрии . . . . . 223
- Шойбонов Б.Б., Драпкина О.М., Елиашевич С.О., Лавренова Е.А., Федорович А.А., Сухинина Н.Ю., Толпыго С.М., Григорьева Д.В., Баронец В.Ю., Панченко Л.Ф., Кубатиев А.А.* Скрининг-тест для определения множественно-модифицированных липопротеинов низкой плотности — маркера субклинического атеросклероза . . . . . 227

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Алчинова И.Б., Полякова М.В., Яковенко Е.Н., Медведева Ю.С., Сабурин И.Н., Крганов М.Ю.* Введение внеклеточных везикул из клеток костного мозга способствует восстановлению физиологических параметров облученных мышей . . . . . 237
- Исмаилова А.М., Туховская Е.А., Лобанов А.В., Шайхутдинова Э.Р., Мурашев А.Н.* Исследование влияния предварительного перорального введения дипиридамола на мозговой кровоток и артериальное давление крыс SD в процессе глобальной ишемии головного мозга . . . . . 241
- Лобанов А.В., Давыдов Д.М., Перепеченова Н.А., Черкашина О.Л., Карпова Н.С., Захарова И.А., Морозов С.Г.* Влияние недостатка S100B в раннем онтогенезе на поведение взрослых животных в открытом поле . . . . . 246
- Кучеряну В.Г., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А.* Влияние антител к глутамату при интраназальном введении на экспериментальный паркинсонический синдром . . . . . 250
- Давыдова Т.В., Неvidимова Т.И., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Савочкина Д.Н., Бохан Н.А.* Нейробиологическая предрасположенность к аддиктивным расстройствам. Антитела к нейромедиаторам . . . . . 254
- Шакова Ф.М., Кирова Ю.И., Романова Г.А.* Влияние Семакса на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий мозга при экспериментальном двустороннем фотохимическом ишемическом повреждении префронтальной коры . . . . . 257
- Засеева А.М., Хугаева В.К.* Прижизненное изучение состояния микролимфоциркуляторного русла брыжейки тонкой кишки крысы в ответ на применение антибиотиков . . . . . 261
- Сабурин И.Н., Джуссоева Е.В., Горкун А.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Колокольцова Т.Д., Скуратовская Л.Н., Репин В.С.* 3D культура меланоцитов как тест-система и клеточная модель для изучения патологии меланогенеза . . . . . 265
- Егорова Е.М., Каба С.И.* Коррекция контроля токсичности стабилизатора в исследовании действия наночастиц серебра на клетки Jurkat . . . . . 269
- Шатохина С.Н., Уварова Д.С., Шабалин В.Н.* Новые представления о течении нефролитиаза . . . . . 273
- Крганов М.Ю., Панкова Н.Б., Карандашов В.И., Черепов А.Б.* Профилактическая фототерапия в синем диапазоне оптического излучения при подготовке к подводной деятельности . . . . . 277

## ИНФОРМАЦИЯ

- Кубышкин А.В., Литвицкий П.Ф., Чурилов Л.П., Пеханова О., Уразова О.И., Коваленко Е.П.* Молекулярные и генетические механизмы развития патологических процессов (о VIII Конгрессе Международного общества патофизиологов) . . . . . 280

## REVIEWS

- Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Tetyushkin N.A., Shameeva M.A., Aliyev M.A.* Role of inflammation cytokines in forming and rupture of brain arterio-venous malformations
- Kruglova M.P., Ivanov A.V., Vvedenskaya O.Yu., Kubatiev A.A.* Hyperhomocysteinemia and chronic kidney disease
- Paitsyn A.A.* Gut microbiota
- Kandalova O.V., Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Grechko A.V., Morozov S.G.* Skin microbiome in adult atopical dermatitis

## METHODS

- Khugaeva V.K., Ardasenov A.V.* Comparative analysis of opportunities and disadvantages of biomicroscopic method and laser Doppler flowmetry (LDF) in the study of the skin micro-circulatory body
- Virus E.D., Ivanov A.V., Bulgakova P.O., Kubatiev A.A.* Some features of targeted proteomics based on the use of HPLC-MS/MS with the registration of selective transitions
- Kaba S.I., Sokolovskaya A.A.* Detection of intracellular silver nanoparticles using flow cytometry
- Shoibonov B.B., Drapkina O.M., Eliashovich S.O., Lavrenova E.A., Fedofovich A.A., Suhinina N.Yu., Tolpygo S.M., Grigir'eva D.V., Baronets V.Yu., Panchenko L.F., Kubatiev A.A.* Screening test for determination of multiple-modified lipoproteins of low density — marker of subclinical atherosclerosis

## BRIEF REPORTS

- Alchinova I.B., Polyakova M.V., Yakovenko E.N., Medvedeva Yu.S., Saburina I.N., Karganov M.Yu.* Administration of extracellular vesicles from bone marrow cells promotes recovery of physiological parameters in irradiated mice
- Ismailova A.M., Tuchovskaya E.A., Lobanov A.V., Shaikhutdinova E.R., Murashev A.N.* Study of the effect of preliminary oral administration of dipyrindamole on cerebral blood flow and blood pressure of SD rats in the process of global cerebral ischemia
- Lobanov A.V., Davydov D.M., Perepechenova N.A., Cherkashina O.L., Karpova N.S., Zakharova I.A., Morozov S.G.* The effect of S100B deficit in early ontogenesis on behavior of adult animals in the open field test
- Kucheryanu V.G., Vetrile L.A., Zakharova I.A.* The effect of intranasal administration of glutamate antibody on experimental parkinsonian syndrome
- Davydova T.V., Nevidimova T.I., Vetrile L.A., Zakharova I.A., Savochkina D.N., Bokhan N.A.* Neurobiological predisposition to addictive disorders. Antibodies to neurotransmitters
- Shakova F.M., Kirova Y.I., Romanova G.A.* The influence of Semax on the activity of brain mitochondria succinate dehydrogenase in experimental bilateral photochemical ischemic damage to the prefrontal cortex
- Zaseeva A.M., Khugaeva V.K.* An *in vivo* study of the response to antibiotics of the rat small bowel mesenteric lymphatic microvasculature
- Saburina I.N., Dzhussoeva E.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Kolokolitsova T.D., Skuratovskaya L.N., Repin V.S.* 3D cell culture of melanocytes as a test-system and a cellular model for studying pathology of melanogenesis
- Egorova E.M., Kaba S.I.* Correction of the toxicity control for stabilizer in studies of the silver nanoparticle effect on Junkt cells
- Shatkhina S.N., Uvarova D.S., Shabalin V.N.* New ideas about the course of nephrolithiasis
- Karganov M.Yu., Pankova N.B., Karandashov V.I., Cherepov A.B.* Preventive phototherapy in the blue range of optical radiation in preparation for underwater activities

## INFORMATION

- Kubyshkin A.V., Litvitsky P.F., Churilov L.P., Pechanova O., Urazova O.I., Kovalenko E.P.* Molecular and genetic mechanisms of pathological processes development (VIII Congress of the International Society of Pathophysiology)

© Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н., 2018  
УДК 616-092.9

Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н.

## Диазепам нормализует тревожность у крыс на модели тревожно-депрессивного состояния, вызванного введением дипротина А в первую постнатальную неделю развития

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

В предыдущих исследованиях мы показали, что у крысят, подвергнутых на второй—третьей неделях постнатального развития действию ингибиторов дипептидилпептидазы IV (ДП-IV), в дальнейшем развивалось смешанное тревожно-депрессивное состояние, которое характеризовалось повышением уровня кортикостерона в сыворотке крови. Трициклический антидепрессант имипрамин купировал проявления депрессивноподобного поведения у таких крыс в тесте принудительного плавания. Данные свидетельствовали в пользу соответствия данных моделей основным критериям валидности — «внешней схожести», прогностическому и конструкционному критериям. Недавно в наших исследованиях была разработана новая модель смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцируемая действием ингибитора ДП-IV дипротина А в первую неделю постнатального развития крысят. **Цель** настоящего исследования — валидизация данной модели тревожно-депрессивного состояния. **Методы.** Крысам опытной группы вводили дипротин А (2 мг/кг, внутривенно), животным контрольной группы — физиологический раствор. У крыс подросткового возраста и взрослых животных оценивали двигательную активность (тест «Автоматизированное открытое поле»), уровень тревожности (тест «Приподнятый крестообразный лабиринт») и депрессивно-подобное поведение (тест принудительного плавания). Двухмесячным животным однократно вводили анксиолитик диазепам (1,25 мг/кг) с последующей оценкой уровня тревожности. Уровень кортикостерона в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. **Результаты.** Действие дипротина А индуцировало развитие депрессивноподобного поведения у крыс в возрасте 1 и 2 мес., и повышало уровень тревожности у двухмесячных крыс. Содержание кортикостерона в крови таких животных превышало контрольный уровень. Диазепам нормализовал уровень тревожности и привыкание в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют в пользу валидности новой модели смешанного тревожно-депрессивного состояния у крыс, создаваемой действием ингибитора ДП-IV дипротина А в первую неделю постнатального развития.

**Ключевые слова:** модель тревожно-депрессивного состояния; крысы; ингибитор дипептидилпептидазы-IV дипротин А; Приподнятый крестообразный лабиринт; постнатальные дни 1-7; диазепам; кортикостерон.

**Для цитирования:** Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н. Диазепам нормализует тревожность у крыс на модели тревожно-депрессивного состояния, вызванного введением дипротина А в первую постнатальную неделю развития. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 5—12.

DOI:

**Для корреспонденции:** Крупина Наталья Александровна, e-mail: krupina-na@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование поддержано грантом Российского Фонда Фундаментальных исследований № 15-04-08784.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность ведущему инженеру лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» В.М. Комкову за техническую поддержку исследования.

**Поступила** 10.10.2018

Krupina N.A., Khlebnikova N.N.

## Diazepam normalizes anxiety in rats with experimental anxiety-depressive state induced by diprotin A in the first postnatal week

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

Earlier we have shown that rat pups treated with dipeptidyl peptidase IV (DP-IV) inhibitors in the second to third postnatal weeks further developed a mixed anxiety-depressive state, which was characterized by increased blood

corticosterone. Imipramine, a tricyclic antidepressant, suppressed the depressive-like behavior in such rats in the forced swim test. This supported the consistency of these models with the main criteria of validity, «outward similarity» and predictive and construction criteria. Recently we have developed a new model of mixed anxiety-depressive state, induced by a DP-IV inhibitor, diprotin A, administered in the first postnatal week. The **aim** of this study was to validate this model of anxiety-depressive state. **Methods.** Diprotin A (2 mg/kg, i.p.) was administered to rats of the experimental group, and saline — to the control animals. Motor activity (automated open field test), anxiety (elevated plus-maze test), and depressive-like behavior (forced swim test) were evaluated in adolescent and adult rats. Two-month-old animals were injected with a single dose of the anxiolytic diazepam (1.25 mg/kg) followed by the anxiety tests. Serum corticosterone level was measured using enzyme immunoassay. **Results.** Diprotin A induced depressive-like behavior in rats aged one and two months and increased anxiety in two-month-old rats. In these animals, serum corticosterone concentration exceeded the control level. Diazepam normalized anxiety and habituation in the elevated plus-maze test. **Conclusion.** The study supported the validity of the new model of mixed anxiety-depressive state in rats induced by the DP-IV inhibitor, diprotin A, administered in the first postnatal week.

**Keywords:** model of an anxiety-depressive state; rats; inhibitor of dipeptidyl peptidase-IV diprotin A; elevated plus-maze; postnatal days 1-7; diazepam; corticosterone.

**For citation:** Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Diazepam normalizes anxiety in rats with experimental anxiety-depressive state induced by diprotin A in the first postnatal week. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 5—12. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Krupina Nataliya A., Krupina-na@yandex.ru

**Funding.** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 15-04-08784).

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

**Acknowledgments.** We thank Mr. V.M. Komkov, a lead engineer from the «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Moscow, Russia, for technical support of the research.

**Information about authors:**

Krupina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-2462-899X>

**Received** 10.10.2018

## Введение

В наших предыдущих исследованиях показано, что ингибиторы пролинспецифической пептидазы дипептидилпептидазы IV (ДП-IV, ЕС 3.4.14.5) с разным механизмом действия в условиях их введения на второй — третьей неделях постнатального развития приводят к развитию смешанного тревожно-депрессивного состояния у крыс подросткового возраста и взрослых животных [1, 2]. По характеру нарушений поведения экспериментальные тревожно-депрессивные состояния отвечали требованиям критерия «внешней схожести» (face validity) с клиническим прообразом.

На этих моделях трициклический антидепрессант имипрамин нормализовал поведение животных в тесте принудительного плавания и снижал повышенный уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс [3, 4]. Известно, что повышение уровня гормона надпочечников — кортизола у человека и кортикостерона у грызунов, — отражающее активацию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси (ГГА-оси), связано с развитием депрессивности [5, 6]. Для соответствия экспериментальной модели важному критерию валидности — конструкционному критерию (const-

ruct validity) — интерпретация выявляемых на модели нарушений должна быть схожей с интерпретацией тех же нарушений в клинике моделируемого расстройства; более того, выявленные нарушения должны быть связаны с заболеванием [7]. В наших экспериментах такая связь была показана. Эффективность используемого в клинике антидепрессанта имипрамина в подавлении признаков депрессивности у крыс на указанных моделях подтверждала их соответствие критерию прогностической валидности (predictive validity).

Однако до настоящего времени не была проведена валидизация еще одной новой модели смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного действием дипротина А в первую неделю постнатального развития [8].

*Цель настоящего исследования* заключалась в проверке воспроизведения результатов моделирования тревожно-депрессивного состояния у крыс, которым в первую неделю постнатального развития вводили ингибитор ДП-IV дипротин А, изучении эффектов диазепама на уровень тревожности и исследовании уровня кортикостерона в крови таких животных.

## Методика

Работа выполнена на 39 белых крысах-самцах Вистар (из питомника ФГБНУ НИИОПП). Животные, находившиеся в стандартных условиях вивария с естественной сменой светового цикла, имели свободный доступ к пище и воде. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, и Межгосударственными стандартами ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», соответствующими Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123, Страсбург, 18 марта 1986 г. с приложением от 15.06.2006). Исследования проводили под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП».

Каждой самке после родов оставляли по 5 детенышей мужского пола, взятых из трех-четырех пометов. День рождения считали нулевым постнатальным днем (ПНД). Непосредственно перед введением навеску ингибитора ДП-IV дипротина А (Н-Пе-Ро-Пе-ОН, MW 341.45, Sigma-Aldrich, USA) растворяли в физиологическом растворе (ФР). Дипротин А вводили крысам опытной группы ( $n = 18$ ) в дозе 2 мг/кг (0,1 мл на 10 г массы, внутривентриально, один раз в день) в течение первых семи постнатальных дней (ПНД 1-7). Животным контрольной группы ( $n = 21$ ) вводили ФР в ПНД 1-7. В возрасте около одного мес. крысят отделяли от самок и формировали экспериментальные группы. Таким образом, в состав каждой группы входили детеныши из трех-четырех пометов. Оценивали поведение крыс по достижении ими возраста одного и двух мес.

Оценку двигательной активности осуществляли в тесте «Автоматизированное открытое поле» («Opto-Varimex», Columbus Instruments, США) в условиях комнатной освещенности, в течение 10 мин. Пройденный путь определяли в см.

Тревожность оценивали в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) в течение 5 мин с помощью видеосистемы «VideoMot2» (TSE System, Германия). Конструкция ПКЛ и процедура тестирования подробно описаны в работе [8]. Поведение оценивали по следующим параметрам: предпочтение открытых рукавов (ОР) (о котором судили по отношению числа заходов в ОР к сумме заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта), общий пробег (см) и скорость перемещения (см/с) животного в лабиринте. Кроме того, определяли число свешиваний с ОР. О росте тревожности судят по снижению предпочтения ОР [9] и снижению числа свешиваний с ОР [10].

Проверку эффектов диазепама проводили у крыс в возрасте 2 мес. На этом сроке крыс подвергали тестированию в тесте ПКЛ в лабиринте дважды. По результатам первого тестирования формировали 4 подгруппы животных — две опытных и две контрольных. Эффекты диазепама проверяли во втором тестировании через 4 дня после первого. Животным двух подгрупп вводили диазепам: подгруппы «Дипротин А + диазепам» ( $n = 6$ ) и «ФР + диазепам» ( $n = 6$ ); животным двух остальных подгрупп вводили ФР: подгруппы «Дипротин А + ФР» ( $n = 6$ ) и «ФР + ФР» ( $n = 6$ ). Перед вторым тестированием у животных опытных подгрупп число свешиваний с ОР было статистически значимо меньше, а предпочтение ОР — в тенденции ниже, чем у животных контрольных подгрупп (рис. 2), что свидетельствовало о повышенном уровне тревожности у крыс, подвергнутых действию дипротина А в ПНД 1-7. Крысам опытных подгрупп вводили транквилизатор бензодиазепинового ряда диазепам (препарат «Реланиум», ампулы 10 мг/2 мл, «АО Варшавский фармацевтический завод Польша», Польша) в дозе 1,25 мг/кг (внутрибрюшинно, однократно, за 30 мин до тестирования. Крысам контрольных подгрупп вводили ФР в том же объеме.

Оценку депрессивноподобного поведения проводили в течение 10 мин в тесте *принудительного плавания*. Оценивали ритмологическую структуру плавания: число периодов активного плавания (энергичные движение четырьмя лапами с перемещением), общую длительность и число периодов иммобильности (периоды, когда крыса не совершает плавательных движений); рассчитывали индекс депрессивности (ИД) как отношение числа кратких периодов иммобильности (до 6 с) к числу периодов активного плавания, как описано в работе [8].

Крыс, не подвергавшихся действию диазепама, в возрасте 2,5 мес. декапитировали, отбирали пробы крови, которые использовали для получения сыворотки, и определяли абсолютную и относительную массу стресс-компетентных органов (отношение массы тимуса, селезенки и надпочечников к массе тела крысы перед декапитацией, в процентах). Образцы сыворотки хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до момента измерения в них уровня кортикостерона, который определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием диагностического набора EIA-4164 (DRG ELISA, США).

Статистическую обработку данных проводили по алгоритмам программы «STATISTICA For Windows 7.0». По результатам проверки гипотезы о нормальном характере распределения данных по тестам Колмогорова-Смирнова и Лиллиефорса для анализа результатов применяли либо параметрические (в слу-

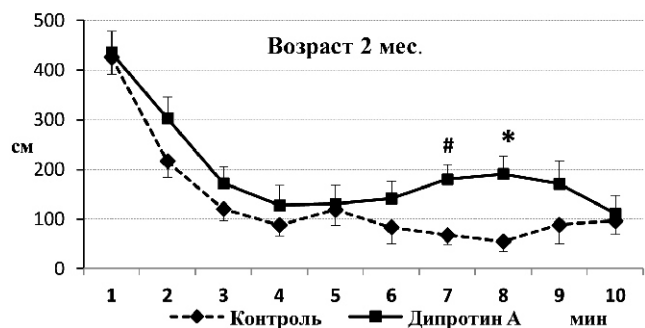
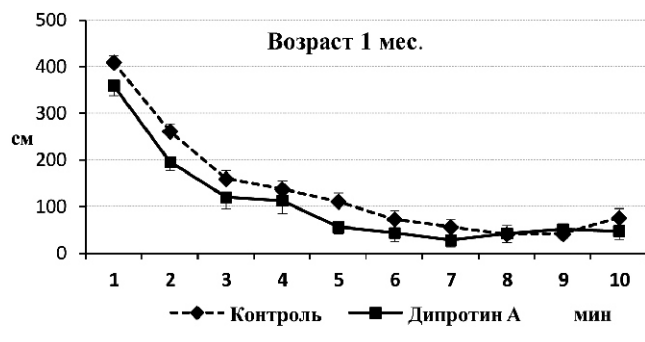


Рис. 1. Возрастная динамика двигательной активности крыс, подвергнутых действию дипротина А (2 мг/кг) в ПНД 1-7, и контрольных животных, которым вводили физиологический раствор, в тесте «Автоматизированное открытое поле». \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,09$  — по сравнению со значением в контрольной группе (по LSD-тесту после Two-Way ANOVA).

чае принятия гипотезы), либо непараметрические (в случае отклонения гипотезы) критерии. В работе использованы двухфакторный дисперсионный анализ Two-Way ANOVA с апостериорным сравнением средних дисперсионного комплекса по LSD-тесту, од-

нофакторный дисперсионный анализ One-Way ANOVA, непараметрический критерий Манна-Уитни для независимых переменных (в случае множественных сравнений — с корректировкой по методу FDR-контроля [11] с расчетом критического значения  $p$  ( $p_{критич}$ ), с которым сравнивали достигнутый уровень статистической значимости) и парный непараметрический критерий Вилкоксона (для внутригрупповых сравнений). Принятый уровень значимости составлял 5%. Данные представлены в виде  $M \pm S.E.M.$

### Результаты и обсуждение

По массе тела крысы опытной и контрольной групп в динамике наблюдения не различались: соответственно масса тела животных в возрасте 1 мес. составляла  $49,2 \pm 2,0$  г и  $51,5 \pm 2,4$  г, в возрасте 2 мес. —  $179,1 \pm 8,1$  г и  $181,1 \pm 12,8$  г.

У крыс в возрасте 1 мес. Two-Way ANOVA выявил влияние факторов «Группа» ( $F = 5,2890$ ,  $p = 0,027$ ) и «Минута измерения»: ( $F = 84,602$ ,  $p < 0,001$ ) на двигательную активность крыс в тесте «Автоматизированное открытое поле»; взаимодействие факторов не обнаружено ( $F = 1,163$ ,  $p > 0,05$ ). Привыкание по показателю снижения двигательной активности в динамике обследования в тесте у крыс обеих групп было выражено, но двигательная активность у крыс опытной группы на протяжении обследования была ниже, чем в контроле (рис. 1). По результатам One-Way ANOVA двигательная активность в сумме за 10 мин тестирования у крыс, подвергнутых неонатальному действию дипротина А, была ниже, чем у крыс контрольной груп-

Таблица 1

Показатели тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс, которым в первую неделю постнатального развития вводили ингибитор ДП-IV дипротин А или физиологический раствор (ФР)

Показатели	Группы	
	Дипротин А (n = 17)	ФР (n = 21)
Возраст 1 мес.		
Предпочтение ОР, %	$18,7 \pm 4,1$	$23,7 \pm 1,9$
Число свешиваний с ОР	$3,9 \pm 1,1$	$4,9 \pm 0,7$
Суммарный пробег, см	$1997,6 \pm 64,7 *$	$2189,9 \pm 83,8$
Средняя скорость, см/с	$6,7 \pm 0,2 *$	$7,3 \pm 0,3$
Возраст 2 мес.		
Предпочтение ОР, %	$14,7 \pm 3,26 \#$	$24,0 \pm 3,91$
Число свешиваний с ОР	$2,1 \pm 0,78 \#$	$6,2 \pm 1,32$
Суммарный пробег, см	$1869,0 \pm 122,75$	$1998,1 \pm 130,07$
Средняя скорость, см/с	$6,2 \pm 0,41$	$6,7 \pm 0,43$
Примечание. * $p \leq 0,05$ ; # $p < 0,07$ — по сравнению со значением в группе с введением ФР на том же сроке обследования (по U-критерию Манна-Уитни).		



пы ( $F(1,36) = 4.825$ ,  $\rho = 0.035$ ) и составила, соответственно:  $1059,9 \pm 117,1$  см и  $1364,9 \pm 81,5$  см.

В возрасте 2 мес. двигательную активность в тесте «Автоматизированное открытое поле» оценивали только у тех крыс, которым не вводили диазепам. Two-Way ANOVA выявил влияние факторов «Группа» ( $F = 9,307$ ,  $\rho = 0,006$ ) и «Минута измерения»: ( $F = 21,068$ ,  $\rho < 0,001$ ) на двигательную активность крыс в тесте «Автоматизированное открытое поле»; взаимодействие факторов не обнаружено ( $F = 0,933$ ,  $\rho > 0,05$ ). Привыкание было отмечено в обеих группах, однако у крыс опытной группы на завершающем этапе тестирования (минуты 7—9) двигательная активность в сравнении с контрольными значениями была выше (рис. 1). По результатам One-Way ANOVA двигательная активность в сумме за 10 мин тестирования у крыс опытной группы была выше, чем у крыс контрольной группы ( $F(1,23) = 9,307$ ,  $\rho = 0,006$ ) и составила соответственно  $1964,7 \pm 89,2$  см и  $1360,5 \pm 149,6$  см.

В возрасте 1 мес. у крыс, которым в течение первой недели постнатального развития вводили дипротин А, не было отличий от контрольных животных по показателям тревожности в ПКЛ, но у этих крыс по

сравнению с контролем был меньше пробег в ПКЛ при меньшей скорости (табл. 1).

Крысы опытной группы в возрасте 2 мес. не отличались от животных контрольной группы по величине пробега в ПКЛ и скорости перемещения, однако у них была выражена тенденция к снижению предпочтения ОР и числа свешиваний с ОР (табл. 1), что свидетельствовало о появлении признаков повышенной тревожности.

До введения диазепама/ФР в сформированных опытных подгруппах «Дипротин А + ФР» и «Дипротин А + диазепам» у крыс была выражена тенденция к снижению предпочтения ОР по сравнению с контрольными значениями (также как в целой группе), а число свешиваний с ОР было статистически значимо меньше, чем в соответствующих контрольных подгруппах «ФР + ФР» и «ФР + диазепам» (рис. 2). Суммарный пробег и скорость перемещения в ПКЛ у крыс опытных и контрольных подгрупп не различались (табл. 2), так же, как в целой группе.

После введения диазепама число свешиваний с ОР в подгруппе «Дипротин А + диазепам» не отличалось статистически значимо от числа свешиваний в подгруппе «ФР + диазепам», тогда как после вве-

Таблица 2

Влияние диазепама (1,25 мг/кг, острое введение) на двигательную активность в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у двухмесячных крыс, которым в первую неделю постнатального развития вводили дипротин А или ФР

Показатели	Группы			
	Дипротин А + ФР	ФР + ФР	Дипротин А + диазепам	ФР + диазепам
До введения диазепама/ФР				
Суммарный пробег, см	1655,7 ± 265,2	2213,5 ± 198,9	1996,2 ± 177,9	2450,4 ± 141,6
Средняя скорость, см/с	5,5 ± 0,9	7,4 ± 0,7	6,7 ± 0,6	8,2 ± 0,5
После введения диазепама/ФР				
Суммарный пробег, см	1498,4 ± 172,6	1707,5 ± 190,3#	1394,1 ± 216,1 #	2005,4 ± 160,9#
Средняя скорость, см/с	5,0 ± 0,6	5,7 ± 0,6 #	4,6 ± 0,7 #	6,7 ± 0,5 #

Примечание. Во всех группах n = 6; #p < 0,050 по сравнению со значением в той же группе крыс до начала введения диазепама/ФР (парный критерий Вилкоксона).

Таблица 3

Показатели поведения в тесте принудительного плавания у крыс, которым в первую неделю постнатального развития вводили ингибитор ДП-IV дипротин А или физиологический раствор (ФР)

Показатели	Группы			
	Дипротин А		ФР	
	1 мес.	2 мес.	1 мес.	2 мес.
Иммобильность, с	15,3 ± 3,4 *	20,8 ± 6,0 #	5,6 ± 1,7	7,5 ± 2,7
Число периодов иммобильности (до 6 с)	5,8 ± 1,1 *	6,9 ± 1,8 *	2,4 ± 0,7	2,4 ± 0,7
Число периодов активного плавания	7,9 ± 0,8	7,9 ± 0,7	8,3 ± 0,7	8,0 ± 0,8
Индекс депрессивности	0,8 ± 0,2 *	1,0 ± 0,2 *	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1

Примечание. \*p < 0,05; # p < 0,08 — по сравнению со значением в группе с введением ФР на том же сроке обследования (по U-критерию Манна-Уитни).

дения ФР в подгруппах «Дипротин А + ФР» и «ФР + ФР» сохранялось статистически значимое различие по этому показателю (рис. 2).

У животных опытной подгруппы после введения диазепама не наблюдали тенденции к снижению предпочтения ОР по сравнению с соответствующей контрольной подгруппой, тогда как у крыс из подгруппы «Дипротин А + ФР» такая тенденция сохранялась.

В подгруппе «ФР + диазепам» было отмечено увеличение предпочтения ОР (в тенденции). Результаты свидетельствовали об эффективности диазепама как анксиолитика и подтверждали повышенную тревожность у крыс, подвергнутых действию дипротина А в первую постнатальную неделю развития.

Суммарный пробег и скорость перемещения в ПКЛ во всех подгруппах, кроме подгруппы «Дипротин А + ФР», снижались (табл. 2).

У крыс, подвергнутых действию дипротина А в ПНД 1-7, в возрасте 1 и 2 мес. были выявлены признаки депрессивноподобного поведения в *тесте принудительного плавания*: увеличение длительности иммобильности и рост ИД (табл. 3).

Уровень кортикостерона в крови крыс, которым в ПНД 1-7 вводили дипротин А, составил  $161,4 \pm 5,8$  нг/мл, что было статистически значимо выше, чем у крыс, которым неонатально вводили ФР:  $63,4 \pm 17,3$  нг/мл ( $p = 0,021$ , One-Way ANOVA).

Обнаружена тенденция к уменьшению относительной массы надпочечников у крыс опытной группы по сравнению с контрольным значением: соответственно  $0,0159 \pm 0,0009$  и  $0,0185 \pm 0,0010$  ( $p = 0,060$ , U-критерий Манна-Уитни). Различий в абсолютной массе селезенки, тимуса и надпочечников, а также в относительной массе селезенки и тимуса не выявлено.

Сравнительный анализ нарушений эмоционально-мотивационной сферы, выявленных у крыс в двух сериях по моделированию нарушений поведения путем действия ингибитора ДГ-IV в ПНД 1-7 — предыдущей [8] и настоящей — позволяет говорить о принципиальном сходстве выявленных отклонений.

В возрасте 1 мес. у крысят в обеих сериях наблюдали снижение двигательной активности в тесте «Автоматизированное открытое поле», однако в возрасте 2 мес. в предыдущей серии была выявлена нормализация уровня двигательной активности, а в настоящей серии обнаружено превышение суммарного пробега над контрольным уровнем. Такое отличие может быть связано с тем, что в предыдущем исследовании тестирование длилось 3 мин, тогда как в настоящей работе — 10 мин. Увеличение времени тестирования позволило обнаружить различия в паттерне привыкания к условиям «открытого поля» у крыс опытной и контрольной групп: на завершающем этапе тестирования у крыс, подвергнутых неонатальному действию дипротина А, привыкание было менее выражено. Результаты предполагают нарушение неассоциативного обучения у подопытных животных.

В возрасте 1 мес. в обеих сериях животные опытной и контрольной групп не различались по уровню тревожности, тогда как в возрасте 2 мес. тревожность в обоих случаях была повышена. В возрасте 1 мес. в обеих сериях у крыс опытных групп были обнаружены признаки депрессивноподобного поведения в тесте принудительного плавания, которые сохранялись в возрасте 2 мес. только в настоящей серии.

В совокупности, данные двух экспериментальных серий свидетельствуют в пользу соответствия внешних проявлений эмоционально-мотивационных расстройств, возникающих у крыс, которым в ПНД 1-7

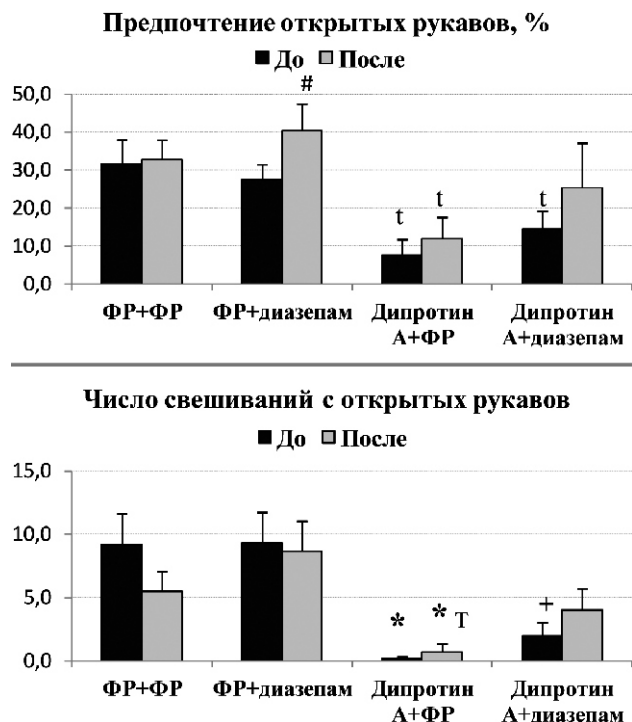


Рис. 2. Влияние диазепама на уровень тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс, подвергнутых действию дипротина А в ПНД 1-7 в сравнении с крысами контрольной группы, которым вводили ФР.

По непарному непараметрическому U-критерию Манна-Уитни (двустороннему) с поправкой FDR: \* $p \leq p_{критич}$  - статистически значимые отличия по сравнению со значением в группе «ФР + ФР» на том же этапе исследования; <sup>t</sup> $p \leq p_{критич}$  - статистически значимые отличия по сравнению со значением в группе «ФР + диазепам» на том же этапе исследования; <sup>T</sup> - тенденция по сравнению с группой «Дипротин А + диазепам» после введения препаратов ( $p_{критич} < p < 0,05$ ); <sup>t</sup> - тенденция по сравнению с соответствующей контрольной группой с введением ФР ( $p_{критич} < p < 0,065$ ).

По парному критерию Вилкоксона: <sup>#</sup> $p = 0,075$  по сравнению со значением в той же группе крыс до начала введения диазепама.

вводили дипротин А, критерию «внешней схожести» (face validity) с тревожно-депрессивным состоянием и позволяют рассматривать эти нарушения как модель такого состояния.

Как показано в настоящей работе, анксиолитик диазепам нормализовал уровень тревожности у крыс опытной группы, о чем судили по восстановлению сниженного предпочтения ОР и увеличению числа свешиваний с ОР в ПКЛ. Таким образом, новая модель тревожно-депрессивного состояния прошла первую проверку на соответствие критерию прогностической валидности (predictive validity).

Эффекты диазепама были выявлены в условиях двукратного тестирования в ПКЛ с интервалом в 4 дня: по результатам первого тестирования формировали группы, во втором тестировании непосредственно изучали влияние диазепама. В этом тестировании мы наблюдали снижение величины пробега и скорости перемещения в ПКЛ во всех подгруппах, кроме подгруппы «Дипротин А + ФР». Можно полагать, что незначительный интервал между повторным помещением крыс в ПКЛ привел к развитию привыкания к обстановке ПКЛ в контрольных подгруппах «ФР ± ФР» и «ФР ± диазепам», а также в опытной подгруппе с введением диазепама, у животных которой также было обнаружено снижение пробега и скорости в ПКЛ. По-видимому, диазепам нормализовал не только уровень тревожности, но и нарушенный процесс привыкания у крыс с тревожно-депрессивным состоянием.

Повышенный уровень кортикостерона в крови крыс с тревожно-депрессивным состоянием свидетельствует о гиперактивации ГГА-оси. Данные согласуются с представлениями о дисрегуляции ГГА-оси в клинике у особей, подвергнутых аверсивным воздействиям в ранний период жизни [12], что повышает у них риск развития депрессии. С учетом сказанного, можно считать, что получено свидетельство соответствия новой модели конструкционному критерию валидности модели.

Тревожно-депрессивное состояние возникает на разных моделях у крыс, подвергнутых действию ингибитора ДП-IV. К субстратам данной пептидазы относят некоторые провоспалительные цитокины [13], которые могут принимать участие в патогенезе депрессии, в том числе путем гиперактивации ГГА-оси за счет снижения эффективности обратной связи, опосредованной уменьшением чувствительности глюкокортикоидных рецепторов [14].

### Заключение

Результаты настоящего исследования принципиально воспроизводят полученные в предыдущем исследовании [8] данные о нарушении эмоционально-мотивационного поведения у крыс, подвергнутых

действию ингибитора ДП-IV дипротина А, что проявляется формированием у них тревожно-депрессивного состояния. Выявленные нарушения поведения можно рассматривать как новую модель тревожно-депрессивного состояния у крыс, которая хорошо воспроизводится. Модель соответствует основным критериям валидности — в полной мере, критерию «внешней схожести», и, по первым экспериментальным свидетельствам, — также прогностическому и конструкционному критериям.

### Литература (п.п. 2;5-7; 9-14 -см. References)

1. Крупина Н.А., Кушнарева Е.Ю., Хлебникова Н.Н., Золотов Н.Н., Крыжановский Г.Н. Поведенческие изменения у крыс, вызванные ингибитором дипептидилпептидазы IV метионил-2(S)-цианопирролидином: экспериментальная модель тревожно-депрессивного состояния. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 147(3): 254-60.
3. Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А., Кушнарева Е.Ю. Уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс при экспериментальном моделировании депрессивно-подобных состояний. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 4: 3-9.
4. Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Экспериментальное тревожно-депрессивное состояние у крыс, вызванное неонатальным действием ингибитора дипептидилпептидазы-IV дипротина А: эффекты имипрамина. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4):4-12. DOI: <https://doi.org/10.25557/IGPP.2017.4.8517>.
8. Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н., Орлова И.Н. Эмоционально-мотивационные расстройства у крыс как следствие действия дипротина А и ситаглиптина в первую неделю постнатального развития. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2016; 66(3): 367-81. DOI: 10.7868/S0044467716030059.

### References

1. Krupina N.A., Kushnareva E. Yu., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Behavioral changes in rats induced by a dipeptidyl peptidase iv inhibitor methionyl-2(s)-cyanopyrrolidine: Experimental model of anxiety-depression disorder. *Bulluten Experimentalnoy Biologii i Meditsiny*. 2009; 147(3): 285-90. DOI: 10.1007/s10517-009-0493-3.
2. Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Neonatal exposure to the dipeptidyl peptidase-iv inhibitors diprotin A and sitagliptin induces depression-like behavior, anxiety, and latent aggression in adolescent and adult rats. *J Behav Brain Sci*. 2016; 6(4): 167-83. Pub. Date: April 15, 2016. DOI: 10.4236/jbbs.2016.64018.
3. Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Kushnareva E.Y. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2013; 4: 3-9. (in Russian)
4. Khlebnikova N.N., Krupina N.A. Experimental anxiety-depressive state in rats caused by neonatal action of the inhibitor of dipeptidyl peptidase IV diprotin A: imipramine effects. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2017; 61(4): 3-9. DOI: <https://doi.org/10.25557/IGPP.2017.4.8517>. (in Russian)

5. Stetler C., Miller G.E. Depression and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activation: A Quantitative Summary of Four Decades of Research. *Psychosom. Med.* 2011; 73: 114-26. DOI: 10.1097/PSY.0b013e31820ad12b.
6. Nishi M., Horii-Hayashi N., Sasagawa T. *Front Neurosci.* 2014 Jun 17; 8:166. DOI: 10.3389/fnins.2014.00166.
7. Belzung C., Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord.* 2011; 1(1): 9. DOI: 10.1186/2045-5380-1-9.
8. Krupina N.A., Khlebnikova N.N., Orlova I.N. [Emotional Motivational Disorders in Rats as a Result of Diprotin A and Sitagliptin Administration in the First Postnatal Week]. *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatelnosti Im IP Pavlova.* 2016; 66(3): 367-81. DOI: 10.7868/S0044467716030059. (in Russian)
9. Walf A.A., Frye Ch.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols.* 2007; 2: 322-28. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.
10. O'Leary T.P., Gunn R.K. and Brown R.E. What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice? *Behavior Genetics.* 2013; 43: 34-50. <http://dx.doi.org/10.1007/s10519-012-9572-8>.
11. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B.* 1995. 57(1): 289-300.
12. Anacker C., O'Donnell K.J., Meaney M.J. Early life adversity and the epigenetic programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014; 16(3): 321-33.
13. Klemann C., Wagner L., Stephan M., von Horsten S. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clin Exp Immunol.* 2016; 185(1): 1-21. DOI: 10.1111/cei.12781.
14. Ogiodek E., Szota A., Just M., Mos D., Araszkie-wicz A. The role of the neuroendocrine and immune systems in the pathogenesis of depression. *Pharmacol. Rep.* 2014; 66(5): 776-81. DOI: 10.1016/j.pharep.2014.04.009.

### Сведения об авторах:

Крупина Наталья Александровна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИОПП

Хлебникова Надежда Николаевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИОПП

Захарова Е.И.<sup>1</sup>, Сторожева З.И.<sup>2</sup>, Прошин А.Т.<sup>3</sup>, Монаков М.Ю.<sup>1</sup>, Дудченко А.М.<sup>1</sup>

## Специфичность холинергических механизмов обучения и памяти у крыс с различным уровнем способностей к пространственному обстановочному обучению в водном лабиринте Морриса

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского», 119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8

**Цель** — исследование холинергической синаптической организации функций обучения и памяти у крыс с разными когнитивными способностями. **Методы.** Крыс обучали на пространственной обстановочной модели в водном лабиринте Морриса. Через 2—3 сут. после окончания тренировок животных декапитировали, из неокортекса и гиппокампа с помощью центрифугирования выделяли субфракции синаптических мембран и синаптоплазмы легких и тяжелых синапсом. В синаптических субфракциях определяли активность ключевого фермента холинергических нейронов холинацетилтрансферазы (ХАТ). Сравнивали результаты тестирования (время достижения скрытой платформы) и активность фермента у способных и неспособных к обучению крыс. **Результаты.** Были выявлены: 1) различия в холинергической организации исследованных функций в процессе обучения у способных и неспособных к обучению крыс, в том числе: положительные корреляции активности ХАТ в синапсах проекционных нейронов неокортекса у способных крыс со временем достижения платформы на промежуточных этапах обучения и в синапсах проекционных нейронов гиппокампа у неспособных крыс на позднем этапе обучения; разнонаправленные корреляции активности ХАТ в синапсах, предположительно, интернейронов гиппокампа (фракция тяжелых синапсом) у способных и неспособных крыс на начальном и позднем этапах обучения; 2) индивидуальность холинергической организации функций на всех этапах обучения. **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют в пользу представлений о специфике холинергической организации функций пространственного обстановочного обучения у крыс с выраженными и слабыми способностями к обучению, а также избирательной роли холинергических интернейронов гиппокампа на исходном этапе обучения и в консолидации памяти.

**Ключевые слова:** обучение, память, водный лабиринт Морриса, способные и неспособные к обучению, нижние и верхние кварталы, кора, гиппокамп, холинергическая проекционные нейроны, интернейроны, холинацетилтрансфераза, субфракции синаптических мембран, синаптоплазмы.

**Для цитирования:** Захарова Е.И., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Монаков М.Ю., Дудченко А.М. Специфичность холинергических механизмов обучения и памяти у крыс с различным уровнем способностей к пространственному обстановочному обучению в водном лабиринте Морриса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 13—20.

DOI:

**Для корреспонденции:** Захарова Елена Ивановна, zakharova-ei@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.10.2018

Zakharova E.I.<sup>1</sup>, Storozheva Z.I.<sup>2</sup>, Proshin A.T.<sup>3</sup>, Monakov M.Yu.<sup>1</sup>, Dudchenko A.M.<sup>1</sup>

## Specificity of cholinergic mechanisms of learning and memory in rats with different levels of ability for spatial contextual learning in the Morris water maze

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

<sup>2</sup> V.P Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Kropotkinsky Pereulok 23, Moscow 119034, Russia

<sup>3</sup> P.K. Anokhin' Institute of Normal Physiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

**Aim.** In order to expand the knowledge about neuronal organization of the cognitive functions required for understanding plastic processes in the brain, we investigated the cholinergic synaptic organization of learning and memory functions in rats with different cognitive abilities. **Methods.** Rats were trained on a contextual situation model in the Morris water maze. At 2—3 days after the end of training, animals were decapitated, and subfractions of synaptic membranes and synaptoplasm of light and heavy synaptosomes were isolated from the cortex and the hippocampus by centrifugation. In synaptic subfractions, activity of the key enzyme of cholinergic neurons, choline acetyltransferase, was measured. We compared the test results (latent period to reach the hidden platform) and the enzyme activity in capable (lower quartile) and incapable of learning rats (upper quartile). **Results.** The following was found: 1) differences in the cholinergic organization of studied functions in capable and incapable of learning rats during training, including: positive correlations of choline acetyltransferase activity in synapses of projection neurons in the cortex of capable rats with latency to reach the platform at intermediate stages of training and in the hippocampus of incapable rats at late stages of training; multidirectional correlations of choline acetyltransferase activity in synapses of hippocampal, presumably, interneurons (heavy synaptosomes) in capable and incapable rats at early and late stages of training; 2) distinctness of the cholinergic organization of functions at all stages of training. **Conclusions.** The study demonstrated for the first time a specificity of the cholinergic organization of functions in spatial situational learning of rats with strong and poor learning abilities and a selective role of hippocampal cholinergic interneurons at the initial stage of learning and in memory consolidation.

**Key words:** learning, memory, Morris water maze, capable and incapable to learning, lower and upper quartiles, cortex, hippocampus, cholinergic projection neurons, interneurons, choline acetyltransferase, subfraction of synaptic membranes, synaptoplasm.

**For citation:** Zakharova E.I., Storozheva Z.I., Proshin A.T., Monakov M.Yu., Dudchenko A.M. [The specificity of cholinergic mechanisms of learning and memory in rats with different levels of ability for spatial contextual learning in the Morris water maze]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 13—20 (in Russian).

DOI:

**For correspondence:** Zakharova Elena Ivanovna, zakharova-ei@yandex.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

**Received** 30.10.2018

## Введение

Актуальной проблемой в изучении механизмов когнитивных функций является их медиаторно- и структурно-специфическая нейрональная организация, синаптическая и рецепторная [1—3]. Знание нейрональной организации когнитивных функций, а также законов взаимодействия ключевых медиаторных систем, вовлеченных в функциональную сеть, открывают путь к пониманию их механизмов и управлению.

В механизмах обучения и памяти одной из ключевых нейромедиаторных систем является холинергическая (ХЭ), а высшими структурами мозга в когнитивных процессах — неокортекс и гиппокамп. Обе структуры мозга имеют два основных источника ХЭ влияний — проекции из подкорковых ядер переднего мозга и интернейроны [4—6]. ХЭ проекционные нейроны являются практически единственным объектом современных исследований ХЭ механизмов памяти. Интернейроны относятся к ассоциативным нейронам по своей морфологии, поэтому естественно, что предполагается их участие в когнитивных процессах. Об этом свидетельствуют многочисленные исследования, однако, в отношении интернейронов ХЭ природы данные единичные [5].

Нами было обосновано, что при изоляции пресинапсов неокортекса и гиппокампа во фракции синаптосом в легкую фракцию синаптосом попадают преимущественно пресинапсы проекционных ХЭ нейронов, а в тяжелую — ХЭ интернейронов [6].

Таким образом, специфика ХЭ организации неокортекса и гиппокампа и возможность разделения ХЭ пресинапсов с помощью фракционирования позволяют биохимическими методами оценивать ХЭ интернейроны параллельно с проекционными. Более того, дальнейшее фракционирование синаптосом извлекает синаптические элементы от глиальных и митохондриальных загрязнений [7], а исследование на субфракциях синаптических мембран (субСМ) и синаптоплазмы (субСП) позволяет выявлять морфофункциональные особенности входящих во фракции синаптосом популяций пресинапсов [6, 8].

В настоящей работе исследовали ХЭ корреляты обучения и консолидации долговременной памяти у интактных крыс (физиологическая норма). Показатели функций обучения сопоставляли с активностью маркера ХЭ нейронов холинацетилтрансферазы (ХАТ, ChAT, EC 2.3.1.6), которую определяли в субСМ и субСП (мХАТ и сХАТ соответственно) легких и тяжелых синаптосом неокортекса и гиппо-

кампа, изолированных из мозга способных и неспособных к пространственному обстановочному обучению в водном лабиринте Морриса крысы.

### Методика

Объектом исследования служили белые беспородные крысы-самцы весом 220—270 г. Все процедуры по уходу за животными и эксперименты проводились в соответствии с официальными положениями «Совета европейских сообществ об использовании лабораторных животных» (directive 86/609/ЕЕС) и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденные приказом Министерства здравоохранения № 708н от 23.08.2010 г. Исследование было одобрено Этическим комитетом ФГБНУ «НИИОПП».

Крыс обучали на пространственной обстановочной модели в водном лабиринте Морриса в течение 3-х дней (сессий, s), ежедневно предоставляя по 4 попытки для достижения скрытой под водой платформы. Время попытки было ограничено 1 мин. Регистрировали время достижения платформы (Т): в первый день обучения вторую попытку решения задачи (1s2) и суммарно остальные две попытки (1s3-4, рабочая память), на второй и третий дни — первые попытки решения задачи (соответственно 2s1 и 3s1, долговременная память) и остальные три попытки (2s2-4 и 3s2-4, продолжение обучения).

Методы обучения крыс и дальнейшего препарирования неокортекса и гиппокампа из мозга обученных крыс, изоляции фракций легких и тяжелых синапсом и из них субСМ и субСп, радиометрического определения активности ХАТ подробно описаны [7].

Для статистического анализа использовали программы Microsoft Excel. Статистическая обработка включала непараметрические методы: Точный метод Фишера или критерий U Вилкоксона—Манна—Уитни (при  $n > 20$ ), а также критерий  $r$  корреляционного метода Пирсона. Корреляционная зависимость считалась статистически значимой при  $\rho < 0,05$ . Также в исследовании был использован позитивный опыт статистического способа разделения всего массива протестированных животных на квартили — нижнюю (способные к обучению крысы), верхнюю (неспособные к обучению) и средние (промежуточные по способностям) [9]. Это позволило проанализировать сравнительную ХЭ организацию функций у крыс нижней и верхней квартилей, не пересекающихся по показателям способностей к обучению (рис. 1).

Разделение экспериментальных крыс на нижние и верхние квартили производилось для каждой регистрируемой функции обучения индивидуально, по показаниям Т. Крыс обучали в течение двух дней ( $n = 14$ )

или трех дней ( $n = 19$ ). На биохимический анализ были взяты 14 крыс после двух дней обучения и 11 крыс после трех дней обучения. Отметим, что на этапах обучения 2s1 и 2s2-4 в группы верхнего квартиля (способные крысы) вошли только особи, которых обучали в течение двух дней.

### Результаты

По времени решения задачи Т способные крысы показали классическую динамику снижения Т в процессе обучения, а на третий день тренировки одинаково успешные результаты как первой попытки (3s1), так и остальных трех (3s2-4): процент снижения по отношению к стартовому Т (1s2) составил 39 и 40% для 3s1 и 3s2-4 (соответственно  $T = 3,65 \pm 0,35$  с и  $3,78 \pm 0,27$  с против  $T = 9,36 \pm 1,50$  с) (рис. 1, нижний квартиль). У неспособных крыс Т 3s1 почти не отличалось от стартового (89%), а Т 3s2-4 показало снижение (43%), сходное по эффективности со снижением у способных животных (соответственно  $T = 51,87 \pm 5,11$  и  $25,00 \pm 6,75$  с против  $T = 58,50 \pm 1,40$  с) (рис. 1, верхний квартиль).

На рис. 2 представлены статистически значимые корреляции между значениями Т функций и активности ХАТ в субсинаптических фракциях неокортекса и гиппокампа в соответствующих группах способных и неспособных крыс.

У способных крыс активность ХАТ коррелировала со значениями Т (рис. 2, I):

- на исходном этапе обучения 1s2 ( $n = 7$ ) негативно в субСМ тяжелых синапсом неокортекса ( $r = -0,945$ ,  $\rho < 0,01$ ) и позитивно в субСп тяжелых синапсом гиппокампа ( $r = +0,853$ ,  $\rho < 0,05$ );
- на этапе 1s3-4 ( $n = 4$ ) позитивно в субСМ и субСп легких синапсом неокортекса ( $r = +0,996$ ,

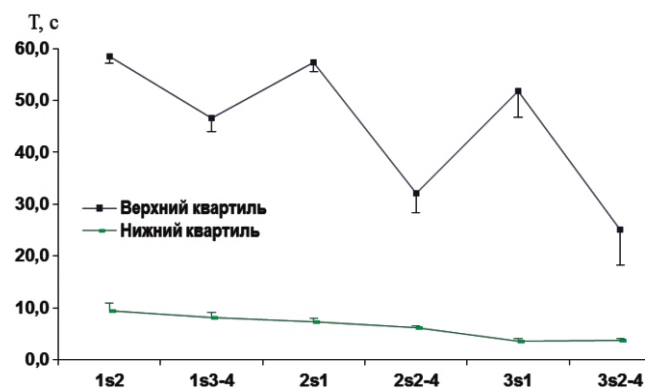


Рис. 1. Динамика пространственного обстановочного обучения в водном лабиринте Морриса у крыс с выраженными (нижний квартиль) и слабыми (верхний квартиль) способностями. Т (с), среднее по группе время достижения скрытой платформы ( $M \pm m$ ) на этапах первого (1s2, 1s3-4), второго (2s1, 2s2-4) и третьего (3s1, 3s2-4) дня тренировки.

$\rho < 0,01$  для обеих субфракций) и между собой ( $r = +1,000, \rho < 0,001$ );

- на этапе 2s1 ( $n = 4$ ) позитивно в субСп легких синапсом неокортекса и тяжелых гиппокампа (соответственно,  $r = +0,998$  и  $+0,983, \rho < 0,01$  и  $0,02$ );
- на этапе 2s2-4 ( $n = 4$ ) позитивно в субСМ и субСп легких синапсом, соответственно неокортекса и гиппокампа ( $r = +0,989$  и  $+0,955, \rho < 0,02$  и  $0,05$ );
- на этапе 3s1 ( $n = 4$ ) позитивно в субСп тяжелых синапсом гиппокампа ( $r = +0,997, \rho < 0,01$ );

На этапе 3s2-4 ( $n = 3$ ) статистически значимых корреляций Т-ХАТ выявлено не было.

У *неспособных* крыс (рис. 2,II) активность ХАТ коррелировала со значениями Т:

- на исходном этапе 1s2 ( $n = 8$ ) позитивно в субСп легких синапсом гиппокампа и негативно в субСп тяжелых синапсом гиппокампа (соответственно  $r = +0,957$  и  $-0,749, \rho < 0,001$  и  $0,05$ );

- на этапе 1s3-4 ( $n = 9$ ) позитивно в субСМ легких синапсом неокортекса и негативно в субСп легких синапсом гиппокампа (соответственно  $r = +0,767$  и  $-0,712, \rho < 0,02$  и  $0,05$ );
- на этапе 2s1 ( $n = 9$ ) позитивно в субСМ тяжелых синапсом неокортекса ( $r = +0,745, \rho < 0,05$ );
- на этапе 3s1 ( $n = 4$ ) позитивно в субСМ и субСп легких синапсом неокортекса ( $r = +0,999, \rho < 0,001$  для обеих субфракций) и активность мХАТ и сХАТ между собой ( $r = +1,000, \rho < 0,001$ );
- на этапе 3s2-4 ( $n = 4$ ) позитивно в субСп легких синапсом и негативно в субСп тяжелых синапсом гиппокампа (соответственно,  $r = +0,998$  и  $-0,999, \rho < 0,01$  и  $0,001$ ) и активность сХАТ в этих субфракциях проявила негативную корреляцию между собой ( $r = -0,979, \rho < 0,05$ ).

На этапе 2s2-4 ( $n = 8$ ) статистически значимых корреляций Т-ХАТ не наблюдалось.

В субфракциях, коррелирующих с исследованными функциями, выявлены следующие особенности активности ХАТ ( $M \pm m$ , нмоль АХ/Гткани/мин):

- в субСМ легких синапсом неокортекса на этапе обучения 1s3-4 у способных и неспособных крыс активность мХАТ не выделялась из общего массива (соответственно  $1,842 \pm 0,179$  —  $1,917 \pm 0,385$ , в общем массиве  $2,012 \pm 0,175, n = 30$ ), на этапе 2s2-4 в группу способных крыс вошли особи с относительно высокой активностью фермента ( $3,038 \pm 0,321$  против  $1,855 \pm 0,176, n = 26, \rho < 0,05$ ), на этапе 3s1 в группу неспособных крыс вошли, наоборот, особи с относительно низкой активностью фермента, втрое ниже таковой в группе способных животных на этапе 2s2-4 ( $1,023 \pm 0,237, \rho < 0,05$ );

- в субСп легких синапсом неокортекса на этапе обучения 1s3-4 у способных крыс активность сХАТ также не выделялась из общего массива ( $7,510 \pm 1,249$  против  $7,299 \pm 0,180, n = 27$ ), на этапе 2s1 в группу способных крыс вошли особи с активностью сХАТ в 1,5 раза выше, чем в оставшемся массиве животных ( $10,430 \pm 0,697$  против  $6,866 \pm 0,176, n = 26, \rho < 0,01$ ), а на этапе 3s1 в группу неспособных крыс вошли, наоборот, особи с активностью сХАТ, вдвое меньшей, чем в группе способных животных на этапе 2s1 ( $5,585 \pm 0,241, \rho < 0,025$ );

- в субСп легких синапсом гиппокампа активность сХАТ ни на одном этапе обучения не выделялась из общего массива ( $4,000 \pm 0,338, n = 31$ ).

- в субСп тяжелых синапсом гиппокампа у способных крыс активность сХАТ не выделялась из общего массива данных и не различалась между собой на этапах 1s2, 2s1 и 3s1 (соответственно  $0,308 \pm 0,042$  —  $0,261 \pm 0,071$  —  $0,398 \pm 0,040$ , в общем массиве  $0,320 \pm 0,020, n = 31$ ); в той же субфракции у неспособных крыс активность сХАТ была

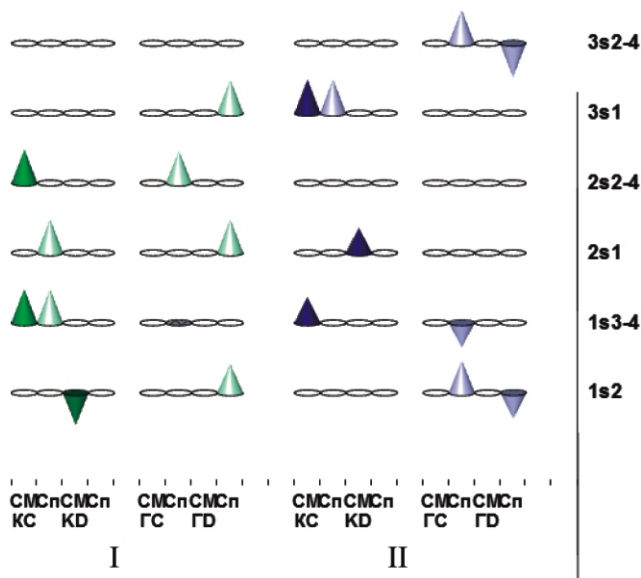


Рис. 2. Статистически значимые корреляции между значениями Т и активностью ХАТ на разных этапах пространственного обстановочного обучения у способных (I, пирамиды зеленых оттенков) и неспособных (II, пирамиды синих оттенков) к обучению крыс. Истинные знаки корреляций Т-ХАТ изменены на противоположные с целью соответствия знака корреляции физиологическому смыслу Т как индикатору успешности обучения. СМ, субфракция синаптических мембран; Сп, субфракция синаптоплазмы; КС и КD, легкие и тяжелые синапсомы неокортекса; ГС и ГD, легкие и тяжелые синапсомы синапсомы гиппокампа; вдоль вертикальной оси обозначены этапы обучения и расположены соответствующие им ряды корреляций Т-ХАТ. Способные к обучению крысы: темно-зеленые пирамиды, корреляции Т-мХАТ; светло-зеленые пирамиды, корреляции Т-сХАТ. Неспособные к обучению крысы: темно-синие пирамиды, корреляции Т-мХАТ; голубые пирамиды, корреляции Т-сХАТ. Пирамиды верхушкой вверх — положительные корреляции между значениями Т и активностью ХАТ; перевернутые пирамиды — отрицательные корреляции.



выше как в группе 1s2, так и 3s2-4, не различаясь между собой (соответственно  $0,401 \pm 0,053$  и  $0,478 \pm 0,074$  против  $0,292 \pm 0,020$  и  $0,297 \pm 0,023$ ,  $n = 23$  и  $27$ ,  $p < 0,05$ ), но в группе 1s2 была выше по сравнению со способными ( $p < 0,025$ ).

Состав входящих в кватили животных на разных этапах обучения, как правило, различался с частичным перекрытием или полным изменением входящих в группы особей на последующих этапах. Тем не менее, при сопоставлении значений Т между группами со сходной ХЭ организацией, состав групп совпадал у способных крыс на этапах обучения 2s1 и 2s2-4 ( $r = +0,995$ ,  $n = 4$ ,  $p < 0,01$ ), а у неспособных крыс — на этапах 1s3-4 и 3s1 ( $r = +0,987$ ,  $n = 4$ ,  $p < 0,02$ ).

### Обсуждение

По результатам тестирования, на третий день обучения у способных крыс средние значения Т на этапах 3s2-4 и 3s1 не различались. Такая стабилизация показателей означала завершение консолидации долговременной памяти. Напротив, у неспособных крыс данные тестирования свидетельствовали о фактическом отсутствии консолидации памяти в течение трех дней обучения — значения Т 3s1, как и 2s1, не отличались от Т 1s2.

В соответствии с результатами биохимического исследования, ХЭ организация функций обучения у способных и неспособных к обучению крыс различалась на всех этапах исследования. В целом, в процесс обучения на тех или иных этапах включены как проекционные, так и внутренние ХЭ нейроны как неокортекса, так и гиппокампа. Мы остановимся на некоторых из выявленных корреляций, на наш взгляд, ключевых.

При анализе мы учитывали известные факты, что фракции синапсом интактного мозга гетерогенны по морфо-структурным характеристикам. Поэтому корреляции с активностью ХАТ могут отражать связь функций с ХЭ синаптическими популяциями, различающимися в пределах фракции синапсом размерами пресинапса, а значит и объемом синаптоплазмы и представительством ее содержимого, а также протяженностью и мощностью активной зоны синапса, т.е. представительством мембраносвязанных компонентов. Известно также, что удельный вес тех или иных популяций во фракциях также неодинаков. В легких фракциях синапсом преобладают наиболее мелкие пресинапсы, а в тяжелых фракциях — наиболее крупные пресинапсы [6].

Судя по выявленным корреляциям, правомерно предположить, что у способных к обучению крыс на промежуточных этапах 1s3-4, 2s1 и 2s2-4 позитивная

связь ХЭ проекционных нейронов неокортекса с Т проявилась через разные популяции пресинапсов: на этапе 1s3-4 через мелкие пресинапсы, наиболее представленные в легкой фракции синапсом, в которых активность как сХАТ, так и мХАТ достаточна для выявления корреляции с Т в обеих субфракциях; на этапе 2s1 — через популяцию более крупных пресинапсов, с относительно более мощной сХАТ, но не мХАТ; на этапе 2s2-4 — через популяцию пресинапсов, тоже малочисленную в легкой фракции, но с более мощной мХАТ, но не сХАТ.

Однако этим данным может быть и другое объяснение. Если группы способных к обучению крыс первого (1s3-4) и второго дня (2s1, 2s2-4) составили совершенно разные особи, то в пределах второго дня обучения в группу 2s2-4 вошли три из четырех крыс группы 2s1 и величина активности мХАТ у этих крыс соответствовала активности сХАТ. Поэтому вероятно следующая динамика событий: к началу второго дня, через сутки после начала обучения, в синапсах популяции проекционных нейронов, вовлеченных в реализацию этапа 2s1, был увеличен синтез сХАТ (обучение сопровождается стимуляцией белкового синтеза [2, 3, 11—12]) и параллельно синтез или повышенная транслокация сХАТ в мХАТ, отражающие повышение эффективности квантовой передачи ХЭ сигнала, необходимой для выполнения задачи на этапе 2s2-4 (транслокация сХАТ в мХАТ и обратно —  $Zn^{2+}$ -зависимый процесс, тесно связанный с эффективностью квантовой секреции ацетилхолина [6, 8]). Другими словами, на этапах 2s1 и 2s2-4 активность ХАТ проявилась не только как маркер ХЭ пресинапсов, но и как функциональный показатель, повышенная эффективность которого необходима для успешного выполнения задач — сХАТ на этапе 2s1, мХАТ на этапе 2s2-4.

В тяжелой фракции синапсом гиппокампа способных крыс активность сХАТ превышает мХАТ в 10—20 раз [7]. Поэтому или по причине функциональной значимости корреляция проявилась только с сХАТ, позитивная с Т на этапах 1s2, 2s1 и 3s1. Несмотря на сходство в ХЭ организации, группы способных крыс на этих этапах почти не пересекались по составу. В том числе, в группу с успешной консолидацией памяти на этапе 3s1 вошла половина крыс (две из четырех) из группы неспособных на этапе 1s2.

У неспособных к обучению крыс на этапе 3s1 проявилась корреляция активности мХАТ и сХАТ с Т в пресинапсах проекционных нейронов неокортекса. Активность ХАТ у большинства крыс была самой низкой по массиву в обеих субфракциях и сопряженной между собой, что предполагает низкое представительство ХЭ проекционных синапсов в неокортексе

этих животных и соответственно низкую эффективность проекционных влияний.

Отметим, что аналогичная организация наблюдалась у способных животных на этапе 1s3-4, однако в группу вошли особи со средними по массиву, т.е. более высокими значениями активности мХАТ и сХАТ, чем у неспособных на этапе 3s1, что может отражать более высокое представительство ХЭ проекций в неокортексе. Можно предположить, что, по крайней мере, низкая эффективность ХЭ проекционных влияний в неокортексе может быть причиной сильного отставания в обучении.

ХЭ организация и уровень активности сХАТ в пресинапсах проекционных нейронов и интернейронов гиппокампа у неспособных крыс были идентичны на этапах 3s2-4 и 1s2. Проекционные нейроны позитивно коррелировали с Т на обоих этапах, в то время как интернейроны коррелировали с Т негативно и противоположно по направленности у способных крыс. Однако при сравнении указанных выше этапов представляется очень существенным появление новой связи на этапе 3s2-4 — отрицательной корреляции между активностью сХАТ в пресинапсах проекционных и интернейронов. Мощность фермента в проекционных пресинапсах на порядок превосходит таковую в пресинапсах интернейронов. И хотя эффективность всех нейрональных влияний на выполнение функций определяется комплексом факторов (архитектоникой синаптических связей, другими медиаторными системами и т.п.), все же правомерно предположить, что позитивное влияние ХЭ проекций и сопряженное с ним подавление негативных влияний ХЭ интернейронов на этапе 3s2-4 могло иметь существенное значение в более чем вдвое успешном выполнении задачи по сравнению с 1s2.

Полученная в исследовании разнонаправленность влияний ХЭ интернейронов гиппокампа на функции обучения у способных и неспособных крыс, особенно на третий день, косвенно согласуется с экспериментами на аналогичной поведенческой модели на крысах нижнего и верхнего квартилей по способностям к обучению [9]. В исследовании было получено, что ингибитор киназы гликогенсинтазы (glycogen synthase kinase-3, GSK-3), вовлеченной в механизмы нейрональной пластичности, влияя на процесс реконсолидации долговременной памяти разнонаправленно у крыс с разными способностями к обучению.

Таким образом, в исследовании выявлена принципиально различная ХЭ организация функций у крыс с выраженными и слабыми способностями к пространственному обстановочному обучению. По нашему предположению, способности к обучению (консолидации памяти) определяются врожденными, уже сформированными связями и в определенной степени,

по последним данным, жизненным опытом, накопленным к моменту обучения [2, 10, 13]. Характером существующих нейрональных связей и определяются способности к обучению, равно как и пути их реализации [7].

В нашем исследовании крыс нижней квартили правомерно считать эталоном оптимальной нейрональной, в том числе ХЭ, организации функций пространственных навыков. Из полученных данных следует, что ключевая и позитивная роль в этом процессе принадлежит на промежуточных этапах обучения ХЭ проекциям неокортекса, а на этапах исходном и консолидации памяти интернейронам гиппокампа.

Характеристика ХЭ проекций неокортекса и негативного влияния на функции интернейронов гиппокампа у неспособных крыс (верхняя квартиль) согласуются с существенным отставанием и, может быть, даже невозможностью консолидации пространственной памяти у этих животных.

Наши данные подтверждают важную роль ХЭ проекций неокортекса и гиппокампа в когнитивных процессах [5, 6], в том числе связь нейрональных механизмов пространственной рабочей памяти на этапе 1s3-4 с неокортексом [14, 15], а также конкретизируют значение ХЭ корковых проекций на других этапах в приобретении навыков к пространственной ориентации.

В то же время, функциональная роль ХЭ интернейронов гиппокампа не только практически не изучена, но и само их существование до сих пор дискутируется, в основном из-за методических затруднений их идентификации в силу их незначительного количества в структуре [16]. Тем не менее, исследования, утверждающие обратное, нам представляются более убедительными [4—6], а использование новейших технологий генной инженерии позволило получить первые свидетельства о причастности ХЭ интернейронов гиппокампа к механизмам памяти [5]. Авторами экспериментально обосновано, что ХЭ интернейроны в слое СА1 моносинаптически активируют глутаматергические пирамидные нейроны, вовлеченные в долговременную потенциацию (LTP), и что сами ХЭ интернейроны слоев СА1 и СА3 иннервируются ацетилхолином в отличие от ХЭ проекционных нейронов гиппокампа. Последнее обстоятельство согласуется с нашими данными по неспособным крысам и укрепляет наше убеждение, что в тяжелой фракции синапсом гиппокампа концентрируются пресинапсы ХЭ интернейронов, а также заключение, что ХЭ интернейроны гиппокампа могут иметь ключевое значение для консолидации памяти.

Поведенческой функции поиска платформы на этапе 1s2, исходной в пространственном обстановочном обучении, уделяют особое внимание [2, 17]. Ис-

следователи предполагают, что эта функция отражает реакцию мозга на новые стимулы (на новизну) и связывают ее с ЛТР гиппокампа [2, 17, 18]. Авторы аргументировали, что ЛТР имеет две фазы и ранняя из них, кратковременная фаза инициируется ответственными за новизну нейронами [2, 10]. Эти данные предполагают участие в выполнении задачи на этапе 1s2 популяций нейронов, специализированных на новизну. и соавторы особое внимание в этом плане уделяли дофаминергическим нейронам, предполагая, что они контролируют трансформацию ранней ЛТР в позднюю ЛТР [17]. Недавние эксперименты с оптогенетической стимуляцией подтвердили это предположение и идентифицировали, что связанные с ЛТР дофаминовые влияния гиппокампа получает от проекционных нейронов из голубого пятна (Locus coeruleus) [10, 11].

Результаты нашего исследования согласуются с представлениями о причастности гиппокампа к выполнению задачи на этапе 1s2 и свидетельствуют о вовлечении в этот процесс ХЭ интернейронов. В то же время наши данные об отсутствии преемственности между популяциями ХЭ нейронов, вовлеченных в обучение на ранних и более поздних его этапах, предполагают существование других, не ХЭ нейрональных ключевых путей консолидации памяти в пространственной модели обучения.

### Заключение

В проведенном исследовании получены первые свидетельства о специфике ХЭ организации функций пространственного обстановочного обучения у крыс с выраженными и слабыми способностями к обучению, а также об избирательной роли ХЭ интернейронов гиппокампа на исходном этапе обучения и в консолидации памяти. Сравнительное изучение животных с различными способностями к обучению позволило выявить ХЭ корреляты функций на отдельных этапах обучения, оптимальные для их успешного выполнения.

Задачей дальнейших исследований представляется поиск ключевых нейромедиаторных систем, обеспечивающих в совокупности с ХЭ системой единство функциональной сети и преемственность нейрональной организации функций в динамике обучения.

### Список литературы (пп.2; 4—18 см. References)

1. Анохин К.В. Мозг и память: биология следов прошлого. *Вестник Российской Академии Наук.* 2010; 80(5-6): 455-61.
3. Саидов Х.М., Анохин К.В. Новые подходы в когнитивной нейробиологии: методы молекулярной маркировки и визуализации *Ex Vivo* когнитивно активных нейронов. *Ж. ВНД.* 2017; 67(3): 259-72.

### References

1. Anokhin K.V. The brain and memory: The biology of traces of time past. *Herald of the Russian Academy of Sciences.* 2010; 80(3): 237-42. DOI: 10.1134/S101933161003007X
2. Fernandez G, Morris R.G.M. Memory, Novelty and Prior Knowledge. *Trends Neurosci.* 2018; 41(10):654-59. doi: 10.1016/j.tins.2018.08.006
3. Saidov Kh.M., Anokhin K.V. New Approaches in Cognitive Neurobiology: Methods of Molecular Marking and Ex Vivo Imaging of Cognitively Active Neurons. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2018; 48(7): 804-12. DOI 10.1007/s11055-018-0633-1
4. Varga C., Hartig W., Grosche J., Keijser J., Luiten P.G., Seeger J., Brauer K., Harkany T. Rabbit forebrain cholinergic system: morphological characterization of nuclei and distribution of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus. *J Comp Neurol.* 2003;460(4): 597-611. DOI:10.1002/cne.10673
5. Yi F., Catudio-Garrett E., Gabriel R., Wilhelm M., Erdelyi F., Szabo G., Deisseroth K., Lawrence J. Hippocampal «cholinergic interneurons» visualized with the choline acetyltransferase promoter: anatomical distribution, intrinsic membrane properties, neurochemical characteristics, and capacity for cholinergic modulation. *Front Synaptic Neurosci.* 2015; 7:4. doi:10.3389/fnsyn.2015.00004.
6. Zakharova E.I., Dudchenko A.M. *Synaptic soluble and membrane-bound choline acetyltransferase as a marker of cholinergic function in vitro and in vivo.* Chapter 5 In: *Neurochemistry, Heinbockel T, (ed.), Rijeka, Croatia: InTechOpen,* 2014, pp. 143-78. DOI: 10.5772/58307
7. Zakharova E.I., Storozheva Z.I., Dudchenko A.M., Kubatiev A.A. Chronic Cerebral Ischemia Forms New Mechanisms of Learning and Memory. *International Journal of Alzheimers Disease.* 2010; Article ID: 954589. DOI: org/10.4061/2010/954589
8. Zakharova E.I., Dudchenko A.M. Choline acetyltransferase and its role in regulation of an exchange and secretion of acetylcholine. *Patogenez.* 2012; 10(4): 29-35 (in Russian).
9. Storozheva Z.I., Gruden M.A., Proshin A.T., Sewell R.D.E. Learning ability is a key outcome determinant of GSK-3 inhibition on visuospatial memory in rats. *J Psychopharmacol.* 2015; 29(7): 822-35. doi: 10.1177/0269881115573805.
10. Takeuchi T., Duszkievicz A.J., Sonneborn A., Sponer P.A., Yamasaki M., Watanabe M., Smith C.C., Fernandez G., Deisseroth K., Greene R.W., Morris R.G.M. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature.* 2016; 537: 357-62. doi: 10.1038/nature19325
11. Yamasaki M., Takeuchi T. Locus Coeruleus and Dopamine-Dependent Memory Consolidation. *Neural Plast.* 2017; 2017:8602690. doi: 10.1155/2017/8602690.
12. Ivashkina O.I., Vorobyeva N.S., Gruzdeva M., Roschina M.A., Toropova K.A., Anokhin K.V. Cognitive Tagging of Neurons: CREMediated Genetic Labeling and Characterization of the Cells Involved in Learning and Memory. *Acta Naturae.* 2018; 10(2): 37-47.
13. McClelland J.L. Incorporating rapid neocortical learning of new schema-consistent information into complementary learning systems theory. *J Exp Psychol Gen.* 2013; 142(4): 1190-210. doi:10.1037/a0033812.
14. Feigenbaum J.D., Polkey C.E., Morris R.G. Deficits in spatial working memory after unilateral temporal lobectomy in man. *Neuropsychologia.* 1996; 34(3): 163-76.

15. Bahramisharif A., Jensen O., Jacobs J., Lisman J. Serial representation of items during working memory maintenance at letter-selective cortical sites. *PLoS Biol.* 2018; 16(8): e2003805. doi: 10.1371/journal.pbio.2003805.

16. Blusztajn J.K., Rinnofner J. Intrinsic Cholinergic Neurons in the Hippocampus: Fact or Artifact? *Front Synaptic Neurosci.* 2016; 10; 8:6. doi: 10.3389/fnsyn.2016.00006.

17. Morris R.G., Frey U. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997; 352(1360): 1489-503. DOI: 10.1098/rstb.1997.0136

18. Frey U., Morris R.G. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature.* 1997; 385(6616): 533-36. DOI:10.1038/385533a0

#### Сведения об авторах:

Захарова Елена Ивановна, канд. биол. наук, в.н.с. лаборатории общей патологии кардио-респираторных систем.

Сторожева Зинаида Ивановна, д-р биол. наук, в.н.с. лаборатории клинической нейрофизиологии.

Прошин Андрей Тимофеевич, канд. психол. наук, с.н.с. лаборатории общей физиологии функциональных систем.

Монаков Михаил Юрьевич, канд. мед. наук, с.н.с. лаборатории функциональной ангиопротеомики и метаболизма.

Дудченко Александр Максимович, д-р мед. наук, генеральный директор ООО «ИММАФАРМА» (на период планирования и выполнения исследования — г.н.с. лаборатории общей патологии кардио-респираторных систем).

Московцев А.А.<sup>1,2</sup>, Клементьева Т.С.<sup>1</sup>, Зайченко Д.М.<sup>1</sup>,  
Колесов Д.В.<sup>1</sup>, Соколовская А.А.<sup>1</sup>, Кубатиев А.А.<sup>1,2</sup>

## Проадаптивная и проапоптотическая активности стресс-активируемой рибонуклеазы IRE1: разделение на временной шкале клеточного стресса

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 125993, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

Нарушения фолдинга белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) являются причиной развития особой формы протеотоксического клеточного стресса — стресса ЭПР. При этом незрелые и неправильно свернутые белки накапливаются в просвете ЭПР и образуют цитотоксичные агрегаты. При стрессе ЭПР в клетке запускается неспецифический защитный механизм — система сигнальных каскадов ответа на белки с нарушенными конформациями (Unfolded Protein Response, UPR). Важным элементом UPR является сигнальный путь, опосредуемый трансмембранным белком ЭПР IRE1, эндорибонуклеазный домен которого при активации вырезает интрон в мРНК ХВР1, что приводит к синтезу транскрипционного фактора sXBP1, индуцирующего экспрессию целого ряда проадаптивных генов. Кроме цитопротекторной функции, IRE1 является ключевым регулятором ЭПР-стресс-индуцированной клеточной гибели. Предполагается, что при продолжительной активации IRE1 переключается с проадаптивной на проапоптотическую регуляцию. **Цель.** Исследование зависимости выживаемости клеток от длительности активности сигнального пути, опосредуемого рибонуклеазной активностью IRE1, при стрессе эндоплазматического ретикулума. **Методика.** С применением RT-qPCR, ингибирования эндорибонуклеазного домена IRE1 $\alpha$  соединением STF-083010 проведен анализ зависимости выживаемости клеток от периода активности IRE1 $\alpha$  при стрессе ЭПР различной интенсивности. **Результаты.** Установлено, IRE1 $\alpha$  оказывает преимущественно цитопротекторное действие при интенсивном стрессе — ингибирование соединением STF-083010 снижает жизнеспособность клеток. Характер зависимости выживаемости клеток от периода активности IRE1 $\alpha$  при стрессе ЭПР клеточноспецифичен: выживаемость несекретирующих T-лимфоцитов Jurkat была выше при ингибировании IRE1 $\alpha$  на ранних сроках интенсивного стресса, нежели на поздних; для секретирующих эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 наблюдалось обратное отношение.

**Ключевые слова:** клеточный стресс, стресс эндоплазматического ретикулума, Ire1, адаптация, апоптоз.

**Для цитирования:** Московцев А.А., Клементьева Т.С., Зайченко Д.М., Колесов Д.В., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Проадаптивная и проапоптотическая активности стресс-активируемой рибонуклеазы IRE1: разделение на временной шкале клеточного стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 21—27.

DOI:

**Для корреспонденции:** Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., лаб. регуляции агрегатного состояния крови, ФГБНУ НИИОПП, e-mail: bioinf@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, номер проекта 18-34-00950 мол\_а

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.10.2018

Moskovtsev A.A.<sup>1,2</sup>, Klementyeva T.S.<sup>1</sup>, Zaychenko D.M.<sup>1</sup>,  
Kolesov D.V.<sup>1</sup>, Sokolovskaya A.A.<sup>1</sup>, Kubatiev A.A.<sup>1,2</sup>

## Time-restricted IRE1 activity: impact on cell survival

<sup>1</sup> FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russia

<sup>2</sup> Russian Medical Academy of Postdoctoral Education, Moscow, Russia

Protein unfolding in the endoplasmic reticulum (ER) induces a particular form of proteotoxic cellular stress — ER stress: immature and incorrectly folded proteins can accumulate in the ER lumen and form cytotoxic aggregates. Under ER stress, the non-specific protective mechanism, Unfolded Protein Response (UPR), is activated. The key element of UPR is the signaling pathway mediated by transmembrane ER protein IRE1. The activated endoribonuclease domain IRE1 $\alpha$

causes non-canonic XBP1 mRNA splicing, which leads to the synthesis of an active transcription factor sXBP1. It induces the expression of proadaptive genes. In addition to its cytoprotective function, IRE1 is also a key regulator of ER stress-induced cell death. It is assumed that with prolonged activation, IRE1 switches from proadaptive to proapoptotic regulation. **Aim.** This paper is devoted to studying possible IRE1 $\alpha$  switching from proadaptive to proapoptotic regulation. Using the inhibition of the IRE1 $\alpha$  endoribonuclease domain by the compound STF-083010, we analyzed the dependence of cell survival on the period of IRE1 $\alpha$  activity under ER stress of varying intensity. We observed the cell specificity of this dependence: in non-secreting Jurkat cells, inhibition of IRE1 $\alpha$  in the early stages of intense stress was less toxic than in the later ones; in secreting EA.hy926 cells, an inverse relationship was observed. **Purpose of the study.** The study of the dependence of cell survival on the duration of the activity of the signaling pathway, mediated by the ribonuclease activity of IRE1, during endoplasmic reticulum stress. **Methods.** Using RT-qPCR, inhibition of the IRE1 $\alpha$  endoribonuclease domain by compound STF-083010, the dependence of cell survival on the period of IRE1 $\alpha$  activity during ER stress of various intensities was analyzed. **Results.** IRE1 $\alpha$  exerts a predominantly cytoprotective effect under intense stress — inhibition by the compound STF-083010 reduces cell viability. The character of the dependence of cell survival on the period of IRE1 $\alpha$  activity under ER stress is cell-specific: the survival of non-secretive T-lymphoblasts Jurkat was higher when IRE1 $\alpha$  was inhibited in the early stages of intense stress than in the latter; for secreting endotheliocyte-like cells EA.hy926, an inverse relationship was observed.

**Keywords:** cell stress, ER stress, Ire1, adaptation, apoptosis.

**For citation:** Moskovtsev A.A., Klementyeva T.S., Zaychenko D.M., Kolesov D.V., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A. Time-restricted IRE1 activity: impact on cell survival. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 21—27. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Aleksey A. Moskovtsev, PhD, Leading Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «General Pathology and Pathophysiology»; 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: bioinf@mail.ru

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

**Acknowledgments.** This work has been supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR grant № 18-34-00950 mol\_a)

**Information about authors:**

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

**Received** 11.10.2018

## Введение

В функционировании организма как многоклеточного ансамбля фундаментальную роль играют внеклеточные белки, проходящие при созревании через так называемый секреторный путь клетки и, в первую очередь, через эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Нарушения фолдинга белков в ЭПР могут стать причиной развития особой формы протеотоксического клеточного стресса — стресса ЭПР [1]: незрелые и неверно свернутые белки могут накапливаться в просвете ЭПР, образовывать цитотоксичные агрегаты и приобретать иммуногенность. Концентрация дефектных белков в люмене ЭПР может возрастать в условиях дефицита питательных веществ, гипоксии, при действии токсических и мутагенных веществ, а также по множеству других причин.

При стрессе ЭПР активируется неспецифический защитный механизм — система сигнальных каскадов ответа на белки с ненативными конформациями (Unfolded Protein Response, UPR) [2—4]. Ранним результатом активации UPR является запуск адаптивных процессов в клетке, таких, как синтез элементов сис-

темы фолдинга, рост деградации белков (ERAD), увеличение размеров ЭПР-компартамента, аутофагия и ряд других [5, 6]. Однако UPR может выступать и как индуктор клеточной гибели [7].

Важным элементом системы UPR является трансмембранный белок 1-го типа ЭПР IRE1 [8]. Наиболее широко представленная в клетках человека изоформа IRE1 $\alpha$  — мультидоменный белок, участвующий в нескольких внутриклеточных сигнальных системах. При стрессе ЭПР IRE1 $\alpha$  активируется, при этом происходит трансавтофосфорилирование киназного домена IRE1 $\alpha$ , что, в свою очередь, активирует РНКазный домен IRE1 $\alpha$  [9]. Эндорибонуклеазная активность IRE1 $\alpha$  проявляется как минимум по двум направлениям, однако перечень субстратов IRE1 $\alpha$  до конца не установлен. IRE1 $\alpha$  участвует в сплайсинге мРНК гена XBP1, который реализуется по неклассическому пути в цитоплазме, а, именно IRE1 $\alpha$  вырезает 26-нуклеотидный интрон [5]. Транслированный со сплайсированной мРНК XBP1 белок sXBP1 перемещается в ядро и активирует транскрипцию шаперонов ЭПР и генов, вовлеченных

в деградацию белка. Второй процесс, происходящий с участием рибонуклеазного домена IRE1 $\alpha$ , — IRE1 $\alpha$ -зависимая деградация мРНК, ассоциированных с ЭПР (RIDD) [10] — представляет собой XBP1-независимый посттранскрипционный механизм контроля ферментом IRE1 $\alpha$  экспрессии генов в стрессированных клетках.

Активация IRE1 $\alpha$  при стрессе ЭПР носит временный характер — даже в условиях сохранения стресс-индуцирующего стимула наблюдается снижение, аттенуация эндорибонуклеазной активности [7, 11]. Предполагается, что начальная активация IRE1 $\alpha$  прежде всего выполняет цитопротективную функцию [12]. Однако ряд данных указывает на то, что IRE1 $\alpha$  может также быть регулятором проапоптотических сигнальных каскадов [7]. В частности, цитозольный домен IRE1 $\alpha$  связывает адапторный белок TNFR-associated factor 2 (TRAF2), что активирует киназу Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) и ее мишень — киназу cJun-N terminal kinase (JNK) [13]. Активация JNK является важным проапоптотическим событием, которое, таким образом, оказывается связанным с активацией IRE1 $\alpha$  [14]. Однако по-прежнему недостаточно ясно, как реализуется двойственная (цитопротективная и проапоптотическая) функция эндорибонуклеазного домена IRE1 $\alpha$  при стрессе ЭПР.

Возможным путем решения указанной проблемы регуляторного дуализма IRE1 $\alpha$  и UPR в целом может быть рассмотрение эндорибонуклеазной активности IRE1 $\alpha$  в динамике. Цель исследования — проверка предположения, что продолжительность активности IRE1 $\alpha$  в клетках влияет на выживаемость клеток при стрессе ЭПР. Для этого нами был применен подход по снижению активности IRE1 $\alpha$  с помощью специфического ингибитора IRE1 $\alpha$  в определенных временных точках на фоне индукции стресса ЭПР в линиях клеток Jurkat и EA.hy926 — клеточных типах, различающихся по ядерно-цитоплазматическому отношению и степени развития секреторного пути.

## Методика

**Клеточные линии.** Исследования выполнены на линиях клеток Jurkat (Т-клеточный лимфобластоидный лейкоз человека) [15], полученных из Российской коллекции культур клеток позвоночных, и EA.hy926 (гибрид первичной культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC и тиогуанин-резистивного клона линии клеток аденокарциномы легкого A549). Клетки EA.hy926 были любезно предоставлены доктором Edgel C.J. (Университет Северной Каролины, США).

**Инкубация клеток с тапсигаргином, ингибирование IRE1 $\alpha$ .** Клетки Jurkat культивировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ТЭС) в атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub> при 37С, клетки EA.hy926 — в питательной среде DMEM (4,5г/л глюкозы) с добавлением 10% ТЭС, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л глутамина, 1% NEAA и добавки НАТ в атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub> при 37С. Для индукции стресса ЭПР использовался тапсигаргин (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), для ингибирования IRE1 $\alpha$  — IRE1 $\alpha$  inhibitor I, STF-083010 (Calbiochem-EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Германия). Тапсигаргин и соединение STF-083010 растворяли в ДМСО, концентрация стоковых растворов при этом подбирались так, чтобы конечная концентрация ДМСО не превышала 0,1%.

**Анализ экспрессии генов.** Количественная оценка изменения экспрессии мРНК проводилась методом полимеразной цепной реакции «в реальном времени» (RT-qPCR), с использованием набора реактивов Maxima SYBRGreen/ROX qPCR Master Mix («Fermentas», Литва), включающим интеркалирующий краситель SybrGreen, на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Тотальную РНК выделяли с использованием набора реагентов RNeasy® Mini Kit («Qiagen GmbH», Германия) с последующей обработкой ДНКазой I и оценкой качества. Реакцию синтеза первой цепи комплементарной ДНК проводили на суммарной РНК, нормализованной флуориметрически по количеству (Qubit, «Invitrogen», США), с использованием рендом-праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV (набор RevertAid HMinus First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва) в соответствии с протоколом производителя. Расчет уровня матричной РНК (мРНК) проводили с использованием алгоритма  $\Delta C_t$ , в основу которого положены относительные изменения пороговых циклов (C<sub>t</sub>) исследуемого и референсного гена в опытных и контрольных образцах.

**Определение цитотоксичности.** Цитотоксичность соединений и влияние на метаболическую активность определяли с помощью МТТ-теста. Для этого клетки инкубировали с веществами в различных концентрациях в 96-луночном планшете. После инкубации в каждую лунку вносили по 10 мкл раствора МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий). Раствор МТТ (2,5 мг/мл в PBS) стерилизовали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. После инкубации с МТТ в течение 4 ч при 37С в увлажненной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в лунки вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и вращали планшеты на орбитальном шейкере при комнатной

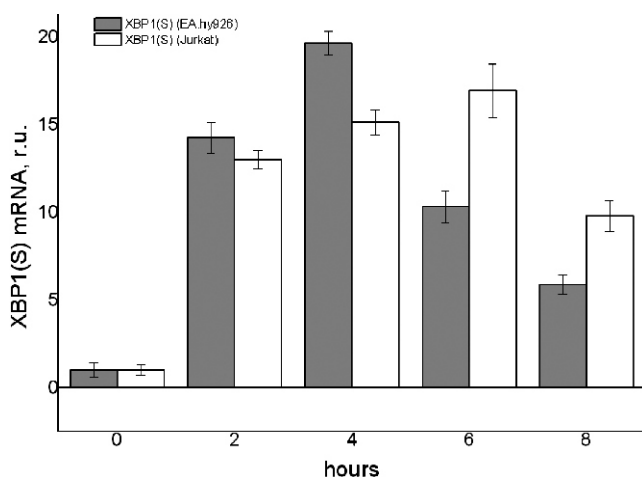
температуре в течение 20 мин, до полного растворения кристаллов формазана. Развитие окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм с помощью фотометра Hidex Chameleon (Hidex Oy, Финляндия).

**Статистическая обработка данных.** Для обработки результатов использовали критерий Манна—Уитни. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

**1. Динамика активности эндорибонуклеазы IRE1 $\alpha$  при стрессе ЭПР.** Нами методом RT-qPCR был проанализирован уровень сплайсинговой формы мРНК гена XBP1 при действии 10 нМ тапсигаргина в нескольких временных точках в клетках линий Jurkat и EA.hy926. Так как несплайсированная форма мРНК XBP1 — XBP1(U) — является субстратом для эндорибонуклеазы IRE1 $\alpha$ , временной профиль XBP1(S) дает представление о динамике активности IRE1 $\alpha$  в стрессированных клетках. Для анализа профиля нами была выбрана концентрация 10 нМ тапсигаргина, которая вызывает ~50% гибель клеток обеих линий при 24-часовом воздействии (IC<sub>45</sub><sup>24</sup> для EA.hy926 и IC<sub>50</sub><sup>24</sup> для Jurkat).

Как видно из приведенных диаграмм на рис. 1, активность IRE1 $\alpha$  достигает максимума в линии клеток EA.hy926 спустя 4 ч после начала инкубации с индуктором стресса. Развитие стресса ЭПР в клетках Jurkat характеризуется более поздним пиком активности IRE1 $\alpha$  (6 ч). Из графиков также видно, что амплитуда пика XBP1(S) для клеток линии EA.hy926 выше.



**Рис. 1.** Временные профили сплайсированной формы мРНК XBP1(S) в клетках EA.hy926 и Jurkat при действии 10нМ тапсигаргина — уровни экспрессии мРНК XBP1(S), измеренные методом RT-qPCR во временных точках 0, 2, 4, 6 и 8 ч после начала действия тапсигаргина. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SD в условных единицах (r.u.).

литуда пика XBP1(S) для клеток линии EA.hy926 выше. Таким образом, максимумы эндорибонуклеазной активности IRE1 $\alpha$ , направленной на сплайсинг XBP1, находятся во временном интервале 4—6 ч для клеток обоих типов.

**2. Выживаемость клеток линий EA.hy926 и Jurkat при стрессе ЭПР, индуцированном тапсигаргином, на фоне действия ингибитора I IRE1 $\alpha$ .** Для изменения продолжительности рибонуклеазной активности IRE1 $\alpha$  при стрессе ЭПР, нами был применен ее ингибитор I (STF-083010) в концентрации 60 мкМ во временных точках 2 ч, 4 ч, 6 ч от начала действия индуктора тапсигаргина. Таким образом, в использованной нами экспериментальной схеме ингибитор снижает активность IRE1 $\alpha$  на всем протяжении действия индуктора стресса (24 ч), за исключением периодов 2 ч, 4 ч или 6 ч от начала стресса. При этом контрольные клетки подвергались действию индуктора стресса ЭПР — тапсигаргина — в соответствующих концентрациях с добавлением в точках 2 ч, 4 ч, 6 ч растворителя — ДМСО. Ингибитор IRE1 $\alpha$  I (STF-083010) представляет собой низкомолекулярное соединение, которое способно проникать через клеточную мембрану нативной клетки и ковалентно связываться с активным центром эндорибонуклеазы IRE1 $\alpha$ , блокируя ее активность. Ранее нами было показано, что STF-083010 в концентрации 60 мкМ вызывает снижение уровня сплайсированной формы XBP1(S) мРНК до 50% и более от контрольного в клетках EA.hy926 и Jurkat при стрессе ЭПР, индуцируемом 2,5 мМ дитиотрейтолом.

**3. Как видно из контрольных экспериментов (клетки+индуктор ЭПР стресса, рис. 2), тапсигаргин приводит к росту клеточной гибели с близким для двух линий IC<sub>50</sub><sup>24</sup>, находящемся в диапазоне 1—10 нМ. Интересно отметить стимулирующее действие (гормезис-эффект) малой концентрации тапсигаргина (1 нМ) на клетки линии EA.hy926, при этом клетки Jurkat оказались нечувствительными к данной концентрации индуктора.**

При увеличении концентрации тапсигаргина выше 1 нМ действие STF-083010 приводит к более выраженной гибели клеток EA.hy926 по сравнению с контролем (только индуктор) (рис. 3, а). В условиях интенсивного стресса ЭПР (гибель клеток >50%), вызванного 100 нМ тапсигаргина, внесение ингибитора спустя 2 ч после начала стресса приводит к ожидаемо большему токсическому эффекту, нежели внесение в точке 6 ч. При этом, как следует из рис. 3, а — точка «0», собственная токсичность STF-083010 на временном интервале 18 ч (24 ч за исключением начального 6 ч периода), незначительна — более того, при 22-часовой инкубации



с STF-083010 без добавления тапсигаргина наблюдается стимулирующий эффект. Таким образом, при использовании данной экспериментальной схемы сокращение периода активности IRE1 $\alpha$  не приводит к росту жизнеспособности EA.hy926, т. е. при сильном стрессе IRE1 $\alpha$  демонстрирует на этой клеточной линии преимущественно цитопротекторную функцию.

Интересно, что на фоне действия индуктора стресса в минимальной использованной концентрации (1 нМ) на клетках EA.hy926 ингибирование IRE1 $\alpha$  приводило к обратному эффекту. А именно, была обнаружена обратная зависимость выживаемости клеток от времени добавления ингибитора: для точки 6 ч выживаемость клеток оказывалась статистически значимо ниже, а максимальная жизнеспособность соответствовала ранней временной точке добавления ингибитора (2 ч). Однако такое соотношение, по-видимому, обусловлено наложением стимулирующего действия ингибитора, которое проявляется и в отсутствие индуктора (точка «0»).

Хотя на линии Jurkat и были зарегистрированы похожие элементы ответов, например, стимулирование клеток соединением STF-083010 при отсутствии индуктора, в целом, соотношения между кривыми имели более сложный характер (рис. 3, б). В частности, во всех случаях сильного стресса наименее токсичным оказывалось раннее ингибирование IRE1 $\alpha$  на 2 ч. При слабом стрессе применение ингибитора IRE1 $\alpha$  повышает чувствительность клеток Jurkat к тапсигаргину.

Как было отмечено выше, эндорибонуклеазная активность IRE1 $\alpha$  обуславливает 2 процесса в клетках высших эукариот: сплайсинг XBP1 и процесс RIDD. Первый имеет отчетливую цитопротекторную функцию, повышая адаптивные свойства клетки. Процесс RIDD может приводить к деградации мРНК секретрируемых белков, что снижает нагрузку на ЭПР и также может иметь цитопротективный эффект. Однако в ходе RIDD могут быть расщеплены мРНК белков, необходимых для клеточного роста и выживания, что может иметь обратный эффект, т.е. способствовать клеточной гибели [16].

Рибонуклеазная активность IRE1 $\alpha$  является одной из основополагающих в эволюции UPR, и механизм RIDD может представлять собой эволюционно более древний способ поддержания гомеостаза ЭПР [17] по сравнению с IRE1 $\alpha$ -XBP1 путем — это предположение было сделано на основе того, что у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* присутствует исключительно RIDD-активность IRE1 $\alpha$  — в этих клетках не обнаружены HAC1/XBP1 ортологи и, таким образом, UPR не приводит к активации транскрипции [17].

Сравнительно недавно появились указания на то, что ряд прекурсоров микроРНК может быть дегра-

дирован эндорибонуклеазой IRE1 $\alpha$ , причем процессинг осуществляется по сайтам, отличным от сайтов действия рибонуклеазы III DICER. Было показано, что IRE1 $\alpha$ -опосредуемая супрессия микроРНК miR-17 приводит к увеличению экспрессии белка, взаимодействующего с тиоредоксином TXNIP, который, в свою очередь, вызывает активацию прокаспазы-1, что имеет проапоптотический эффект [18]. Кроме того, IRE1 $\alpha$  посредством расщепления предшественников ингибирует биогенез miR-17, miR-34a, miR-96, и miR-125b-данные микроРНК имеют сайты связывания в 3'-UTR каспазы-2, что увеличивает уровень каспазы-2 и способствует клеточной гибели [19]. Следует отметить, что нами ранее было обнаружено глобальное снижение уровня микроРНК в клетках Jurkat при стрессе ЭПР [20].

При стрессе ЭПР клетка решает противоположные задачи: с одной стороны, должна снижаться белоксинтезирующая и фолдинговая нагрузка на ЭПР, с другой стороны, необходимо активно транскриби-

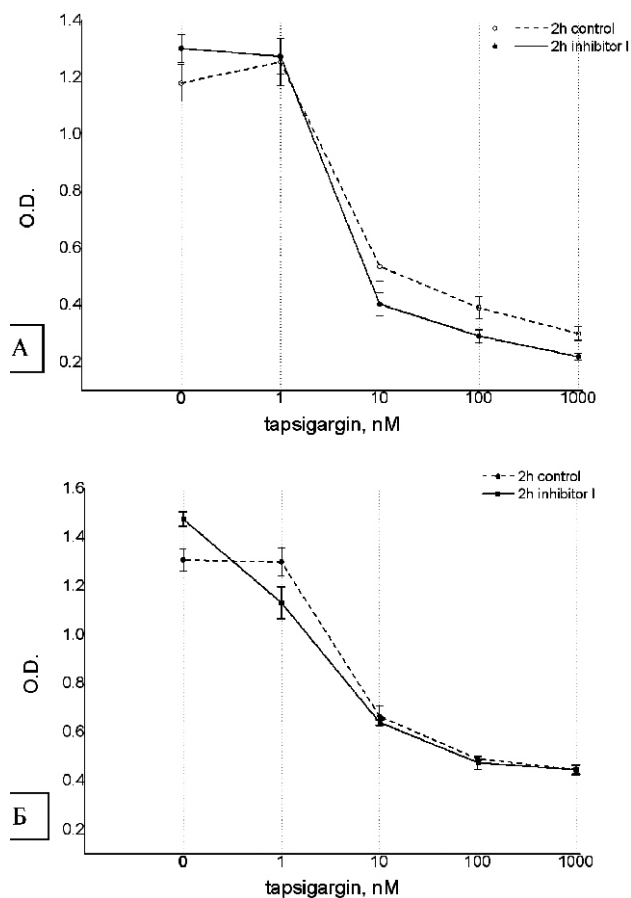


Рис. 2. Примеры кривых 24-часовой цитотоксичности тапсигаргина, тапсигаргина в комбинации с ингибитором I IRE1 $\alpha$  в концентрации 60 мкМ на линиях клеток EA.hy926 (А) и Jurkat (Б). На представленных примерах ингибитор I IRE1 $\alpha$  был добавлен спустя 2 ч после добавления тапсигаргина. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SD.

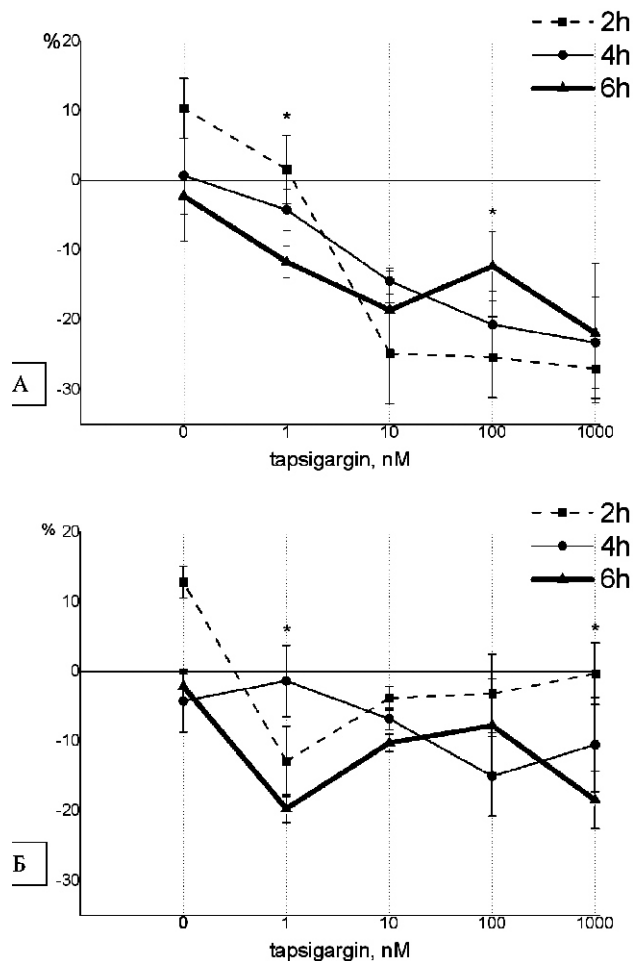


Рис. 3. Кривые, отражающие влияние ингибитора IRE1 $\alpha$  на жизнеспособность клеток EA.hy926 (А) и Jurkat (Б) при 24-часовом действии тапсигаргина в диапазоне концентраций 1–1000 нМ. Значения жизнеспособности клеток представлены в % и нормированы на контроль. Положительные значения означают увеличение жизнеспособности клеток в данной точке на указанную на графике величину, отрицательные — снижение. На каждой диаграмме представлены 3 кривые, отражающие изменение жизнеспособности клеток при внесении ингибитора IRE1 $\alpha$  спустя 2, 4 и 6 ч после начала стресса. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SD. \* —  $p$ -val < 0,05.

вать и синтезировать шапероны и прочие факторы, способствующие клеточной адаптации. Т.е., в какой-то степени оба эти адаптационные механизма являются взаимосключающими. Возможно, что регуляторный дуализм IRE1 $\alpha$  может реализовываться через механизм разделения ее функций во времени, а именно, через последовательное расщепление субстратов:

- высокоспецифичный сплайсинг ХВР1 с цитопротективным эффектом (краткосрочная активация IRE1 $\alpha$ );
- расщепление мРНК-субстратов RIDD с цитопротективным действием (краткосрочная активация IRE1 $\alpha$ );

- расщепление мРНК-субстратов RIDD с апоптоз-индуцирующим действием (продолжительная активация IRE1 $\alpha$ ).

Изученная нами зависимость выживания клеток от времени ингибирования IRE1 $\alpha$  указывает на особенности реализации опосредуемого IRE1 $\alpha$  стрессового сигнального пути в зависимости от клеточного типа. При интенсивном стрессе раннее снижение активности IRE1 $\alpha$  в клетках EA.hy926 оказывает наибольший цитотоксический эффект по сравнению с более поздним ингибированием, что указывает на преимущественно цитопротективную функцию IRE1 $\alpha$ . В клетках Jurkat мы видим обратное отношение — раннее снижение активности IRE1 $\alpha$  оказывается наименее токсичным. Клетки EA.hy926 являются адгезивными, имеют развитый ЭПР и синтезируют значительное количество белков на экспорт. В отличие от EA.hy926, для Т-лимфобластов Jurkat характерен суспензионный тип роста, их ядерно-цитоплазматическое отношение велико, ЭПР развит слабо, так как клетки не являются секреторными. Возможно, что дисфункция ЭПР может иметь меньшие последствия для клеток Jurkat при условии ограничения проапоптотических сигналов от IRE1 $\alpha$  — действительно, раннее (2ч) снижение активности IRE1 $\alpha$  почти не влияет на выживаемость клеток при интенсивном стрессе ЭПР. Более токсичным оказывается для этих клеток ингибирование на поздних стадиях стресса, на которых ярче проявляются проапоптотическая составляющая сигнальной активности IRE1 $\alpha$ . На кривые токсичности и их соотношение на фоне ингибирования IRE1 могут оказывать влияние сдвиги во времени максимумов активации IRE1 при различных концентрациях тапсигаргина.

Таким образом, в ходе исследования нами были обнаружены клеточно-специфические особенности характера зависимости выживаемости клеток от продолжительности активности IRE1 $\alpha$  при стрессе ЭПР.

### Литература (п.п. 1; 3—20 см. References)

2. Меситов М.В., Московцев А.А., Кубатиев А.А. Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулаума система: UPR (Unfolded Protein Response). 2013; 4: 97-108.

### References

1. Kozutsumi, Y.; Segal, M.; Normington, K.; Gettling, M.-J.; Sambrook, J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 1988, 332, 462.
2. Mesitov, M.; Moskovtsev, A.; Kubatiev, A. Molecular logic of the endoplasmic reticulum stress signal pathways: the system of unfolded protein response. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* 2013; 4: 97-108. (in Russian)

3. Ron, D.; Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007, 8, 519-29.
4. Gardner, B.M.; Pincus, D.; Gotthardt, K.; Gallagher, C.M.; Walter, P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013, 5, a013169.
5. Schroder, M.; Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 2005, 74, 739-89.
6. Walter, P.; Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011, 334, 1081-6.
7. Lin, J.H.; Li, H.; Yasumura, D.; Cohen, H.R.; Zhang, C.; Panning, B.; Shokat, K.M.; LaVail, M.M.; Walter, P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 2007, 318, 944-9.
8. Sidrauski, C.; Walter, P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 1997, 90, 1031-9.
9. Korennykh, A.; Walter, P. Structural basis of the unfolded protein response. *Annual review of cell and developmental biology* 2012, 28, 251-77.
10. Hollien, J.; Lin, J.H.; Li, H.; Stevens, N.; Walter, P.; Weissman, J.S. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 2009, 186, 323-31.
11. Li, H.; Korennykh, A.V.; Behrman, S.L.; Walter, P. Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, 107, 16113-8.
12. Sano, R.; Reed, J.C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2013, 1833, 3460-70.
13. Urano, F.; Wang, X.; Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Chung, P.; Harding, H.P.; Ron, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000, 287, 664-6.
14. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* 2012, 13, 89-102.
15. Schneider, U.; Schwenk, H.-U.; Bornkamm, G. Characterization of EBV-genome negative «null» and «T» cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International journal of cancer* 1977, 19, 621-6.
16. Maurel, M.; Chevet, E.; Tavernier, J.; Gerlo, S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in biochemical sciences* 2014, 39, 245-54.
17. Kimmig, P.; Diaz, M.; Zheng, J.; Williams, C.C.; Lang, A.; Aragyn, T.; Li, H.; Walter, P. The unfolded protein response in fission yeast modulates stability of select mRNAs to maintain protein homeostasis. *Elife* 2012, 1.
18. Lerner, A.G.; Upton, J.-P.; Praveen, P.; Ghosh, R.; Nakagawa, Y.; Igarria, A.; Shen, S.; Nguyen, V.; Backes, B.J.; Heiman, M.; others IRE1 $\alpha$  induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell metabolism* 2012, 16, 250-64.
19. Upton, J.-P.; Wang, L.; Han, D.; Wang, E.S.; Huskey, N.E.; Lim, L.; Truitt, M.; McManus, M.T.; Ruggero, D.; Goga, A.; others IRE1 $\alpha$  cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science* 2012, 338, 818-22.
20. Mesitov, M.V.; Soldatov, R.A.; Zaichenko, D.M.; Malakho, S.G.; Klementyeva, T.S.; Sokolovskaya, A.A.; Kubatiev, A.A.; Mironov, A.A.; Moskovtsev, A.A. Differential processing of small RNAs during endoplasmic reticulum stress. *Scientific reports* 2017, 7, 46080.

### Сведения об авторах:

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, e-mail: bioinf@mail.ru;

Клементьева Татьяна Сергеевна, аспирантка ФГБНУ НИИОПП;

Зайченко Данила Михайлович, мл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: danilamihailovich@mail.ru;

Колесов Дмитрий Валерьевич, науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: maedros@bk.ru;

Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, акад. РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП; зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Кожевникова Л.М.<sup>1</sup>, Цорин И.Б.<sup>2</sup>, Столярук В.Н.<sup>2</sup>, Вититнова М.Б.<sup>2</sup>,  
Барчуков В.В.<sup>2</sup>, Мирошкина И.А.<sup>2</sup>, Крыжановский С.А.<sup>2</sup>

## Оценка экспрессии генов рецепторных и регуляторных белков в миокарде крыс с хронической сердечной недостаточностью

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

<sup>2</sup> ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

**Цель исследования** — оценка уровня экспрессии генов рецепторных и регуляторных белков, участвующих в процессах ремоделирования и сократимости миокарда у крыс с хронической сердечной недостаточностью. **Методика.** Использован комплекс эхокардиографических и молекулярно-биологических методов исследования. Экспрессию генов оценивали по уровню мРНК в образцах тканей левого желудочка крыс на 92 сут. после перевязки коронарной артерии (опытная группа) или подведения лигатуры под коронарную артерию (группа сравнения). Выделение РНК из тканей левого желудочка сердца проводили с помощью набора GeneJET™, синтез кДНК — используя набор RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific», США), ПЦР-РВ проводили с помощью набора qPCRmix-HS («Евроген», Россия), используя праймеры и флуоресцентные зонды («ДНК-синтез», Россия), согласно протоколам производителей. **Результаты.** Установлено, что хроническая сердечная недостаточность (ХСН) формируется через 90 сут. после воспроизведения переднего трансмурального инфаркта миокарда, о чем свидетельствовало снижение инотропной функции сердца и увеличение конечно-систолического и конечно-диастолического размеров левого желудочка сердца. Показано, что при ХСН повышается экспрессия генов, причастных к ремоделированию миокарда. Так, в биоптатах левого желудочка сердца крыс с ХСН на 41% ( $p = 0,006$ ) возрастает уровень мРНК для ангиотензиновых рецепторов АТ1А-типа, на 33% ( $p = 0,01$ ) для вазопрессиновых V1A-R и на 71% ( $p = 0,01$ ) для эндотелиновых ЕТА-R по сравнению с аналогичными показателями у ложноперированных животных. У крыс с ХСН уровень мРНК  $\beta_1$ -AR и  $\beta_2$ -AR в левом желудочке превышал таковой у ложноперированных животных соответственно на 35% ( $p = 0,001$ ) и 48% ( $p = 0,0001$ ). Выявлен высокий уровень экспрессии генов белков Ерас2 и СаМ, играющих ключевую роль в аритмогенезе, что свидетельствует о высокой степени риска развития аритмий при ХСН. Установлено, что у животных с ХСН уровень мРНК для Sigma1-R в биоптатах тканей миокарда левого желудочка возрастает на 74% ( $p = 0,0001$ ) по сравнению с уровнем мРНК в сердцах ложноперированных крыс, что, по-видимому, носит компенсаторный характер, направленный на поддержание протеостаза, модуляцию активности различных ионных каналов и нормализацию биоэнергетических процессов в миокарде. **Заключение.** Таким образом, при ХСН в левом желудочке сердца крыс повышается экспрессия генов рецепторных и регуляторных белков, участвующих в процессах ремоделирования миокарда, что может быть одним из механизмов нарушения сократимости миокарда и возникновения злокачественных нарушений сердечного ритма, которые отягощают течение данного заболевания.

**Ключевые слова:** хроническая сердечная недостаточность, левый желудочек сердца, экспрессия генов, мРНК, рецепторы, кальмодулин, белки Ерас.

**Для цитирования:** Кожевникова Л.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Барчуков В.В., Мирошкина И.А., Крыжановский С.А. Оценка экспрессии генов рецепторных и регуляторных белков в миокарде крыс с хронической сердечной недостаточностью. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 28—35.

DOI:

**Для корреспонденции:** Кожевникова Любовь Михайловна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП, e-mail: lubovmih@yandex.ru.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.09.2018

Kozhevnikova L.M.<sup>1</sup>, Tsorin I.B.<sup>2</sup>, Stolyaruk V.N.<sup>2</sup>, Vititnova M.B.<sup>2</sup>,  
Barchukov V.V.<sup>2</sup>, Miroshkina I.A.<sup>2</sup>, Kryzhanovskii S.A.<sup>2</sup>

## The evaluation of expression of receptor and regulatory proteins genes in the myocardium of rats with chronic heart failure

<sup>1</sup> FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Baltiyskaya street, 8

<sup>2</sup> FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», 125315, Baltiyskaya street, 8

E-mail: lubovmih@yandex.ru

**The purpose.** The purpose of the study is to assess the level of expression of receptor and regulatory proteins genes involved in remodeling and myocardial contractility in rats with chronic heart failure. **Methods.** A complex of echocardiographic and molecular biological research methods was used. Gene expression was assessed by the level of mRNA in tissue samples of the left ventricle of rats extracted on day 92 after the coronary artery ligation (CHF group) or summation of the ligature under the coronary artery (sham-operated group). RNA isolation from the left ventricular tissue of the heart was performed using the GeneJET™ kit, cDNA synthesis using the RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), PCR-RV was performed using the qPCRmix-HS kit (Evrogen, Russia), using primers and fluorescent probes (DNA synthesis, Russia), according to manufacturers protocols. **Results.** It has been established that chronic heart failure (CHF) is formed 90 days after the reproduction of anterior transmural myocardial infarction, as evidenced by a decrease in heart pumping function and an increase in the end-systolic and end-diastolic sizes of the heart left ventricle. It is shown that CHF increases the expression of genes involved in myocardial remodeling. Thus, in left ventricular biopsy samples of rats with CHF, the level of mRNA for angiotensin receptors of AT1A type increases by 41% ( $p = 0.006$ ), by 33% ( $p = 0.01$ ) for vasopressin V1A-R and by 71% ( $p = 0.01$ ) for endothelin ETA-R compared with similar indicators in sham-operated animals. In rats with CHF, the  $\beta$ 1-AR and  $\beta$ 2-AR mRNA levels in the left ventricle exceeded that in the sham-operated animals, respectively, by 35% ( $p = 0.001$ ) and 48% ( $p = 0.0001$ ). A high level of gene expression of the Epac2 and CaM proteins, which play a key role in arrhythmogenesis, is evidenced, which indicates a high risk of developing arrhythmias in CHF. In animals with CHF, the level of mRNA for Sigma<sub>1</sub>-R in biopsy specimens of left ventricular myocardial tissue was found to increase by 74% ( $p = 0.0001$ ) compared to the level of mRNA in the hearts of sham-operated rats, that apparently has compensatory character at maintaining proteostasis, modulating the activity of various ion channels and normalizing bioenergetic processes in the myocardium. **Conclusion.** Thus, with CHF in the left ventricle of the rat heart, gene expression of receptor and regulatory proteins involved in myocardial remodeling increases, which can be one of the mechanisms of violation of myocardial contractility and the occurrence of malignant heart rhythm disorders that make it difficult for the disease.

**Keywords:** chronic heart failure, left ventricle of the heart, gene expression, мРНК, receptor, calmodulin, Epac proteins.

**For citation:** Kozhevnikova L.M., Tsorin I.B., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Barchukov V.V., Miroshkina I.A., Kryzhanovskii S.A. The evaluation of expression of receptor and regulatory proteins genes in the myocardium of rats with chronic heart failure. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 28—35. (In Russian).

**DOI:**

**Financing.** The study has not sponsorship.

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

### Information about authors:

Kozhevnikova L.M. — 0000-0002-1323-6472

Tsorin I.B. — 0000-0002-3988-7724

Stolyaruk V.N. — 0000-0002-4779-427X

Vititnova M.B. — 0000-0002-7407-7516

Barchukov V.V. — 0000-0003-4229-3107

Miroshkina I.A. — 0000-0002-3208-198X

Kryzhanovskii S.A. — 0000-0003-2832-4739

**Received** 10.09.2018

### Введение

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является исходом практически любого сердечно-сосудистого заболевания. Распространенность ХСН в общей популяции составляет 1,5—2%, а среди лиц

старше 65 лет — 6—10%. Смертность во всей популяции больных ХСН составляет 65% для мужчин и 47% для женщин [1]. В Российской Федерации распространенность ХСН составляет 7% от общего числа населения [2]. Несмотря на повсеместное вне-

дрение в широкую медицинскую практику самых эффективных на современном этапе лекарственных средств: ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента,  $\beta$ -блокаторов, антагонистов рецепторов альдостерона и т.д., смертность среди больных ХСН остается высокой [3, 4].

В настоящее время все большее внимание уделяется изучению роли ключевых регуляторных белков, определяющих функциональную активность внутриклеточных сигнальных каскадов, вовлеченных в формирование таких патологических процессов, как снижение сократительной способности и гипертрофия кардиомиоцитов. Такой подход позволяет не только идентифицировать тонкие механизмы, ответственные за формирование сердечной недостаточности, но и разработать принципиально новые подходы к созданию оригинальных лекарственных средств для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Важнейшим фактором, способствующим развитию и прогрессированию сердечных заболеваний, является стресс. ХСН развивается на фоне высокой активности нейрогормональных систем, таких, как гипоталамо-гипофизарно-кортикоадренальная, ренин-ангиотензин-альдостероновая система и симпатическая нервная системы. В последние десятилетия доказано наличие в сердце локальных ренин-ангиотензиновой, эндотелиновой, вазопрессинной и др. систем, осуществляющих аутокринно/паракринную регуляцию многочисленных процессов в различных клеточных структурах сердца. При ХСН эти системы действуют синергично, что приводит к прогрессированию патогномичных для этого заболевания патологических процессов, основным из которых является ремоделирование сердца, прогрессирование которого является основной причиной летальности такого рода больных. На молекулярном уровне ремоделирование миокарда опосредуется рецепторами для ангиотензина II (AT1A-R), катехоламинов ( $\beta$ -AR), эндотелина-1 (ETA-R) и вазопрессина (V1A-R). Задачей настоящего исследования являлась оценка уровня экспрессии рецепторных и регуляторных белков в миокарде крыс с хронической сердечной недостаточностью. Объектами исследований были рецепторы, участвующие в сократимости и ремоделировании миокарда (ангиотензина II, катехоламинов, эндотелина-1, вазопрессина), белки Ерас и кальмодулин, а также  $\sigma_1$ -рецепторы.

### Методика

Эксперименты выполнены на беспородных крысах-самцах массой 160—180 г. Условия содержания животных соответствовало приказу МЗ РФ № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной

практики» от 01.04.2016 г. и этическим нормам, изложенным в Правилах лабораторной практики (GLP) Хельсинской декларации (2000 г.). ХСН воспроизводили по ранее разработанной нами трансляционной модели хронической сердечной недостаточности, которая развивается через 3 мес. после одномоментной перевязки левой коронарной артерии непосредственно в месте ее выхода из-под ушка сердца [5]. Животные были рандомизированы на 2 группы: ложнопериоперированные ( $n = 9$ ) и с ХСН ( $n = 12$ ).

Оценку состояния внутрисердечной гемодинамики проводили на 2, 7, 14, 30, 60 и 90-е сут. после воспроизведения инфаркта миокарда. Наркотизированных животных (кетамин, 100 мг/кг) фиксировали в положении на спине на операционном столике. Измерения проводили в условиях закрытой грудной клетки и спонтанного дыхания в одномерном М- и двухмерном В-модальных режимах при положении датчика эхокардиографа в парастернальной позиции по длинной оси сердца. В М-модальном режиме оценивали конечно-систолический (КСР) и конечно-диастолический (КДР) размеры левого желудочка сердца. Рассчитывали фракцию выброса (ФВ), фракцию укорочения (ФУ), конечно-систолический (КСО) и конечно-диастолический объем (КДО) левого желудочка. Оценку показателей проводили, как минимум, по 5 последовательным сердечным циклам. В работе использовали цифровой ультразвуковой эхокардиограф DP-6600 (Mindray, Китай) с электронным микроконвексным датчиком 65C15EA (6,5/8,0 МГц). Критерием формирования постинфарктной ХСН было статистически значимое по сравнению со 2-ми сут. после перевязки коронарной артерии снижение фракции выброса в сочетании с дилатацией левого желудочка сердца.

После проведения последней эхокардиографии на 92-е сут. после перевязки коронарной артерии (группа ХСН), или подведения лигатуры под коронарную артерию (ложнопериоперированные) животных декапитировали, брали образцы миокарда левого желудочка. Образцы отмывали от крови в физиологическом растворе натрия хлорида при  $+4^{\circ}\text{C}$ , после чего их помещали в раствор RNAlater (США, Ambion) и хранили до выделения РНК при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Образцы, извлеченные из раствора RNAlater, освобождали от остатков жидкости и гомогенизировали при помощи жидкого азота и фарфоровой ступки. Выделение РНК из тканей левого желудочка сердца проводили с помощью набора GeneJET™ («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу производителя. Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Выделенную суммарную РНК для предотвращения

контаминации геномной ДНК обрабатывали ДНКазой I. Добавив все компоненты, смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Фермент инактивировали нагреванием при 65°C в течение 10 мин, предварительно добавив 25 мМ ЭДТА, из расчета 1 мкл на 10 мкл реакционной смеси, для предотвращения гидролиза РНК в процессе нагревания. Реакцию обратной транскрипции (синтез цепи комплементарной ДНК) проводили с использованием гексамерных Random праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV в составе набора RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (США) в соответствии с протоколом производителя. Синтезированную кДНК хранили при -20°C. ПЦР-РВ проводили с помощью набора qPCRmix-HS («Евроген», Россия), используя праймеры и флуоресцентные зонды («ДНК-синтез», Россия). В качестве гена «домашнего хозяйства» был использован ген  $\beta$ -актина. ПЦР-РВ проводили в 96-луночном ПЦР-планшете («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Предварительную обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения, приложенного к прибору. Дальнейшая обработка проводилась в приложении Microsoft Excel с использованием алгоритма  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Расчет уровня матричной РНК (мРНК) проводили с использованием алгоритма  $\Delta\Delta Ct$ , в основу которого положены относительные изменения пороговых циклов ( $Ct$ ) исследуемого и референсного гена в опытных и контрольных образцах.

**Статистика.** Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро—Уилка, гомогенность дисперсий — по Левену. Статистическую значимость различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента, в случае необходимости использовали приближенный вариант критерия для выборок с неравными дисперсиями. Полученные результаты представляли в виде средних и их стандартных ошибок. Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Динамические эхокардиографические исследования показали, что ХСН формируется через 90 сут. после воспроизведения переднего трансмурального инфаркта миокарда. К этому времени у животных основной группы отмечается статистически значимое по сравнению со 2-ми сут. после воспроизведения экспериментального инфаркта миокарда снижение ФВ левого желудочка сердца соответственно с  $63,9 \pm 1,6$  до  $55,9 \pm 1,4\%$ ,  $p = 0,0008$ . Снижение насосной функции сердца сопровождается увеличением КСР и

КДР (соответственно с  $2,49 \pm 0,08$  до  $3,91 \pm 0,17$  мм,  $p = 0,0002$ , и с  $3,56 \pm 0,11$  до  $5,20 \pm 0,19$  мм,  $p = 0,0001$ ). Полученные данные свидетельствовали о развитии у крыс через 90 сут. после перевязки левой коронарной артерии хронической сердечной недостаточности. Результаты эхокардиографических исследований были подтверждены данными гистологического исследования о наличии патогномных для данной патологии изменений миокарда (постинфарктный кардиосклероз, компенсаторная гипертрофия кардиомиоцитов, очаги исчезновения поперечной исчерченности мышечных волокон и т.д.) и признаков венозного застоя в легких и печени [5].

Установлено, что через 3 мес. после перевязки левой коронарной артерии, т.е. к моменту формирования ХСН, в биоптатах тканей миокарда левого желудочка сердца на 41% ( $p = 0,006$ ) возрастает уровень мРНК для ангиотензиновых рецепторов AT1A-типа и на 33% ( $p = 0,01$ ) — для вазопрессиновых V1A-R по сравнению с аналогичными показателями у ложноперевязанных животных (рис. 1,А).

Показано, что активация AT1-R влечет за собой гипертрофию кардиомиоцитов, стимулирует синтез внеклеточного матрикса, гиперплазию гладкомышечных клеток коронарных артерий и увеличение их жесткости. AT1-R индуцируют экспрессию  $\beta$ -трансформирующего фактора (TGF $\beta$ 1), посредством которого и реализуется гипертрофический рост кардиомиоцитов [6, 7]. Активация сигнального каскада от рецепторов TGF $\beta$ 1 увеличивает транскрипцию генов таких белков, как коллаген, фибронектин и фактор роста соединительной ткани (CTGF) [8, 9]. AT1-R также является мощным медиатором окислительного стресса и ROS-опосредованной сигнализации, что является одним из пагубных последствий активации ренин-ангиотензиновой системы. Реактивные формы кислорода (ROS) играют важную роль в прогрессировании сердечно-сосудистых дисфункций и хронической сердечной недостаточности [16, 17].

Наряду с AT1A-R важную роль в патогенезе ХСН играют V1A-R [12, 13]. Стимуляция V1A-R на клетках гладкой мускулатуры сосудов вызывает повышение сосудистого сопротивления и увеличение постнагрузки на миокард [14]. Полагают, что повышение постнагрузки и прямое повреждающее действие AVP на кардиомиоциты лежит в основе AVP-опосредованного ремоделирования сердца. Показано, что повреждающее действие на миокард, опосредованное V1AR, реализуется по Gq-Akt-ERK1/2-зависимому сигнальному пути [15]. V1AR-опосредованная гипертрофия миокарда вызвана усиленным синтезом белка и увеличением площади поверхности клеток. Согласно результатам клинических исследований, на поздней стадии

развития ХСН экспрессия V1A-R в тканях миокарда увеличивается в 2 раза [16]. Полученные нами данные об увеличении экспрессии гена V1A-R согласуются с результатами экспериментальных исследований других авторов, полученных на моделях ХСН, воспроизведенных на мелких и крупных животных [13, 17].

Одним из факторов, обладающим митогенной активностью, является эндотелин-1 (ЕТ1). Известно, что ЕТ1 действует как местный аутокринно/паракринный фактор, регулирующий вазоконстрикцию, митогенез и инотропную функцию миокарда [18]. В кардиомиоцитах экспрессируются главным образом ЕТА-R, которые сопряжены с Gq-белком. Положительное инотропное действие ЕТ1 связывают с ЕТА-R-индуцированной активацией протеинкиназы С (РКС) и Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обменника, а внутриклеточные процессы, регулирующие выживаемость кардиомиоцитов, обеспечиваются путем активации РКС/Р13К-сигнального каскада [19].

В наших экспериментах показано, что у животных через 3 мес. после перевязки коронарной артерии уровень мРНК для ЕТА-R в биоптатах тканей миокарда левого желудочка сердца возрастает на 71% (p = 0,01) по сравнению с аналогичными показателями в сердцах ложнопериорированных животных (рис. 1, А). Показано, что ЕТ1 посредством ЕТА-R подобно АП1 инициирует гипертрофию кардиомиоцитов, приводящую к патологическому ремоделированию левого желудочка сердца, путем активации MAP-киназного каскада, а также индуцирует генерацию активных форм кислорода [20, 21].

Близкие данные получены и в отношении экспрессии гена β-AR. У крыс с ХСН уровень мРНК β1-AR и β2-AR в биоптатах тканей миокарда левого желудочка сердца превышал таковой у ложнопериорированных животных соответственно на 35% (p = 0,001) и 48% (p = 0,0001) (рис. 1Б). Увеличение экспрессии гена β-AR, по-видимому, является следствием хронической активации симпатического отдела вегетативной нервной системы и повышенной трансдукции сигнала как от β1-AR, так и β2-AR.

Роль β-AR в регуляции деятельности сердца хорошо известна. β1-AR сопряжены с Gs сигнальными белками. В физиологических условиях их активация инициирует положительный инотропный, лизитропный (диастолическое расслабление миокарда) и хронотропный эффекты. Однако при ХСН избыточная стимуляция β1AR и последующая активация Р13К-Акт-GSK-3β сигнального пути инициирует гипертрофию, апоптоз, а в ряде случаев и некроз кардиомиоцитов [22, 23]. Как следует из результатов эхокардиографических исследований, у крыс со сформировавшейся ХСН инотропная функция сердца (ФВ) снижается на 40% по сравнению с интактными жи-

вотными. Снижение насосной функции сердца на фоне значительного увеличения экспрессии гена β1-AR подтверждает известные данные о том, что в условиях ХСН возрастает скорость десенситизации β1-AR. В последнее время появились сообщения о том, что скорость десенситизации β-AR в условиях ХСН может ускоряться в зависимости от функционального состояния вазопрессинных V1A-R [24]. Показано, что активация V1A-R приводит к подавлению β-AR-зависимой генерации сAMP и мобилизации Ca<sup>2+</sup> в кардиомиоцитах и, как следствие, снижается β-AR-индуцированный инотропный ответ миокарда [24, 25].

Если увеличение экспрессии β1-AR при ХСН ответственно за формирование патологических изменений миокарда, то наблюдаемая в наших экспериментах гиперэкспрессия β2-AR, сопряженных не только с Gs, но и с Gi сигнальными белками, по-видимому, носит компенсаторный характер [26]. В исследованиях на трансгенных мышах было продемонстрировано, что повышенная экспрессия β2-AR в условиях ХСН не только улучшает сократительную функцию желудоч-

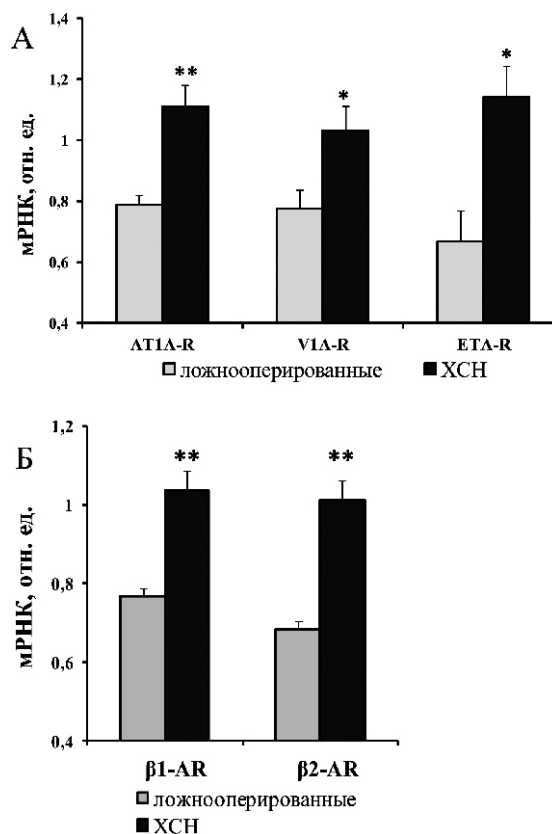


Рис. 1. Изменение уровня мРНК ангиотензиновых (AT1-R), вазопрессинных (V1A-R), эндотелиновых (ETA-R) рецепторов (А) и β-адренорецепторов (Б) в левом желудочке сердца крыс с хронической сердечной недостаточностью (ХСН). \* – p<0,05, \*\* – p<0,01 по сравнению с аналогичными показателями у ложнопериорированных животных.



ков, но и уменьшает гипертрофию миокарда, и этот кардиопротективный эффект опосредуется  $G_i$  сигнальными белками [27]. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что к концу 3-го месяца после перевязки коронарной артерии начинает формироваться характерный для ХСН феномен обратной регуляции (down- и up-regulation) — снижение плотности  $\beta_1$ - и увеличение плотности  $\beta_2$ -адренорецепторов, встроенных в клеточную мембрану кардиомиоцитов.

Вторичным мессенджером сигнальной трансдукции от  $\beta$ -AR является cAMP, эффекторами которого являются протеинкиназа А (РКА) и белки Ерас (exchange protein directly activated by cAMP). В кардиомиоцитах, идентифицированы 2 изоформы этих белков — Ерас1 и Ерас2, которые регулируют многие про-

цессы, включая внутриклеточный обмен  $Ca^{2+}$ , экспрессию генов, межклеточное взаимодействие [28]. В наших экспериментах показано, что через 3 мес. после перевязки коронарной артерии в биоптатах тканей миокарда не изменяется уровень экспрессии гена Ерас1, но возрастает экспрессия гена Ерас2 по сравнению с аналогичными величинами в сердцах ложнопериоперированных животных (рис. 2). С помощью  $\beta$ -AR-cAMP-РКА-пути реализуются главным образом инотропный и лизитропный эффекты  $\beta_1$ -AR [29]. В исследованиях последних лет установлено, что активация белков Ерас2 может способствовать возникновению  $\beta_1$ -AR-индуцированных аритмий [28, 29]. Полагают, что активация  $\beta$ -AR-cAMP-Ерас2-сигнального каскада опосредует утечку  $Ca^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума (SR) в диастолу и оказывает выраженное аритмогенное действие. Полученные данные о высоком уровне экспрессии гена Ерас2 в левом желудочке крыс с ХСН позволяют полагать, что внедрение в комплексную терапию ХСН селективных блокаторов Ерас2 может в существенной мере снизить риск возникновения злокачественных нарушений сердечного ритма, которые, как известно, отягощают течение этого заболевания.

В кардиомиоцитах важнейшим регулятором  $\beta_1$ -AR-cAMP-Ерас2 сигнального каскада является кальмодулин (CaM). За последние годы накоплен убедительный материал, свидетельствующий о ключевой роли CaM в генезе ремоделирования миокарда и аритмогенезе при ХСН [30]. Как видно на рис. 3, в биоптатах тканей миокарда левого желудочка крыс с ХСН на 30% ( $p = 0,04$ ) возрастает уровень мРНК для CaM по сравнению с уровнем мРНК в сердцах ложнопериоперированных животных (рис. 2). В кардиомиоцитах CaM регулирует активность риадиноновых рецепторов (RyR2) путем прямого взаимодействия с ними, а также через CaM-зависимые киназы (CaMKII), которые фосфорилируют как RyR2, так и рецепторы инозитол-1,4,5-трисфосфата —  $IP_3R$ . Показано, что в условиях ХСН CaM-индуцированная чрезмерная утечка ионов  $Ca^{2+}$  из SR в диастолу лежит в основе развития фатальных нарушений сердечного ритма [30], а подавление экспрессии гена CaM с помощью микроРНК оказывает выраженное антигипертрофическое действие [31]. С учетом данных литературы и результатов собственных исследований есть все основания полагать, что внедрение в клиническую практику селективных блокаторов CaM и/или CaMKII может внести существенный вклад в терапию ХСН.

В настоящем исследовании помимо экспрессии генов рецепторов цитоплазматической мембраны и белков, участвующих в реализации индуцированной ими внутриклеточной сигнализации, был оценен характер изменения экспрессии гена  $\sigma_1$ -рецепторов

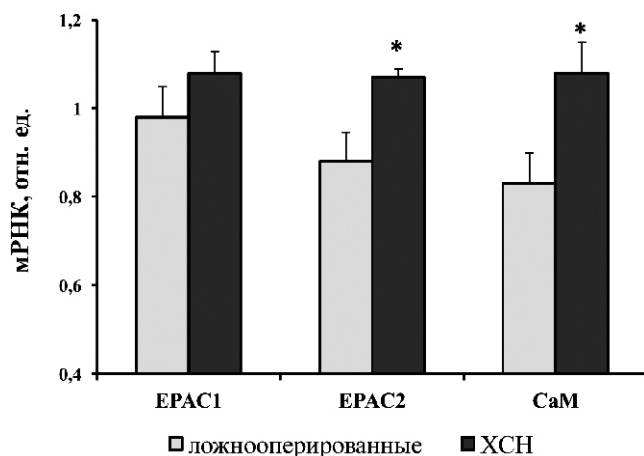


Рис. 2. Изменение уровня мРНК белков Ерас1, Ерас2 и кальмодулина (CaM) в левом желудочке сердца крыс с хронической сердечной недостаточностью (ХСН). \* —  $p < 0,05$  по сравнению с аналогичными показателями у ложнопериоперированных животных.

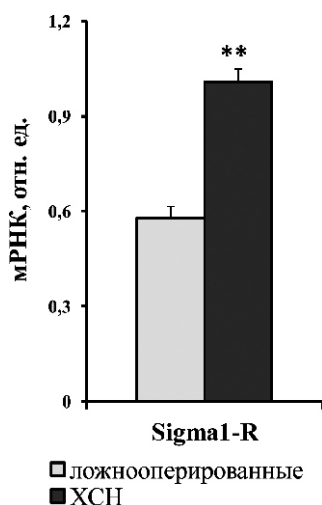


Рис. 3. Изменение уровня мРНК  $\sigma_1$  рецепторов в левом желудочке сердца крыс с хронической сердечной недостаточностью (ХСН). \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с аналогичными показателями у ложнопериоперированных животных.

(Sigma<sub>1</sub>-R), локализованных в мембране эндоплазматического ретикула. В настоящее время Sigma<sub>1</sub>-R рассматривают как стресс-активируемые лиганд-управляемые шапероны SR, которые регулируют многочисленные процессы, в том числе фолдинг белков, защищая клетки от протеотоксического стресса [32]. Известно, что нарушение протеостаза критично для нормального функционирования кардиомиоцитов, так как они являются постмитотическими долгоживущими клетками с ограниченной регенеративной способностью. Полагают, что Sigma<sub>1</sub>-R регулируют тонкие механизмы сократимости кардиомиоцитов за счет их модулирующего влияния на активность ионных каналов плазматической мембраны, мембраны SR и митохондрий и таким образом обеспечивают электромеханическое сопряжение кардиомиоцитов, способствуют поддержанию их электрической стабильности и оптимизируют энергетический метаболизм [32].

В наших экспериментах показано, что у животных с ХСН уровень мРНК для Sigma<sub>1</sub>-R в биоптатах тканей миокарда левого желудочка сердца возрастает на 74% (p = 0,0001) по сравнению с уровнем мРНК в сердцах ложнопериорированных крыс (рис. 3). По всей видимости, в условиях развившейся ХСН увеличение экспрессии Sigma<sub>1</sub>-R, зарегистрированное в наших экспериментах, носит компенсаторный характер, направленный на поддержание протеостаза, модуляцию активности различных ионных каналов и нормализацию биоэнергетических процессов в миокарде. Это предположение основано на результатах исследований, свидетельствующих о том, что курсовое применение агонистов Sigma<sub>1</sub>-R в условиях экспериментальной ХСН не только способствует поддержанию инотропной функции миокарда и препятствует развитию патологического ремоделирования левого желудочка сердца, но и уменьшает содержание в плазме крови биохимического маркера ХСН — мозгового натрийуретического пептида [33].

### Заключение

Таким образом, при ХСН в левом желудочке сердца крыс повышается экспрессия генов рецепторных и регуляторных белков, участвующих в процессах ремоделирования миокарда, что может быть одним из механизмов нарушения сократимости миокарда и возникновения злокачественных нарушений сердечного ритма, которые отягощают течение заболевания. Результаты настоящего исследования позволили высказать предположение о наличии новых оригинальных биомаркеров для создания инновационных лекарственных средств для профилактики и лечения хронической сердечной недостаточности.

### Литература

(п.п. 1; 3; 4; 6-32 см. References)

2. Фомин И.В. Хроническая сердечная недостаточность в Российской Федерации: Что мы сегодня знаем и что должны делать. *Российский кардиологический журнал*. 2016; 8(136): 7-13.
5. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Ионова Е.О., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Барчуков В.В., Миросшкина И.А., Сорокина А.В., Кожевникова Л.М., Дурнев А.Д. Трансляционная модель хронической сердечной недостаточности у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(2): 136-48.

### References

1. Mahmood S.S., Levy D., Vasan R.S., Wang T.J. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet*. 2014; 383(9921): 999-1008.
2. Fomin I.V. Chronic heart failure in the Russian Federation: what we know today and what should be done. *Rossiiskiy kardiologicheskij zhurnal*. 2016; 8(136): 7-13. (in Russian)
3. Ferrero P., Iacovoni A., D'Elia E., Vaduganathan M., Gavazzi A., Senni M. Prognostic scores in heart failure — Critical appraisal and practical use. *Int. J. Cardiol*. 2015; 188: 1-9.
4. Chaudhry S.P., Stewart G.C. Advanced heart failure: Prevalence, natural history, and prognosis. *Heart Fail. Clin*. 2016; 12(3): 323-33.
5. Kryzhanovsky S.A., Zorin I.B., Ionova E.O., Stolaruk V.N., Vititnova M.B., Barchukov V.V., Mirosшкин A.I., Sorokin A.V., Kozhevnikova L.M., Durnev A.D. Translational model of chronic heart failure in rats. *Patologicheskaya Fiziolgiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(2): 136-48. (in Russian)
6. Schultz Jel.J., Witt S.A., Glascock B.J., Nieman M.L., Reiser P.J., Nix S.L., Kimball T.R., Doetschman T. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J. Clin. Invest*. 2002; 109(6): 787-796.
7. Ding Y., Chen J., Cui G., Wei Y., Lu C., Wang L., Diao H. Pathophysiological role of osteopontin and angiotensin II in atherosclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2016; 471(1): 5-9.
8. Lim H., Zhu Y.Z. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure. *Cell. Mol. Life Sci*. 2006; 63(22): 2584-96.
9. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ. Res*. 2010; 106(11): 1675-80.
10. Huang C.Y., Chen J.Y., Kuo C.H., Pai P.Y., Ho T.J., Chen T.S., Tsai F.J., Padma V.V., Kuo W.W., Huang C.Y. Mitochondrial ROS-induced ERK1/2 activation and HSF2-mediated AT1 R upregulation are required for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J. Cell. Physiol*. 2018; 233(1): 463-75.
11. Mariappan N., Elks C.M., Haque M., Francis J. Interaction of TNF with angiotensin II contributes to mitochondrial oxidative stress and cardiac damage in rats. *PLoS One*. 2012; 7(10): e46568.
12. Chen X., Lu G., Tang K., Li Q., Gao X. The secretion patterns and roles of cardiac and circulating arginine vasopressin during the development of heart failure. *Neuropeptides*. 2015; 51: 63-73.
13. Wasilewski M.A., Myers V.D., Recchia F.A., Feldman A.M., Tilley D.G. Arginine vasopressin receptor signaling and functional outcomes in heart failure. *Cell. Signal*. 2016; 28(3): 224-33.

14. Goldsmith S.R. The role of vasopressin in congestive heart failure. *Cleve. Clin. J. Med.* 2006; 73 Suppl 3:S19-23.
15. Li X., Chan T.O., Myers V., Chowdhury I., Zhang X.Q., Song J., Zhang J., Andrej J., Funakoshi H., Robbins J., Koch W.J., Hyslop T., Cheung J.Y., Feldman A. Controlled and cardiac-restricted overexpression of the arginine vasopressin VIA receptor causes reversible left ventricular dysfunction through Gαq-mediated cell signaling. *Circulation.* 2011; 124(5): 572-81.
16. Zhu W., Tilley D.G., Myers V.D., Tsai E.J., Feldman A.M. Increased vasopressin 1A receptor expression in failing human hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 63(4): 375-6.
17. Yamazaki T., Izumi Y., Nakamura Y., Yamashita N., Fujiki H., Osada-Oka M., Shiota M., Hanatani A., Shimada K., Iwao H., Yoshiyama M. Tolvaptan improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in rats. *Circ. Heart Fail.* 2012; 5(6): 794-802.
18. Drawnel F.M., Archer C.R., Roderick H.L. The role of the paracrine/autocrine mediator endothelin-1 in regulation of cardiac contractility and growth. *Br. J. Pharmacol.* 2013; 168(2): 296-317.
19. Schorlemmer A., Matter M.L., Shohet R.V. Cardioprotective signaling by endothelin. *Trends Cardiovasc. Med.* 2008; 18(7): 233-9.
20. Angerio A.D. The role of endothelin in heart failure. *Crit. Care Nurs. Q.* 2005; 28(4): 355-9.
21. Lehmann L.H., Rostovsky J.S., Buss S.J., Kreuzer M.M., Krebs J., Mier W., Enseleit F., Spiger K., Hardt S.E., Wieland T., Haass M., Luscher T.F., Schneider M.D., Parlato R., Grone H.J., Haberkorn U., Yanagisawa M., Katus H.A., Baks J. Essential role of sympathetic endothelin A receptors for adverse cardiac remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2014; 111(37): 13499-504.
22. Morisco C., Zebrowski D.C., Vatner D.E., Vatner S.F., Sadoshima J. Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001; 33(3): 561-73.
23. Vittone L., Said M., Mattiazzi A. Beta 2-Adrenergic stimulation is involved in the contractile dysfunction of the stunned heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006; 373(1): 60-70.
24. Wasilewski M.A., Grisanti L.A., Song J., Carter R.L., Repas A.A., Myers V.D., Gao E., Koch W.J., Cheung J.Y., Feldman A.M., Tilley D. Vasopressin type 1A receptor deletion enhances cardiac contractility, β-Adrenergic receptor sensitivity and acute cardiac injury-induced dysfunction. *Clin. Sci. (Lond).* 2016; 130(22): 2017-27.
25. Tilley D.G., Zhu W., Myers V.D., Barr L.A., Gao E., Li X., Song J., Carter R.L., Makarewich C.A., Yu D., Trouper C.D., Grisanti L.A., Coleman R.C., Koch W.J., Houser S.R., Cheung J.Y., Feldman A.M. β-adrenergic receptor-mediated cardiac contractility is inhibited via vasopressin type 1A-receptor-dependent-signaling. *Circulation.* 2014; 130(20): 1800-11.
26. Gong H., San Y., Wang L., Lv Q., Chen L. The effects and possible mechanism of β2AR gene expression in cardiocytes of canines with heart failure. *Exp. Ther. Med.* 2017; 14(1): 539-546.
27. Dorn G.W. 2nd, Tepe N.M., Lorenz J.N., Koch W.J., Liggett SB. Low- and high-level transgenic expression of beta2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in Galphaq-overexpressing mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999. 96(11): 6400-5.
28. Schmidt M., Dekker F.J., Maarsingh H. Exchange protein directly activated by cAMP (Epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacol. Rev.* 2013; 65(2): 670-709. DOI: 10.1124/pr.110.003707.
29. Pereira L., Bare D.J., Galice S., Shannon T.R., Bers D.M. β-Adrenergic induced SR Ca<sup>2+</sup> leak is mediated by an Epac-NOS pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2017;108: 8-16.
30. Walweel K., Oo Y.W., Laver D.R. The emerging role of calmodulin regulation of RyR2 in controlling heart rhythm, the progression of heart failure and the antiarrhythmic action of dantrolene. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2017; 44(1): 135-142.
31. Zhou X., Sun F., Luo S, Zhao W., Yang T., Zhang G., Gao M., Lu R., Shu Y., Mu W., Zhuang Y., Ding F., Xu C., Lu Y. Is an antihypertrophic regulator in the heart via targeting calmodulin. *Int. J. Biol. Sci.* 2017; 13(1): 22-31.
32. Hayashi T. Conversion of psychological stress into cellular stress response: roles of the sigma-1 receptor in the process. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2015; 69(4): 179-91.
33. Kryzhanovskii S.A., Kozhevnikova L.M., Tsorin I.B., Sukhanova I.F., Ionova E.O., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Miroshkina I.A., Seredenin S.B. On the Mechanism of the Cardioprotective Action of σ1 Receptor Agonist Anxiolytic Fabomotizole Hydrochloride (Afobazole). *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018; 165(5): 660-664. (in Russian)

#### Сведения об авторах:

Кожевникова Любовь Михайловна — докт. мед. наук, зав. лабораторией хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Цорин Иосиф Борисович — докт. биол. наук, вед. научн. сотр. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

Столярук Валерий Николаевич — канд. мед. наук, ст. научн. сотр. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

Вититнова Марина Борисовна — канд. биол. наук, ст. научн. сотр. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

Барчуков Владимир Валерьевич — научн. сотр. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

Мирошкина Ирина Александровна — научн. сотр. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

Крыжановский Сергей Александрович — докт. мед. наук, зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

Кирова Ю.И., Германова Э.Л.

## Новые аспекты энерготропного действия мексидола

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

Митохондриогенез и ангиогенез являются ключевыми нейропротекторными механизмами, повышающими устойчивость нервной ткани к условиям гипоксии/ишемии. В настоящее время фармакологическая индукция биогенеза митохондрий является одним из наиболее перспективных и активно разрабатываемых подходов к коррекции ишемических и постишемических нарушений, нейродегенеративных заболеваний и кардиопатий. Выявление факта стимуляции митохондриогенеза эталонными нейропротекторными препаратами позволит существенно расширить представление об их терапевтическом потенциале и принципах применения. **Цель исследования** — изучение влияния нейропротекторного сукцинатсодержащего препарата мексидол на экспрессию каталитических субъединиц дыхательных ферментов митохондрий, АТФ-синтазы и фактора роста эндотелия сосудов в коре головного мозга крыс с врожденными различиями в устойчивости к дефициту кислорода. **Методика.** Исследование выполнено на белых беспородных крысах-самцах. Инъекции мексидола (40 мг/кг, внутривенно) выполняли ежедневно на протяжении 20 сут. Уровень экспрессии каталитических субъединиц дыхательных ферментов митохондрий и АТФ-синтазы, фактора роста эндотелия сосудов и сукцинатного рецептора в ткани коры головного мозга оценивали методом иммуноблоттинга. Общую резистентность организма к острой гипоксии тестировали в гипобарической камере проточного типа при разрежении атмосферы, соответствующем 190 мм рт. ст. (3% O<sub>2</sub>). **Результаты.** В ходе курса применения мексидола происходило увеличение уровня каталитических субъединиц дыхательных ферментов митохондрий (NDUFB2, SDHA, cyt b, COX1), АТФ-синтазы (АТФ5А), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и сукцинатного рецептора (SUCNR1), особенно выраженное у неустойчивых к гипоксии особей. **Заключение.** Впервые показана вовлеченность сукцинатсодержащего препарата мексидол в механизмы индукции ферментов энергопродуцирующей системы митохондрий коры головного мозга, что существенно расширяет сложившиеся представления о механизмах его энерготропного действия.

**Ключевые слова:** мексидол, сукцинатный рецептор, кора головного мозга, крысы, биогенез митохондрий, ангиогенез.

**Для цитирования:** Кирова Ю.И., Германова Э.Л. Новые аспекты энерготропного действия мексидола. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 36—40.

DOI:

**Для корреспонденции:** Кирова Юлия Игоревна, bioenerg@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.08.2018

Kirova Yu.I., Germanova E.L.

## New aspects of the energy-tropic action of mexidol

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

Mitochondriogenesis and angiogenesis are crucial neuroprotective mechanisms that increase the resistance of nervous tissue to hypoxia/ischemia conditions. Currently, pharmacological induction of mitochondrial biogenesis is one of the most promising and actively developed approaches for the correction of ischemic and post-ischemic disorders, neurodegenerative diseases and cardiopathies. Revealing the fact of stimulation of mitochondriogenesis with standard neuroprotective drugs will significantly expand the understanding of their therapeutic potential and principles of application. **The aim** of the research was to study the effect of the neuroprotective succinate-containing drug mexidol on the expression of catalytic subunits of the respiratory enzymes of mitochondria, ATP-synthase and vascular endothelial growth factor in the cerebral cortex of rats with inborn differences in resistance to oxygen deficiency. **Methods.** The study was carried out on white mongrel rats-males. Injections of mexidol (40 mg/kg, intraperitoneally) were performed daily for 20 days. The expression level of the catalytic subunits of the respiratory enzymes of mitochondria and ATP-synthase, vascular endothelial growth factor and succinate receptor in the tissue of the cerebral cortex was assessed by immunoblotting. The total resistance of the organism to acute

hypoxia was tested in a hypobaric chamber with an atmosphere underpressure corresponding to 190 mm Hg (3% O<sub>2</sub>). **Results.** During the injection course of mexidol, there was an increase in the level of catalytic subunits of the respiratory enzymes of mitochondria (NDUFV2, SDHA, cyt b, COX1), ATP-synthase (ATP5A), vascular endothelial growth factor (VEGF) and succinate receptor (SUCNR1), especially pronounced in rats with low-resistance to hypoxia. **Conclusion.** The study revealed for the first time the involvement of the succinate-containing drug mexidol in the mechanisms of induction of enzymes of the energy-producing system of the mitochondria of the cerebral cortex, which significantly expands the existing ideas about the mechanisms of its energy-tropic action.

**Keywords:** mexidol, succinate receptor, cerebral cortex, rats, mitochondrial biogenesis, angiogenesis.

**For citation:** Kirova Yu.I., Germanova E.L. New aspects of the energy-tropic action of mexidol. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 36—40. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Yuliya Kirova, bioenerg@mail.ru

**Financing.** The study had no sponsorship.

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

**Received** 20.08.2018

## Введение

Повышение устойчивости высокоаэробных тканей и, прежде всего, головного мозга к гипоксии/ишемии определяется увеличением функциональной активности и массы митохондрий, плотности сосудистой сети, нейропластического потенциала [1]. Наиболее перспективными фармакологическими модуляторами процессов пролиферации, митохондриогенеза, блокирования апоптоза в нервной ткани являются синтетические олигопептиды с выраженными нейротрофическими и ростовыми свойствами [2]. В качестве регуляторов нейропластических и нейрорепаративных механизмов не меньший интерес представляют некоторые интермедиаты энергетического обмена, быстро метаболизируемые в ходе катаболических реакций и проявляющие свойства сигнальных молекул. Известно, например, что субстраты цикла Кребса (ди- и трикарбоновые кислоты) активируют собственные специфические рецепторы, иницируют механизмы вазодилатации, оказывают пролиферативные эффекты [3, 4]. В 2004 г. был идентифицирован рецептор янтарной кислоты (SUCNR1/GPR91), одним из эффектов которого в нервной ткани является васкуляризация [4].

Применение препаратов метаболического типа действия (мексидол, цитофлавин, реамберин, мафукол), содержащих в своем составе интермедиаты цикла Кребса, составляет основу энерготропной терапии острых и хронических ишемических повреждений мозга [5]. Мексидол — нейропротекторный сукцинатсодержащий препарат (этилметилгидроксипиридина сукцинат) — проникает через гематоэнцефалический барьер, проявляет мультитаргетное действие, сочетающее антиоксидантный, антигипоксический, антитромбогенный, анксиолитический, противосудорожный, ноотропный эффекты [6]. Несмотря на ши-

рокое клиническое применение мексидола некоторые возможные аспекты его активности, опосредованные сукцинатным рецептором (SUCNR1), направленные на индукцию митохондрио- и ангиогенеза, остаются в настоящее время неоправданно недооцененными и неизученными.

*Цель исследования* — оценка влияния курсового применения мексидола на уровень каталитических субъединиц дыхательных ферментов митохондрий (NDUFV2, SDHA, cyt b, COX1), АТФ-синтазы (ATPSA), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и сукцинатного рецептора (SUCNR1) в ткани коры головного мозга крыс с врожденными различиями в устойчивости к дефициту кислорода.

## Методика

Исследование было выполнено на белых беспородных крысах-самцах массой 250—300 г, выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» при естественном чередовании суточной освещенности, свободном доступе к пище и воде. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Всемирного общества защиты животных и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Работа одобрена этическим комитетом ФГБНУ НИИОПП.

Перед проведением экспериментов (за 4 нед.) животные были типированы по устойчивости к острой гипоксии, моделируемой в гипобарической камере проточного типа (190 мм рт. ст., 3% O<sub>2</sub>). Крысы, переживающие условия острой гипоксии в течение 1—2 мин до появления патологических типов дыхания, составили группу низкоустойчивых (НУ) к гипоксии, в течение 10—20 мин — группу высокоустойчивых (ВУ) [7].

Введение мексидола (40 мг/кг, внутривенно) осуществляли ежедневно на протяжении 20 сут. Была использована минимальная доза препарата, вызывающая статистически значимый эффект увеличения резистентности животных к острой гипобарической гипоксии. Ткань коры головного мозга (КГМ) брали на исследование через 1 ч и 24 ч после 1-го, 3-го, 8-го, 20-го введения мексидола. Забой выполняли декапитацией под эфирным наркозом. КГМ замораживали в жидком азоте и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Содержание каталитических субъединиц митохондриальных ферментов (NDUФV2 [NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2]; SDHA [a flavochrome subunit of succinate dehydrogenase]; cyt b [cytochrome b]; COX1 [cytochrome c oxidase subunit I]; АТP5А [АТP synthase alpha chain]), сукцинатного рецептора (SUCNR1/GPR91), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) определяли в цитоплазматическом экстракте КГМ [8]. Белки подготовленных проб разделяли в 10% полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану электрофорезом. Мембрану инкубировали с первичными поликлональными антителами (разведение 1:500; 24ч;  $4^{\circ}\text{C}$ ; Santa Cruz Biotechnology, США; sc-324161; sc-27992; sc-11436; sc-23982; sc-49162; sc-50466; sc-507) и вторичными антителами (разведение 1:5000; 1 ч;  $4^{\circ}\text{C}$ ; sc-2030; sc-2768), конъюгированными с пероксидазой хрена. Детектирование белков осуществляли в реакции с ECL-реагентами (Pierce Biotechnology, Inc., США) на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop. О содержании искомым белков судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы «Statistica 6,0» с использованием критерия Стьюдента и непараметрического рангового U-критерия Уилкоксона (Уилкоксона—Манна—Уитни). Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Базовый уровень экспрессии тестируемых каталитических субъединиц митохондриальных ферментов КГМ был выше на 20—40% у ВУ крыс, что свидетельствует о большей структурно-функциональной мощности митохондриального аппарата у толерантных к гипоксии особей. Курсовые инъекции мексидола сопровождалась индукцией каталитических субъединиц дыхательных ферментов и АТФ-синтазы, особенно выраженной у НУ особей. Наиболее продолжительной и значительной была индукция субъединиц субстрат-

ного участка дыхательной цепи (NDUФV2, SDHA) в КГМ НУ крыс: уровень экспрессии SDHA увеличивался на 30% уже после 3-го введения мексидола и продолжал повышаться в ходе курса инъекций; увеличение содержания NDUФV2 достигало 30% к концу курса (рис. 1). В КГМ ВУ крыс увеличение уровня экспрессии отмечалось только для NDUФV2 и не превышало 20% после 20-й инъекции (рис. 1). Паттерн экспрессии cyt b и АТP5А отличался от динамики уровня NDUФV2 и SDHA в КГМ НУ крыс: выраженная ранняя индукция (60% и 30% соответственно) на протяжении первых 3 сут. курса сменялась умеренно и устойчиво повышенным на протяжении курса уровнем экспрессии (рис. 2). У ВУ крыс наблюдали только значимое увеличение экспрессии cyt b (рис. 2). Индукция COX1 в КГМ НУ крыс была наименее выраженной и продолжительной (не более 3 сут. курса) и отсутствовала у ВУ (рис. 2). Данные позволяют заключить, что сукцинатсодержащий препарат мексидол при курсовом применении индуцирует экспрессию каталитических субъединиц дыхательных ферментов и АТФ-синтазы в КГМ, оптимизирует структурно-функциональное состояние субстратного, электронтранспортного участков дыхательной цепи и сопрягающей системы митохондрий, т.е. обладает не только прямым энерготропным действием, окисляясь в дыхательной цепи, но и проявляет регуляторное влияние на структуру и активность митохондриального аппарата.

Выявленный регуляторный аспект активности мексидола может опосредоваться сукцинатным рецептором SUCNR1. Действительно, при курсовом применении мексидола в КГМ НУ и ВУ крыс была обнаружена индукция SUCNR1, достигающая максимальных значений (50% в КГМ НУ, 35% — ВУ крыс) через 3 сут. инъекций, сменяющаяся постепенной нормализацией в ходе курса (рис. 3). Подобный эффект индукции рецептора сукцинатом был показан ранее [9]. В ткани мозга индукция и активация SUCNR1 сукцинатом сопровождалась сопряженным увеличением экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Этот эффект наблюдали *in vitro* и *in vivo*, при ишемии и в условиях физиологической нормы как базовый механизм васкуляризации ткани мозга [4, 10]. В проведенном исследовании мы также наблюдали сопряженную индукцию SUCNR1 и VEGF, достигающую максимальных значений после 3-х и 8-х сут. курса (рис. 3). В этот период отмечали значимое увеличение общей резистентности крыс к гипоксии: продолжительность переживания условий острой гипобарической гипоксии увеличивалась в 2,5 раза у НУ крыс и в 1,5 раза у ВУ.

Исследование впервые показало, что сукцинатсодержащий препарат мексидол вовлекается в механизмы индукции ферментов дыхательной цепи и сопрягающей сис-

темы (АТФ-синтаза) митохондрий КГМ. Одним из возможных механизмов, ответственных за реализацию этого митохондриотропного эффекта, может быть активация сукцинатного рецептора SUCNR1 (GPR91). Хорошо известно, что рецептор причастен к пролиферативным эффектам сукцината. Есть сообщения о SUCNR1-зависимой пролиферации гемопоэтических прогениторных клеток [11], эндотелиоцитов [4], звездчатых клеток печени [12]. Сукцинат/SUCNR1 активируют миграцию макрофагов, микроглии [13], мезенхимальных клеток [14], стимулируют сократительную активность кардиомиоцитов [15]. При этом SUCNR1 инициирует сигнальные пути, причастные к индукции митохондриогенеза [16, 17]. Несмотря на множественные свидетельства вовлеченности сукцината/SUCNR1 в сигнальные механизмы регуляции митохондриального гомеостаза до настоящего времени отсутствуют исследования влияния сукцината на биогенез митохондрий.

Согласно общепринятому представлению, сукцинат, продуцируемый митохондриями, аккумулируется в условиях гипоксии/ишемии, высвобождается в экстрацеллюлярное пространство и активирует SUCNR1 — молекулярный сенсор уровня янтарной кислоты, локального энергетического дисбаланса и/или дисфункции митохондрий [16]. При активации рецептор инициирует механизмы обратной связи, направленные на восстановление энергетического баланса и функциональной активности ткани. В настоящее время накоплены данные, подтверждающие вовлеченность сукцината/SUCNR1 в регуляцию морфологии и динамики митохондрий. Показано, что фрагментация (fission) и функциональная активация митохондрий определяются именно сукцинатной стимуляцией SUCNR1 [14, 18]. Таким образом, митохондрия является мишенью сукцинат/SUCNR1 сигнализации. Известно, что инициируемые сукцинатным рецептором сигнальные каскады включаются в механизмы активации PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ) — главного координатора митохондриогенеза у млекопитающих [17]. Тем не менее, нельзя исключать и другие, SUCNR1-независимые механизмы индукции митохондриальных ферментов сукцинатом. Действительно, янтарная кислота медирует изменение нейротрансмиттерного баланса в мозге, способствует секреции катехоламинов, которые являются индукторами митохондриогенеза [19, 20]. Таким образом, механизм митохондриотропного действия мексидола требует детального изучения.

В целом, проведенное исследование впервые выявило вовлеченность сукцинатсодержащего препарата мексидол в механизмы индукции ферментов энергопродуцирующей системы митохондрий, что существенно расширяет сложившиеся представления о механизмах его энерготропного действия.

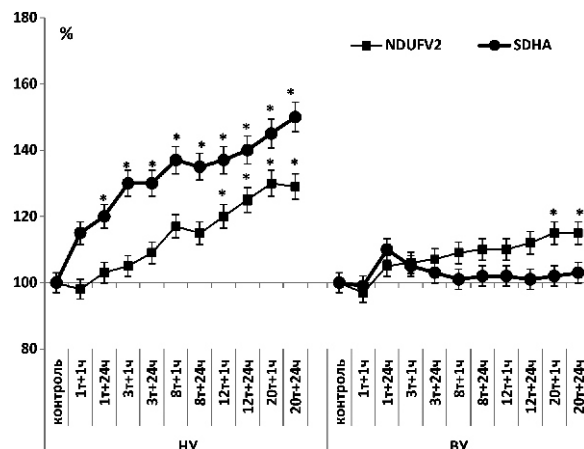


Рис. 1. Динамика уровня экспрессии NDUVF2 и SDHA в КГМ НУ и ВУ крыс при курсовом применении мексидола (40 мг/кг, внутривенно). По оси ординат представлены данные (% от контроля). По оси абсцисс отмечены дни курса, когда производился забор ткани КГМ (через 1 ч и 24 ч после инъекции). \* — данные статистически значимо отличаются от контроля ( $p < 0,01$ ).

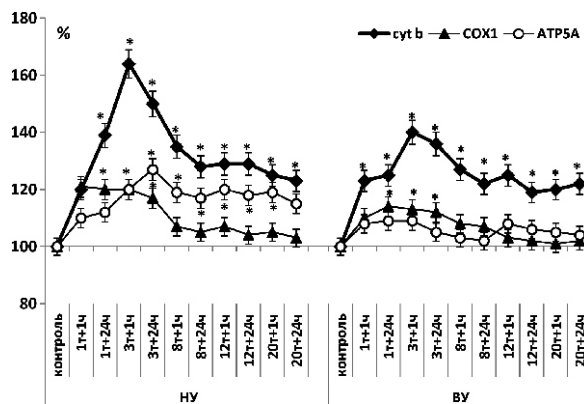


Рис. 2. Динамика уровня экспрессии cytb, COX1 и ATP5A в КГМ НУ и ВУ крыс при курсовом применении мексидола (40 мг/кг, внутривенно). По оси ординат представлены данные (% от контроля). По оси абсцисс отмечены дни курса, когда производился забор ткани КГМ (через 1 ч и 24 ч после инъекции). \* — данные статистически значимо отличаются от контроля ( $p < 0,01$ ).

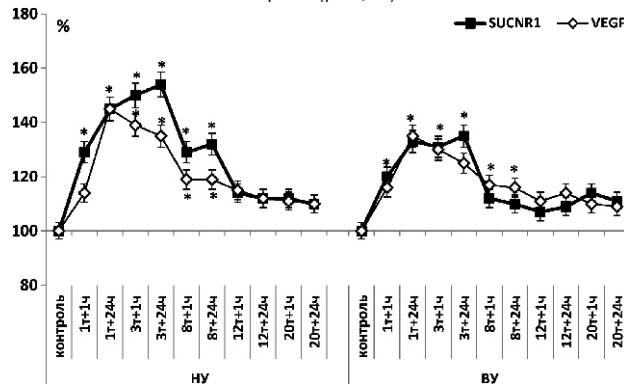


Рис. 3. Динамика уровня экспрессии SUCNR1 и VEGF в КГМ НУ и ВУ крыс при курсовом применении мексидола (40 мг/кг, внутривенно). По оси ординат представлены данные (% от контроля). По оси абсцисс отмечены дни курса, когда производился забор ткани КГМ (через 1 ч и 24 ч после инъекции). \* — данные статистически значимо отличаются от контроля ( $p < 0,01$ ).

**Литература**  
(п.п. 4; 8—19 см. References)

1. Дамулин И.В., Екушева Е.В. Клиническое значение феномена нейропластичности при ишемическом инсульте. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2016; 10(1): 57-64.
2. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Ноотропные препараты, достижения и новые проблемы. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 1998; 61(4): 3-9.
3. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2011; 1: 2-18.
5. Шахмарданова С.А., Гулевская О.Н., Хананашвили Я.А., Зеленская А.В., Нefeldов Д.А., Галенко-Ярошевский П.А. Препараты янтарной и фумаровой кислот как средства профилактики и терапии различных заболеваний. *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2016; 3: 16-30.
6. Воронина Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов. *Журнал неврологии и психиатрии*. 2012; 12: 286-90.
7. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического preconditionирования: роль гипоксического периода и реоксигенации. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 147(4): 380-4.
20. Маевский Е.И., Розенфельд А.С., Гришина Е.В., Кондрашова М.Н. *Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий*. Пушино: Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 2001.

**References**

1. Damulin I.V., Ekusheva E.V. The clinical significance of the phenomenon of neuroplasticity in ischemic stroke. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2016; 10(1): 57-64. (In Russian)
2. Voronina T.A., Seredenin S.B. Nootropic drugs, achievements and new problems. *Experimental'naya i klinicheskaya farmakologiya [Experimental and Clinical Pharmacology]*. 1998; 61(4): 3-9. (In Russian)
3. Lukyanova L.D. Modern problems of adaptation to hypoxia. Signaling mechanisms and their role in systemic regulation. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimental'naya terapiya [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2011; 1: 2-18. (In Russian)
4. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., Roy O., Honore J.-C., Noueihed B., et al. G-Protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34: 285-93.
5. Shahmardanova S.A., Gulevskaja O.N., Hananashvili Ja.A., Zelenskaja A.V., Nefeldov D.A., Galenko-Jaroshevskij P.A. Preparations of succinic and fumaric acids as a means of prevention and treatment of various diseases. *Zhurnal fundamental'noy meditsiny i biologii [Journal of Fundamental Medicine and Biology]*. 2016; 3: 16-30. (In Russian)

6. Voronina T.A. Mexidol: a spectrum of pharmacological effects. *Zhurnal neurologii i psikiatrii [Journal of Neurology and Psychiatry]*. 2012; 12: 286-90. (In Russian)
7. Lukyanova L.D., Germanova Je.L., Kopaladze R.A. Regularities of the formation of the organism's resistance under different modes of hypoxic preconditioning: the role of the hypoxic period and reoxygenation. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny [Bulletin of experimental biology and medicine]*. 2009; 147(4): 380-4. (In Russian)
8. Zhang X., Huang C.J., Nazarian R., Ritchie T., de Vellis J.S., Noble E.P. Isolation of nuclear protein from human brain. *Bio Techniques*. 1997; 22(5): 848-50.
9. He W., Miao F. J.-P., Lin D. C.-H., Schwandner R.T., Wang Z., Gao J., et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2004; 429(13): 188-93.
10. Sapieha P. Eyeing central neurons in vascular growth and reparative angiogenesis. *Blood*. 2012; 120(11): 2182-94.
11. Hakak Y., Lehmann-Bruinsma K., Phillips S., Le T., Liaw C., Connolly D.T., Behan D.P. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol*. 2009; 85(5): 837-43.
12. Correa P.R., Kruglov E.A., Thompson M., Leite M.F., Dranoff J.A., Nathanson M.H. Succinate is a paracrine signal for liver damage. *J Hepatol*. 2007; 47(2): 262-9.
13. Diepen J.A., Robben J.H., Hooiveld G.J., Carmone C., Alsady M., Boutens L., et al. SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes. *Diabetologia*. 2017; 60: 1304-13.
14. Ko S.H., Choi G.E., Oh J.Y., Lee H.J., Kim J.S., Chae C.W., et al. Succinate promotes stem cell migration through the GPR91-dependent regulation of DRP1-mediated mitochondrial fission. *Scientific reports*. 2017; 7: 12582.
15. Aguiar C.J., Andrade V.L., Gomes E.R., Alves M.N., Ladeira M.S., Pinheiro A.C., et al. Succinate modulates Ca(2+) transient and cardiomyocyte viability through PKA-dependent pathway. *Cell Calcium*. 2010; (47)1: 37-46.
16. Ariza A.C., Deen P.M.T., Robben J.H. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Frontiers in Endocrinology. Molecular and Structural Endocrinology*. 2012; 3: 1-8.
17. Arciuch V.G.A., Elguero M.E., Poderoso J.J., Carreras M.C. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid. Redox Signal*. 2012; 16(10): 1150-80.
18. Lu Y.-T., Li L.-Z., Yang Y.-L., Yin X., Liu Q., Zhang L., et al. Succinate induces aberrant mitochondrial fission in cardiomyocytes through GPR91 signaling. *Cell Death and Disease*. 2018; 9: 672-86.
19. Calabresi P., Gubellini P., Picconi B., Centonze D., Pisani A., Bonsi P., et al. Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *The Journal of Neuroscience*. 2001; 21(14): 5110-20.
20. Maevskij E.I., Rozenfel'd A.S., Grishina E.V., Kondrashova M.N. *Correction of metabolic acidosis by maintaining mitochondrial functions*. Pushhino: Institut teoreticheskoy i eksperimental'noy biofiziki RAN. Pushhino: Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS. 2001. (In Russian)

**Сведения об авторах:**

Кирова Юлия Игоревна, доктор, биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИОПП, e-mail: bioenergy@mail.ru;

Германова Элита Леонидовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: elgerm@mail.ru



Максимова М.Ю.<sup>1</sup>, Булгакова П.О.<sup>2</sup>, Иванов А.В.<sup>2</sup>, Вирюс Э.Д.<sup>2</sup>, Александрин В.В.<sup>2</sup>,  
Никифорова К.А.<sup>2</sup>, Охтова Ф.Р.<sup>3</sup>, Суанова Е.Т.<sup>3</sup>, Пирадов М.А.<sup>1</sup>, Кубатиев А.А.<sup>2</sup>

## Низкомолекулярные аминотиолы плазмы крови в остром периоде ишемического инсульта

<sup>1</sup> Научный центр неврологии, 125367, г. Москва, Россия, Волоколамское ш., д. 80

<sup>2</sup> Отделение молекулярной и клеточной патофизиологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>3</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет им. Евдокимова, 127473, г. Москва, Россия, Делегатская ул., д. 20/1

**Цель:** оценить гомеостаз низкомолекулярных аминотиолов (цистеина, цистеинил-глицина, гомоцистеина и глутатиона) в плазме крови в остром периоде ишемического инсульта. **Методика.** Обследован 41 пациент с атеротромботическим и кардиогенным эмболическим инсультом. 31 пациент с хронической ишемией головного мозга был включен в контрольную группу. Общий уровень низкомолекулярных аминотиолов и уровни их восстановленных форм определяли в 1-е, 3-и, 7-е и 15-е сут. инсульта. **Результаты.** Уровни восстановленных форм цистеина и цистеинил-глицина у больных с инсультом были снижены в 1-е—7-е сут. инсульта. Наблюдалось раннее повышение общего содержания глутатиона и цистеина, носящее, по всей видимости, адаптивный характер. Различий между уровнями низкомолекулярных аминотиолов у пациентов с атеротромботическим и кардиогенным подтипами инсульта выявлено не было. Анализ логистической регрессии показал, что исходные уровни восстановленного гомоцистеина, общего цистеинил-глицина и редокс-статус цистеина у пациентов являлись прогностическими факторами возникновения атеротромботического и кардиогенного эмболического инсульта с вероятностью 86,2% ( $p < 0,001$ ). **Выводы.** Уровни низкомолекулярных аминотиолов ассоциируются с тяжестью неврологических нарушений и объемом инфарктов головного мозга. Их определение может иметь диагностическое значение как в остром периоде ишемического инсульта, так и при мониторинге его течения.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт; низкомолекулярные аминотиолы; цистеин; гомоцистеин; цистеинил-глицин.

**Для цитирования:** Максимова М.Ю., Булгакова П.О., Иванов А.В., Вирюс Э.Д., Александрин В.В., Никифорова К.А., Охтова Ф.Р., Суанова Е.Т., Пирадов М.А., Кубатиев А.А. Низкомолекулярные аминотиолы плазмы крови в остром периоде ишемического инсульта. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 41—47.

DOI:

**Финансирование.** Исследование было поддержано грантом РФФИ (проект № 16-15-10340).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Булгакова Полина Олеговна, e-mail: polya.bulgakova@gmail.com

Поступила 05.10.2018

Maksimova M.Y.<sup>1</sup>, Bulgakova P.O.<sup>2</sup>, Ivanov A.V.<sup>2</sup>, Virus E.D.<sup>2</sup>, Alexandrin V.V.<sup>2</sup>,  
Nikiforova K.A.<sup>2</sup>, Ochtova F.R.<sup>3</sup>, Suanova E.T.<sup>3</sup>, Piradov M.A.<sup>1</sup>, Kubatiev A.A.<sup>2</sup>

## Plasma low molecular weight aminothiols in patients with acute ischemic stroke

<sup>1</sup> Research Center of Neurology, Volokolamskoe Shosse 80, Moscow 125367, Russia

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

<sup>3</sup> A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1 Delegatskaya Str. 20/1, Moscow 127473, Russia

**Objectives:** To evaluate homeostatic disorders of plasma low molecular weight aminothiols (LMWTs: cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione) during acute and early subacute stages of ischemic stroke. **Patients and Methods:** 41 patients with primary large-artery atherosclerosis and cardioembolic stroke were admitted within the first 6-24 h of the onset of neurologic symptoms. The control group included 31 patients with chronic cerebral ischemia. Concentrations of total LMWTs and their reduced forms were measured on days 1, 3, 7, and 15 after stroke. **Results and Discussion:** Concentrations of cysteine and cysteinylglycine reduced forms were decreased in patients with stroke on days 1-7. Also, early adaptive increases in total glutathione and cysteine levels were observed. LMWT concentrations did not differ between stroke subtypes. The analysis of logistic regression indicated that concentrations of reduced homocysteine and total

cysteinylglycine and the redox status of cysteine at admission were predictive factors for development of ischemic stroke with a probability of 86.2% ( $p < 0.001$ ). **Conclusion:** Concentrations of LMWTs may indicate the severity of neurological deficit and the size of cerebral infarct. Measuring these concentrations can be diagnostically important both at an early stage of ischemic stroke and during stroke monitoring.

**Keywords:** ischemic stroke; low molecular weight aminothiols; cysteine; homocysteine; cysteinylglycine.

**For citation:** Maksimova M.Y., Bulgakova P.O., Ivanov A.V., Virus E.D., Alexandrin V.V., Nikiforova K.A., Ochtova F.R., Suanova E.T., Piradov M.A., Kubatiev A.A. Plasma low molecular weight aminothiols in patients with acute ischemic stroke. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 41—47. (In Russian).

**DOI:**

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

**Funding.** This work was supported by the Russian Science Foundation [project No. 16-15-10340].

#### Information about authors:

Maksimova M.Y., <https://orcid.org/0000-0002-7682-6672>

Nikiforova K.A., <https://orcid.org/0000-0002-4119-7175>

Alexandrin V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4625-6522>

Bulgakova P.O., <https://orcid.org/0000-0001-5438-1046>

Ivanov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2424-6115>

Virus E.D., <http://orcid.org/0000-0001-9371-6494>

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Piradov M.A. <http://orcid.org/0000-0002-6338-0392>

Suanova E.T. <http://orcid.org/0000-0002-1405-5235>

**For corresponding:** Bulgakova P.O., e-mail: [polya.bulgakova@gmail.com](mailto:polya.bulgakova@gmail.com)

**Received** 05.10.2018

## Введение

Инсульт является важнейшей медико-социальной проблемой не только в Российской Федерации, но и во многих других экономически развитых странах. Это обусловлено, прежде всего, его высокой долей в структуре заболеваемости и смертности населения, значительными показателями временных трудовых потерь и первичной инвалидизации [1, 2].

Установлено, что в основе окислительного стресса при ишемии мозга лежит резкое усиление окислительных процессов при недостаточности системы антиоксидантной защиты. Это приводит к накоплению свободнорадикальных соединений и метаболитов кислорода, оказывающих повреждающее действие на мозг [3]. Ишемия мозга также вызывает системный окислительный стресс, связанный с воспалительной реакцией периферических артерий. В результате, активность вазоконстрикторов в плазме крови повышается из-за массивного выделения активных форм кислорода (АФК) и цитокинов [4], что способствует гипертоническому состоянию и отрицательно влияет на течение инсульта и функциональный прогноз [5].

НМАТ (цистеин [Цис], глутатион [Глн], цистеинил-глицин [ЦисГли], гомоцистеин [Гдис]) и другие являются важными компонентами системы антиоксидантной защиты. Они находятся в состоянии динамического равновесия между окисленными и восстановленными ( $\nu$ ) формами. В плазме крови преобладают

дисульфидные формы; восстановленные формы составляют всего 1—5% [6]. Отношение восстановленных форм к общему содержанию каждого тиола характеризуется редокс статусом (РС).

Клинические исследования указывают на продолжительный дисбаланс РС тиолов у пациентов, перенесших острый ишемический инсульт [7]. Мониторинг окислительного стресса и антиоксидантная терапия могут быть обоснованным выбором для лечения пациентов, перенесших инсульт, а коррекция РС НМАТ у пациентов с острым инсультом может улучшить прогноз и восстановление нарушенных функций [7, 8].

*Цель исследования* — оценка нарушений гомеостаза НМАТ в плазме крови у пациентов с ишемическим инсультом.

## Методика

*Характеристика клинического исследования.* Исследование выполнено в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и на основании письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. В основную группу больных с диагнозом *первичный ишемический инсульт* был включен 41 пациент в возрасте 59—78 лет. Диагноз был основан на клинических данных и результатах магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного

мозга с использованием режима диффузионно-взвешенных изображений, а также дуплексного сканирования артерий головного мозга и трансторакальной эхокардиографии.

Основные критерии включения пациентов в основную группу: атеротромботический и кардиогенный эмболический инсульт в соответствии с международными критериями TOAST [9], госпитализация в течение первых 24 ч с момента появления неврологических нарушений; возраст 45—80 лет; наличие информированного согласия, подписанное пациентом или его родственниками по первой линии. Критерии исключения: лакунарный инсульт; криптогенный инсульт; геморрагический инсульт; эпилепсия; беременность; сахарный диабет 1 типа; острый инфаркт миокарда; постоянная кардиостимуляция; декомпенсированная почечная, печеночная или дыхательная недостаточность; хроническая сердечная недостаточность III—IV функционального класса; онкологические заболевания; хронические воспалительные, аутоиммунные и гематологические нарушения; инфекционные осложнения в течение 15 сут. после инсульта.

В контрольную группу был включен 31 пациент в возрасте 60—75 лет с диагнозом хроническая ишемия головного мозга. Все обследованные пациенты не имели в анамнезе инфаркта мозга и геморрагического инсульта.

Информация о сопутствующих заболеваниях (артериальная гипертония, сахарный диабет 2-го типа, сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, пороки сердца, фибрилляция предсердий) была основана на клинических данных.

Тяжесть неврологических нарушений оценивалась по шкале инсульта Национальных институтов здравоохранения США (NIHSS) [10]. Деятельность пациента в повседневной жизни определялась с помощью индекса Бартела (BI) [11]. Оценка функционального восстановления проводилась с использованием модифицированной шкалы Ранкина (mRs) 15-е сут. ишемического инсульта. Благоприятный функциональный прогноз соответствовал оценке по mRs  $\leq 2$  баллов. Оценка по mRs  $> 2$  баллов свидетельствовала о неблагоприятном функциональном прогнозе [12].

Характер и локализация очаговых изменений мозга устанавливались с использованием МРТ в режимах T1- и T2-взвешенных изображений, FLAIR и диффузионно-взвешенных изображений (DWI) на оборудовании Magnetom Verio 3.0 T (Siemens, Германия).

Всем пациентам с ишемическим инсультом проводилась гипотензивная, антиромбоцитарная (ацетилсалициловая кислота) и антикоагулянтная (в случаях фибрилляции предсердий) терапия.

*Измерение уровня низкомолекулярных аминокислот.* Венозную кровь собирали в пробирки, содержащие цитрат натрия (3,2% натрия с конечным отношением объемов 1:9), и центрифугировали при 3000 x g в течение 3 мин. Плазму для общего анализа НМАТ замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  и хранили до начала исследования. Для анализа восстановленных низкомолекулярных аминокислот плазму (100 мкл) сразу после ее выделения добавляли к 25 мкл раствора дигидрата 5-сульфосалициловой кислоты (230 г/л). Образцы тщательно перемешивали, замораживали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Общий уровень НМАТ определяли с использованием метода жидкостной хроматографии как описано в работе [13]. Уровни восстановленных тиолов измеряли, как описано ранее [14].

*Статистический анализ.* Статистический анализ проводили с использованием IBM SPSS 20.0. Так как основные переменные не имели нормального распределения, данные представлены в виде медианы, 25% и 75% квартилей. Различия между группами проверяли на статистическую значимость с использованием теста Манна—Уитни для двух групп либо анализа тренда и критерия Крускала—Уоллиса более чем для 2-х групп. Анализ динамики в группах осуществляли при помощи критерия Уилкоксона и дисперсионного анализа Фридмана. Для выявления диагностической значимости биохимических показателей была использована логистическая регрессия (0 — отсутствие ишемического инсульта, 1 — наличие ишемического инсульта), включая контрольную группу. Для расчета вероятности возникновения события (ишемического инсульта) для конкретного случая вычисляли значения следующих параметров: чувствительность, специфичность, прогностическое значение положительного результата, прогностическое значение отрицательного результата и точность прогноза. При  $p < 0,05$  различия считались статистически достоверными.

## Результаты и обсуждение

*Характеристика пациентов.* Согласно основным данным о пациентах (табл. 1), существенных различий в факторах риска не выявлено. По данным DWI скорость увеличения области ишемии за первые 3 сут. инсульта составила 61%. Площадь инфаркта мозга на 3-и сут. инсульта увеличилась на 7,6%. В 15-е сут. медиана площади инфаркта составила 243 мм<sup>2</sup> (139; 503). Статистически значимых различий в размерах инфаркта между 1-и и 15-и сут. ( $p = 0,16$ ) не выявлено.

*Уровни НМАТ в плазме крови.* Медианы общего содержания (о), восстановленной фракции (в), и РС

НМАТ в плазме крови у пациентов с ишемическим инсультом в сравнении с контрольной группой представлены в табл. 2. Как показано в табл. 2, *оЦисГли* и *оГцис* изменяются незначительно в 1-е сут. ишемического инсульта. Уровни *оЦис* в 1-е и 3-и сут. инсульта, и уровни *оГлн*, полученные на 3-и и 7-е сут.

инсульта, оказались выше по сравнению с их содержанием в контрольной группе.

Было обнаружено, что уровни *вЦис* с 1-х по 7-е — 15-е сут. ишемического инсульта и *вЦисГли* с 1-х по 7-е сут. были ниже, чем в контрольной группе. Так уровень *вЦис* статистически значимо снижался

Таблица 1

Характеристика пациентов

Показатели	Ишемический инсульт (n = 41)	Контроль (n = 31)
Возраст, лет	71,5 (59,0;78,0)	69,0 (60,0;75,0)
Пол, м/ж (%)	15/26 (37/63)	12/19 (38,7/61,2)
Атеротромботический инсульт, n (%)	18 (44%)	
Кардиогенный эмболический инсульт, n (%)	23 (56%)	
Суммарный балл по шкале NIHSS:		
<7 баллов; n (%)	7,5 (4; 17)	
7—13 баллов; n (%)	15 (37%)	
>14 баллов; n (%)	14 (34%)	
	<b>12 (29%)</b>	
Индекс Бартел при поступлении	70 (20; 95)	
Оценка по шкале mRS при поступлении	3 (1,0;4,0)	
Площадь инфаркта мозга, мм <sup>2</sup>	459 (178; 1454)	
Факторы риска:		
Артериальная гипертония, n (%)	36 (88%)	31 (100%)
Сахарный диабет 2 типа, n (%)	9 (22%)	5 (16%)
Гиперлипидемия, n (%)	12 (29%)	8 (26%)
Сердечная недостаточность, n (%)	28 (68%)	
Фибрилляция предсердий, n (%)	23 (56%)	
Курение, n (%)	19 (46%)	12 (39%)
Чрезмерное употребление алкоголя, n (%)	9 (22%)	6 (19%)
Ожирение, n (%)	11 (27%)	7 (23%)

Таблица 2

Низкомолекулярные аминокислоты плазмы крови (мкМ) и их редокс статус (%) у пациентов с ишемическим инсультом и хронической ишемией мозга (тест Манна-Уитни)

НМАТ	Контроль	1 сутки	3 сутки	7 сутки	15 сутки
оЦис	267	311*	317**	289	249
вЦис	6,30	4,80**	3,8***	4,45***	5,05**
РСЦис	2,50	1,60***	1,2***	1,7**	1,65
оЦисГли	28,90	24,75	30,95	29,20	29,15
вЦисГли	0,79	0,53***	0,43***	0,52**	0,58
РСЦисГли	2,60	1,85**	1,5***	1,7**	2,05
оГлн	3,10	3,60*	4,15*	3,8*	3,65
вГлн	0,24	0,26	0,27	0,40	0,32
РСГлн	8,40	6,30	7,75	6,10	11,85
оГцис	13,00	15,40	14,35	12,70	11,95
вГцис	0,14	0,16	0,13	0,11	0,16
РСГцис	1,10	1,05	1,00	0,85	1,30

Примечание. \* 0,01<p<0,05, \*\* 0,001<p<0,01, \*\*\* p<0,001.

с 4,8 мкМ до 3,8 мкМ в течение первых 3 сут. после инсульта и возвращался к первоначальному значению 7-е — 15-е сут. инсульта.

Статистически значимых различий в уровнях НМАТ у пациентов с атеротромботическим и кардиогенным эмболическим инсультом выявлено не было. Не обнаружено также взаимосвязи между уровнями НМАТ и показателями шкалы NIHSS, BI и mRs, PC Гцис у пациентов с неврологическим дефицитом тяжелой степени (NIHSS >14) статистически значимо повышался на 1-е и 3-и сут. инсульта. В то же время изменения  $v_{\text{Гцис}}$  носили противоположный характер в группах пациентов неврологическими нарушениями средней степени тяжести. На 3-и сут. ишемического инсульта у больных с NIHSS = 7—13 медиана  $v_{\text{Гцис}}$  составляла 0,08 мкМ, в то время как у пациентов с NIHSS >14 этот показатель был выше — 0,14 мкМ ( $p = 0,026$ ). Кроме того, на 3-и сут. медиана PC Глн у пациентов с NIHSS >14 была в 2 раза выше, чем у пациентов с NIHSS = 7—13 (14,2% против 5,2%,  $p = 0,034$ ). Анализируя возможную связь размера инфаркта головного мозга с уровнями НМАТ, было обнаружено, что уровень  $o_{\text{Гцис}}$  на 1-е сут. инсульта у пациентов с большой площадью инфаркта был существенно выше, чем у пациентов с средней величиной инфаркта (20,4 [15,3—31,0] и 11,8 [10,9—16,6] мкМ соответственно,  $p = 0,015$ ). Сходные результаты были получены при анализе  $o_{\text{Цис}}$  на 3-и сут. инсульта. В группе пациентов с инфарктом небольшой площади данный показатель составил 292,5 (267,8—332,3) мкМ, а в группе с большим инфарктом он составил 355,0 (320,5—439,3) мкМ ( $p = 0,016$ ).

Использование анализа логистической регрессии и статистики Вальда позволило выявить 3 показателя ( $v_{\text{Гцис}}$ ,  $o_{\text{ЦисГли}}$  и PC Цис), которые с наибольшей чувствительностью и специфичностью отличаются от контроля группу больных в 1-е сут. ишемического инсульта. Соответствующие результаты представлены в табл. 3. Диагностическая чувствительность и специфичность составили 85,3% (68,9%; 95,1%) и 87,1% (70,2%; 96,4%), соответственно. Прогностическое значение положительного и отрицательного результата составили 87,9% (71,8%; 96,6%) и 84,4% (67,2%; 94,7), соответственно. Точность

прогноза составила 86,2% (75,3%; 93,5%); статистическая значимость модели <0,001.

Ишемический инсульт вызывает не только локальный окислительный стресс, но и активацию системных механизмов, оказывающих влияние на значительную интенсификацию продукции АФК и их поступление в периферический кровоток [15]. В этом контексте данные о влиянии ишемии мозга на тиол/дисульфидные системы, а также исследования о повреждающем и защитном действии на мозг НМАТ имеют противоречивый характер. Данные о возможной взаимосвязи между уровнями тиолов и тяжести неврологических нарушений по шкале NIHSS также противоречивы: так, в работе [16] эта ассоциация была обнаружена, однако в другом исследовании не была подтверждена [8].

Показано [17], что уровень восстановленных тиолов в сыворотке крови был значительно ниже у пациентов с ишемическим инсультом, чем в контрольной группе. Также уровень восстановленных тиолов на 7-е сут. инсульта у пациентов с атеростенозом экстракраниальных артерий был значительно ниже, чем у пациентов с патологией малых сосудов. Данные результаты указывают на определенную связь между уровнем SH-групп и подтипом инсульта. В работе было отмечено, что данный показатель в остром периоде ишемического инсульта ассоциируется с неблагоприятным прогнозом [17]. Уровни тиолов в сыворотке крови, полученные в этом исследовании, составляли около 1 мкМ или менее. Как правило, этот показатель составляет более чем 200—300 мкМ [18].

Что же касается непосредственно НМАТ, то согласно нескольким исследователям, повышение уровня  $o_{\text{Глн}}$  в сыворотке крови происходит после инсульта в течение 48 ч, что является адаптивным ответом на окислительный стресс [3, 19]. Наши данные о повышении  $o_{\text{Глн}}$  на 3-и и 7-е сут. ишемического инсульта согласуются с ранее полученными результатами. Увеличение уровня  $o_{\text{Цис}}$  (как предшественника и скорость-лимитирующего субстрата синтеза Глн) на 1-е и 3-и сут., возможно, связано с активацией антиоксидантной защиты при ишемическом инсульте.

Мы наблюдали уменьшение  $v_{\text{Цис}}$  и  $v_{\text{ЦисГли}}$  при остром ишемическом инсульте. Эти данные указывают на возможность использования их в качестве диа-

Таблица 3

Предикторы возникновения ишемического инсульта

		Предсказанные		% корректных
		Контроль	Ишемический инсульт	
Предсказанные	Контроль	27	4	87,1
	Ишемический инсульт	5	29	85,3
Общий %				86,2

гностических индикаторов в остром периоде ишемического инсульта (1-е — 7-е сут.), в отличие от общего содержания восстановленных тиолов в плазме крови. В то же время анализ НМАТ в плазме крови у пациентов через 1—2 нед. после ишемического инсульта показал повышенный уровень их восстановленных форм по сравнению с контрольной группой.

Полученные результаты свидетельствуют, что показатели  $v_{\text{Гцис}}$  и его РС были выше у пациентов с тяжелыми неврологическими нарушениями, по сравнению с пациентами со средним уровнем неврологического дефицита, что свидетельствует о том, что эти индикаторы могут отражать степень тяжести инсульта. Тяжелый инсульт ассоциируется также с более высоким РС Глн.

Таким образом, настоящее исследование продемонстрировало характер изменений уровней НМАТ при ишемическом инсульте. Уровни НМАТ ассоциируются со степенью тяжести неврологических нарушений и величиной инфаркта головного мозга. Их определение может иметь диагностическое значение как в острейшем периоде ишемического инсульта, так и при мониторинге его течения. Анализ логистической регрессии показал, что уровни  $v_{\text{Гцис}}$ ,  $o_{\text{ЦисГли}}$  и РС Цис у пациентов при поступлении являются прогностическими факторами возникновения инсульта с вероятностью 86% ( $p < 0,001$ ).

### Литература

(п.п. 3; 5—19 см. References)

1. Суслина З.А., Гулевская Т.С., Максимова М.Ю., Моргунов В.А. *Нарушения мозгового кровообращения: диагностика, лечение, профилактика*. М.; МЕДпресс-информ, 2016.

2. Марков Х.М. Мозговой кровотока и церебральный инсульт. Часть 2. Патогенез и терапия церебрального инсульта. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 57(2): 65-76.

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

### References

1. Suslina Z.A., Gulevskaja T.S., Maksimova M.Ju., Morgunov V.A. Disorders of cerebral circulation: diagnosis, treatment, prevention [*Narusheniya mozgovogo krovoobrasheniya: diagnostika, lechenie, profilaktika*]. Moscow: MEDpress-inform; 2016. (in Russian)

2. Markov Kh.M. Brain blood flow and cerebral insult. Part 2. Cerebral insult pathogenesis and therapy. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2013; 57(2): 65-76. (in Russian)

3. Ozkul A., Akyol A., Yenisey C., Arpacı E., Kiyiloglu N., Tataroglu C. Oxidative stress in acute ischemic stroke. *J. Clin. Neurosci.* 2007; 14(11): 1062-1066, doi: 10.1016/j.jocn.2006.11.008.

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

5. Varon J. Diagnosis and management of labile blood pressure during acute cerebrovascular accidents and other hypertensive crises. *Am. J. Emerg. Med.* 2007; 25(8): 949-959, doi: 10.1016/j.ajem.2007.02.032.

6. Mudd S.H., Finkelstein J.D., Refsum H., Ueland P.M., Malinow M.R., Lentz S.R. et al. Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20(7): 1704-1706. PMID: 10894806.

7. Manolescu B.N., Berteanu M., Oprea E., Chiriac N., Dumitru L., Vladoiu S. et al. Dynamic of oxidative and nitrosative stress markers during the convalescent period of stroke patients undergoing rehabilitation. *Ann. Clin. Biochem.* 2011; 48:338-343, doi: 10.1258/acb.2011.010243.

8. Musumeci M., Sotgiu S., Persichilli S., Arru G., Angeletti S., Fois M.L. et al. Role of SH levels and markers of immune response in the stroke. *Dis. Markers.* 2013; 35(3): 141-147, doi: 10.1155/2013/246205.

9. Adams H.P.Jr., Bendixen B.H., Kappelle L.J., Biller J., Love B.B., Gordon D.L. et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993; 24(1) 35-41. PMID: 7678184.

10. Brott T., Adams H.P.Jr., Olinger C.P., Marler J.R., Barsan W.G., Biller J. et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke.* 1989; 20(7): 864-870. PMID: 2749846.

11. Mahoney F.I., Barthel D.W. Functional evaluation: The Barthel Index. *Md. State. Med. J.* 1965; 14: 61-65. PMID: 14258950.

12. Sulter G., Steen C., De Keyser J. Use of the Barthel index and modified Rankin scale in acute stroke trials. *Stroke.* 1999; 30(8) 1538-1541. PMID: 10436097.

13. Ivanov A.V., Virus E.D., Luzyanin B.P., Kubatiev A.A. Capillary electrophoresis coupled with 1,1'-thiocarbonyldiimidazole derivatization for the rapid detection of total homocysteine and cysteine in human plasma. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2015; 1004: 30-36. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.09.036.

14. Katrusiak A.E., Paterson P.G., Kamencic H. Pre-column derivatization high performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl-glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2001; 758(2): 207-212. PMID: 11486830.

15. Villalba N., Sackheim A.M., Nunez I.A., Hill-Eubanks D.C., Nelson M.T., Wellman G.C. et al. Traumatic Brain Injury Causes Endothelial Dysfunction in the Systemic Microcirculation through Arginase-1-Dependent Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *J. Neurotrauma.* 2017; 34(1): 192-203. doi:10.1089/neu.2015.4340.

16. Leinonen J.S., Ahonen J.P., Lonnrot K., Jehkonen M., Dastidar P., Molnar G. et al. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. *Stroke.* 2000; 31(1): 33-39. PMID: 10625712.

17. Tsai N.W., Chang Y.T., Huang C.R., Lin Y.J., Lin W.C., Cheng B.C. et al. Association between oxidative stress and outcome in different subtypes of acute ischemic stroke. *Biomed. Res. Int.* 2014; 256879. doi: 10.1155/2014/256879.

18. Lalwani P., de Souza G.K., de Lima D.S., Passos L.F., Boechat A.L., Lima E.S. Serum thiols as a biomarker of disease activity in lupus nephritis. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0119947. doi: 10.1371/journal.pone.0119947.

19. Zimmermann C., Winnefeld K., Streck S., Roskos M., Haberl R.L. Antioxidant status in acute stroke patients and patients at stroke risk. *Eur Neurol*. 2004; 51(3):157-61. doi:10.1159/000077662.

#### Сведения об авторах:

*Максимова Марина Юрьевна*, доктор мед. наук, проф., зав. отд-нием нарушений мозгового кровообращения Научного центра неврологии;

*Булгакова Полина Олеговна*, мл. науч. сотр. отд-ния молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

*Иванов Александр Владимирович*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. отд-ния молекулярной и клеточной ФГБНУ НИИОПП;

*Вирюс Эдуард Даниэлевич*, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. отд-ния молекулярной и клеточной ФГБНУ НИИОПП;

*Александрин Валерий Васильевич*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отделения молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

*Никифорова Ксения Александровна*, мл. науч. сотр. отд-ния молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

*Охтова Фатима Рамазановна*, канд. мед. наук, мл. науч. сотр. каф. нервных болезней стоматологического факультета Московского государственного медико-стоматологического университета им. Евдокимова;

*Суанова Е.Т.*, канд. мед. наук, мл. науч. сотр. каф. нервных болезней стоматологического факультета Московского государственного медико-стоматологического университета им. Евдокимова;

*Пирадов Михаил Александрович*, член-корреспондент РАН, доктор мед. наук, проф., директор Научного центра неврологии;

*Кубатиев Аслан Амирханович*, академик РАН, доктор мед. наук, проф., научный руководитель ФГБНУ НИИОПП.

Мензиков С.А.

## Эффект фенола на ГАМК<sub>A</sub>-сопряженную Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазу мозга крыс в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

ФГБНУ «НИИ общей патологии и патологической физиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Фенол (гидроксibenзол) является токсичным веществом. Одним из клинических признаков проявления эффекта высоких доз фенола на животных является судорожная активность, молекулярные механизмы которой остаются неясными. Цель исследования — изучение молекулярных механизмов судорожной активности при действии токсиканта (фенол) с нервно-паралитической природой действия. **Методика.** Исследована роль Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазы, которая участвует в ГАМК<sub>A</sub> рецептор-сопряженном АТФ-зависимом Cl<sup>-</sup>-транспорте через нейрональные мембраны мозга животных. **Результаты.** Исследования *in vivo* показали, что после внутривентрикулярной инъекции животным фенола (300 мг/кг) наблюдается судорожная реакция, при этом АТФазная активность мозга крыс не выявляется. В экспериментах *in vitro* установлено, что фенол (500 мкМ) полностью ингибирует функциональную активность Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазы нейрональных мембран мозга крыс. **Заключение.** Делается вывод о важной роли нейрональной Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазы в патогенезе и проявлении судорожных ответов у животных.

**Ключевые слова:** фенол; судорожная активность, Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФаза; мозг крысы.

**Для цитирования:** Мензиков С.А. Эффект фенола на ГАМК<sub>A</sub>-сопряженную Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазу мозга крыс в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 48—52. DOI:

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Для корреспонденции:** Мензиков Сергей Арсентьевич, e-mail: menzikov@mail.ru

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.10.2018

Menzikov S.A.

## Effect of penol on the GABA<sub>A</sub> receptor-coupled Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ATPase from rat brain in *in vitro/in vivo* experiments

Institute of General Pathology and Pathological Physiology, 8, Baltiyskaya st., 125315, Moscow, Russia

Phenol (hydroxybenzene) is a toxic substance with a neuroparalytic nature of action. One of the clinical signs of the manifestation of the effect high doses of phenol on animals is convulsive activity, the molecular mechanisms of which remain unclear. **Aim.** In order to clarify these mechanisms, in the present work we investigated the role of Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ATPase, which is involved in GABA<sub>A</sub> receptor-coupled ATP-dependent Cl<sup>-</sup>-transport through the plasma membranes of the neurons of animals brain. **Results.** *In vivo* studies have been shown that after intraperitoneal injection of phenol at a dose of 300 mg/kg to the animals, a convulsive reaction is observed, while the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ATPase of the rat brain is not detected. In *in vitro* experiments, it was established that phenol (500 мМ) completely inhibits the functional activity of the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ATPase of the neuronal membranes from rat brain. It was assumed the important role of neuronal Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ATPase in the pathogenesis of phenolic neurotoxicity and the manifestation of convulsive responses in animals.

**Keywords:** phenol; seizures, Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ATPase; rat brain.

**For citation:** Menzikov S.A. Effect of penol on the GABA<sub>A</sub> receptor-coupled Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ATPase from rat brain in *in vitro/in vivo* experiments. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2018; 62(4): 48—52. (in Russian). DOI:

**For correspondence:** Menzikov S.A., e-mail: s.a.menzikov@gmail.com

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

Received 15.10.2018



## Введение

Фенол (гидроксibenзол) является одним из наиболее распространенных ароматических углеводов, основная часть которого в окружающей среде имеет антропогенное происхождение [1]. Несмотря на широкое использование фенола и его продуктов в различных отраслях промышленности [1] и медицине [2, 3], его биологическое значение обычно рассматривается в контексте воздействия на окружающую среду и здоровье человека [4—7].

Фенол является токсичным веществом с нервно-паралитической природой действия [8, 9]. У млекопитающих и людей при вдыхании, проглатывании или контакте с кожей он вызывает явления острой интоксикации с клиническими признаками, не зависящими от способа попадания в организм [10—15]. Действие высоких концентраций фенола обычно объясняется его угнетающим действием на ЦНС. Одним из клинических признаков интоксикации является судорожная активность [16—18]. Однако специфические молекулярные мишени, лежащие в основе нейробиологических поведенческих реакций у животных в ответ на острую фенольную токсичность, остаются под вопросом. В частности, роль ГАМК<sub>A</sub> эргической нейрональной сигнализации в проявлении фенол-индуцируемых судорожных ответов у животных и человека до настоящего времени не установлена.

Ранее нами показано, что в плазматических мембранах мозга крыс находится Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФаза (ЕС 3.6.3.11), которая участвует в АТФ-зависимом Cl<sup>-</sup>-транспорте в нейроны [19]. Особенностью свойств этого ферментного комплекса, отличающего его от других Cl<sup>-</sup>-АТФаз/Cl<sup>-</sup>-насосов [20], является его функциональная и структурная сопряженность с ГАМК<sub>A</sub> рецепторами (ГАМК<sub>A</sub>Р) [21]. Кроме того, данная АТФаза оптимально активируется ионами Cl<sup>-</sup> и HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> при соотношении их концентраций, наблюдаемых при ГАМК<sub>A</sub>Р-индуцируемом возбуждении нейронов [22]. Цель исследования — оценка роли ГАМК<sub>A</sub>Р-сопряженной Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазы в развитии острой фенол-индуцируемой судорожной активности у крыс.

## Методика

Эксперименты выполнены на самцах крыс Wistar массой 200 ± 15 г. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Институт общей патологии и патофизиологии» (№ 01-01/147 от 12 октября 2009 г.) и проведено в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации, пересмотренной WМА, Форталеа, Бразилия, 2013.

Все животные тестировались в одно и то же время (между 10:00 и 14:00).

*Выделение плазматических мембран.* Все процедуры проводили при 4°C. После анестезии и декапитации животных, вычленивший мозг гомогенизировали (соотношение 1:8) в буферном растворе, содержащем 0,35 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА-трис, 25 мМ ХЕПЕС-Трис (рН 7,4), ингибиторы протеаз (таблетки Roche Applied Science) и центрифугировали в ультрацентрифуге Beckman (SW-28 ротор) при 10 000 × g и 4°C в течение 30 мин. Полученный супернатант центрифугировали при 100 000 × g в течение 1 ч. Полученную в осадке микросомальную фракцию плазматических мембран суспендировали в 25 мМ ХЕПЕС-Трис буфере (рН 7,4). Полученные ферментные препараты использовали для дальнейшего исследования ферментативной активности.

*Исследования in vitro.* Для определения АТФазной активности ферментный препарат (~20 мкг) вносили в 0,5 мл инкубационной среды, содержащей 25 мМ ХЕПЕС-Трис буфер (рН 7,4), 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 2 мМ АТФ-Трис, 5 мМ NaCl/25 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 50 мМ NaNO<sub>3</sub>, а при исследовании влияния фенола (500 мкМ) на Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазную активность, его прединкубировали с белком в течение 15 мин при 30°C. АТФазную реакцию начинали внесением Mg<sup>2+</sup>-АТФ в среду инкубации. Удельная АТФазная активность мембран оценивалась по приросту неорганического фосфора (Ф<sub>i</sub>) в инкубационной среде. Содержание Ф<sub>i</sub> в пробе определяли методом Чена [23], общий белок — методом Брэдфорд [24] на спектрофотометре Perkin Elmer (США). «Базальная» Mg<sup>2+</sup>-АТФазная активность рассчитывалась как разность активностей в присутствии и в отсутствие 2 мМ MgSO<sub>4</sub>. Активность Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-активируемой Mg<sup>2+</sup>-АТФазы (Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазы) оценивалась по разности между Mg<sup>2+</sup>-АТФазными активностями в присутствии и в отсутствие 5 мМ NaCl/25 мМ NaHCO<sub>3</sub>.

*Исследования in vivo.* Острые генерализованные судороги у крыс вызывали внутрибрюшинным введением фенола (300 мг/кг). Экспериментальных животных декапитировали сразу после появления судорог (тяжесть 4—5 баллов), т.е. на пике судорожной активности. Контрольных животных декапитировали в те же временные сроки (4—5 мин) после введения физиологического раствора. Мозг быстро извлекали и отмывали охлажденным 10 мМ Hepes-tris буфером (рН 7,4), содержащим 0,125 мМ ЭДТА. Фракцию плазматических мембран из мозга контрольных и опытных животных получали по стандартной методике, описанной выше.

*Статистика.* Результаты исследования представлены как значение средней ± стандартное отклонение. Статистическая значимость различий сравниваемых показателей оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Многочисленными исследованиями установлено, что высокие дозы фенола (>200 мг/кг) вызывают судорожную активность у млекопитающих [16—18]. В экспериментах *in vivo* представлялось важным установить влияние внутрибрюшинной инъекции фенола на исследуемые АТФазные активности мозга крыс. У контрольных животных активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы и  $Cl^-/HCO_3^-$ -АТФазы составили 6,8 и 4,2 мкмоль  $\Phi_i/ч/мг$  белка соответственно (табл. 1). Обнаружено, что у опытных животных после инъекции фенола (300 мг/кг) на пике судорожной реакции наблюдалось полное ингибирование активности  $Cl^-/HCO_3^-$ -АТФазы плазматических мембран мозга крыс и незначительная стимуляция «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы до 8,3 мкмоль  $\Phi_i/ч/мг$  белка (табл. 1).

Предварительно проведенные исследования показали, что нейрональная  $Cl^-/HCO_3^-$ -АТФаза мозга животных чувствительна к ГАМК<sub>A</sub>ергическим активаторам и ингибиторам и вовлекается в конвульсант-индуцируемую судорожную активность [19]. Так, в экспериментах *in vitro* было установлено, что фенол в диапазоне концентраций 500—1000 мкМ ингибирует на ~50% функцию ГАМК<sub>A</sub>/бензодиазепиновых рецепторов в культуре астроцитов [25]. Результаты проведенного исследования *in vitro* показали, что в обогащенной плазматическими мембранами фракции микросом активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы и  $Cl^-/HCO_3^-$ -АТФазы составили 7,2 и 3,9 мкмоль  $P_i/ч/мг$  белка соответственно (табл. 2). Фенол в концентрации 500 мкМ полностью ингибировал  $Cl^-/HCO_3^-$ -АТФазную актив-

ность нейрональных мембран мозга крыс и незначительно (~19%) активировал «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазу.

Таким образом, ингибирующее действие фенола на ферментативную активность плазматических мембран мозга крыс в экспериментах *in vitro* сходно с полным ингибированием  $Cl^-/HCO_3^-$ -АТФазной активности на пике судорожной реакции у этих животных. Кроме того, полученные данные сходны с ранее проведенными *in vivo* исследованиями, демонстрирующими вовлечение АТФазы в конвульсант-индуцируемую судорожную активность [26, 27]. В частности было установлено, что на пике судорожной активности, индуцируемой внутрибрюшинным введением блокаторов ГАМК<sub>A</sub> рецепторов (пентилентетразола или пикротоксина) активность  $Cl^-/HCO_3^-$ -АТФазы в мозге крыс не выявлялась [26, 27]. Эти данные указывают на близкое расположение аллостерических мест связывания фенола и ГАМК<sub>A</sub>ергических антагонистов на молекуле ГАМК<sub>A</sub> рецептор-сопряженного протеинового комплекса.

В литературе показано, что фенол и другие фенольные соединения могут модулировать функцию ионных каналов, рецепторных структур и транспортных АТФаз в субклеточных структурах различного происхождения. Так, в хронических экспериментах показано, что фенол (1,71 мг/л) снижает в 1,5—2 раза активность фосфатаз и  $Na^+/K^+$ -АТФазы из мозга, печени и мышц животных [28—30]. Исследования *in vitro* также показали, что фенол и его производные с различной эффективностью ингибируют дегидрогеназы, протеинкиназы и  $H^+$ -АТФазы в митохондриях, выделенных из клеток

Таблица 1

Активность «базальной» и  $Cl^-/HCO_3^-$ -активируемой АТФазы плазматических мембран мозга крыс в экспериментах *in vivo* до и после внутрибрюшинной инъекции фенола (300 мг/кг)

Условия эксперимента	АТФазная активность, мкмоль $\Phi_i/ч/мг$ белка	
	"Базальная" $Mg^{2+}$ -АТФаза	$Cl^-/HCO_3^-$ - АТФаза
Контроль	6,8 ± 0,9	4,2 ± 0,3
Фенол (300 мг/кг)	8,3 ± 0,5 *	0,0

Примечание. \* —  $p < 0,05$  — статистически значимые отличия от значений активности фермента в контроле.

Таблица 2

Влияние фенола на «базальную» и  $Cl^-/HCO_3^-$ -активируемую АТФазные активности плазматических мембран мозга крыс в экспериментах *in vitro*

Условия эксперимента	АТФазная активность, мкмоль $\Phi_i/ч/мг$ белка	
	"Базальная" $Mg^{2+}$ -АТФаза	$Cl^-/HCO_3^-$ - АТФаза
Контроль	7,2 ± 0,8	3,9 ± 0,3
Фенол (500 мкМ)	8,5 ± 0,7 *	0,0

Примечание. \* —  $p < 0,05$  — статистически значимые отличия от значений активности фермента в контроле.

млекопитающих [30].  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза саркоплазматического ретикула млекопитающих также проявляла высокую чувствительность к фенольным соединениям. Так, бифенольные соединения, в частности бис-фенол, показал высокую эффективность ( $K_i = 0,3 \text{ мкМ}$ ) при ингибировании этого фермента [29]. Кроме того, в ряде исследований *in vivo* и *in vitro* было показано вовлечение ацетилхолин- и допаминергических сигнальных систем в фенол-индуцируемую нейротоксичность [11, 18]. Поскольку исследуемая нами  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -АТФаза функционально и структурно сопряжена с ГАМК<sub>A</sub> рецепторами, можно предположить важную роль ГАМК<sub>A</sub>ергической сигнализации и АТФазы в проявлении судорожной активности при фенольной нейротоксичности. Более того, изменения активности  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -АТФазы, наблюдаемые в экспериментах *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют, что исследуемый рецептор-сопряженный ферментный комплекс может являться специфической мишенью при остром фенольном воздействии на центральную нервную систему. В этом контексте оценка дополнительных параметров функционирования фермента, а также изменения его свойств, связанных с  $\text{Cl}^-$ -транспортом при фенольном воздействии, может дать новое представление о молекулярных механизмах, лежащих в основе этого взаимодействия.

### Литература

#### (п.п. 1—25; 28—30 см. References)

26. Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В. Активность сопряженной с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ -активируемой  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы нейрональных мембран мозга крыс в присутствии пентилентетразола в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 4: 98-102.
27. Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В. Влияние пикротоксина на ГАМК<sub>A</sub>-сопряженную  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ -активируемую  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазную активность плазматических мембран мозга крыс в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. *Патогенез*. 2011; 1: 31-4.

### References

1. Michalowicz, J., Duda, W. Phenols—Sources and Toxicity. *Pol. J. Environ. Stud.* 2007; 16: 347-62.
2. McDonnell G., Russell A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 147-79.
3. Lin C.C., Chang C.W., Tsai S.J. Effect of Phenol Block in the Sciatic Nerve of Rats: Standardization of Minimized Dosage and Duration of Application. *The Chinese Journal of Physiology.* 2015; 58: 4.
4. Tufarelli V., Casalino E., D'Alessandro A.G., Laudadio V. Dietary Phenolic Compounds: Biochemistry, Metabolism and Significance in Animal and Human Health. *Curr Drug Metab.* 2017; 18: 905-13.

5. Vermerris W., Nicholson R. Phenolic Compounds and their Effects on Human Health. *Phenolic Compound Biochemistry*; 2008.

6. Li A.M. Ecological determinants of health: food and environment on human health. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017; 24: 9002-15.

7. Breton R.L., Teed R.S., Moore D.R.J. An Ecological Risk Assessment of Phenol in the Aquatic Environment. *Journal Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal.* 2003; 9: 549-68.

8. IUCALID, International Uniform Chemical Information Database, Council Regulation, 793/93; 2003.

9. RTECS, Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, Elsevier MDL., Cincinnati, OH; 2004.

10. Todorovic V. Acute phenol poisoning. *Med Pregl.* 2003; 56: 37-41.

11. Suzuki T., Kisara K., Onodera K., Takano K., Ogura Y. Behavioral pharmacological studies in toxicities of phenol (III) Effect of central dopaminergic system on phenol-induced tremor. *Japanese Journal of Oral Biology.* 1981; 23: 414-18.

12. Ernst M.R., Klesmer R., Huebner R.A., Martin J.E. Susceptibility of cats to phenol. *J Am Vet Med Assoc.* 1961; 138: 197-99.

13. Evans S.J. Acute Phenol Poisoning. *Br J Ind Med.* 1952; 9: 227-29.

14. Giri P.P., Sinha R., Sikka S., Meur S. Acute carbolic acid poisoning: A report of four cases. *Indian J Crit Care Med.* 2016; 20: 668-70.

15. Hodson P.V. A comparison of the acute toxicity of chemicals to fish, rats and mice. *J Appl Toxicol.* 1985; 5: 220-26.

16. Windus-Podehl G, Lyftogt C., Zieve L., Brunner G. Encephalopathic effect of phenol in rats. *J. Lab. Clin. Med.* 1983; 101: 586-92.

17. Spencer P.J., Gollapudi B.B., Waechter J.M. Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia. *Toxicol Sci.* 2007; 97: 120-27.

18. Itoh M. The role of brain acetylcholine in phenol-induced tremor in mice. *Arch Oral Biol.* 1995; 40: 365-72.

19. Menzikov S.A. Neuronal multifunctional ATPase. *Biophys. Rev. Lett.* 2013; 8: 213-27.

20. Inagaki C., Hara M., Zeng X.T. A  $\text{Cl}^-$ -pump in rat-brain neurons. *J. Exp. Zool.* 1996; 275: 262-68.

21. Menzikov S.A. The Detection of a GABA<sub>A</sub>R  $\beta$ -3 Subunit in an Affinity-Purified Preparation of the GABA<sub>A</sub>R-Associated  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -ATPase Isolated from Rat Brain. *Biochem Mol Biol J.* 2017b; 3: 2.

22. Staley K.J., Proctor W.R. Modulation of mammalian dendritic GABA<sub>A</sub> receptor function by the kinetics of  $\text{Cl}^-$  and  $\text{HCO}_3^-$  transport. *J Physiol Lond.* 1999; 519: 693-12.

23. Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 1990; 28: 1756-58.

24. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-54.

25. Ducis I., Norenberg L.O., Norenberg M.D. Effect of phenol and sodium octanoate on the astrocyte benzodiazepine receptor. *Brain Res.* 1990; 514: 349-51.

26. Menzikov S.A., Karpova M.N., Kalinina M.V. The activity of the GABA<sub>A</sub> receptor coupled  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -activated  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the neuronal membranes from rat brain in the presence of pentylentetrazole in *in vitro* and *in vivo*

experiments. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2012; 4: 98-102. (in Russian)

27. Menzikov S.A., Karpova M.N., Kalinina M.V. The effect of picrotoxin on GABA<sub>A</sub> coupled Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-activated Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity of neuronal membranes of the rat brain in experiments *in vitro* and *in vivo*. *Pathogenesis*. 2011; 1: 31-4. (in Russian)

28. Magyar J., Szentandrassy N., Banyasz T., Fulop L., Varro A., Nanasi PP. Effects of thymol on calcium and po-

tassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 136: 330-38.

29. Michelangeli, F., Orlowski, S., Champeil, P., East J.M., Lee A.G. Mechanism of inhibition of the (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase by nonylphenol. *Biochemistry*. 1990; 29: 3091-101.

30. Stockdale M., Selwyn M.J. Influence of Ring Substituents on the Action of Phenols on Some Dehydrogenases, Phosphokinases and the Soluble ATPase from Mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 1971; 21: 416-23.

#### Сведения об авторах:

Мензиков Сергей Арсентьевич, доктор биол. наук, гл. науч. сотр., e-mail: menzikov@mail.ru

Шагиахметов Ф.Ш.<sup>1</sup>, Анохин П.К.<sup>2</sup>, Шамакина И.Ю.<sup>2</sup>, Давыдова Т.В.<sup>1</sup>

## Сравнительный анализ экспрессии генов опиоидной системы в мозге крыс с различным уровнем предпочтения алкоголя

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, 119002, г. Москва, Россия, М. Могильцевский пер., д. 3

**Введение.** Среди факторов риска формирования алкогольной зависимости важное место занимает высокая гедоническая ценность алкоголя. Активация двух подтипов опиоидных рецепторов — каппа- (КОР) и ноцицептинового (НОР) сопровождается снижением уровня дофамина в прилежащем ядре системы расширенной миндалины мозга. Можно предполагать, что экспрессия эндогенных лигандов рецепторов динорфина и ноцицептина является гомеостатическим механизмом отрицательной обратной связи в системе «награды», а ее нарушение — один из патогенетических механизмов формирования зависимости. **Цель исследования** — выявление различий в уровнях мРНК генов, кодирующих КОР и НОР рецепторы и их эндогенные лиганды — препродинорфин (ppDyn) и препроноцицептин (ppNoc) в ключевых областях мезолимбической дофаминергической системы у хронически алкоголизированных животных с различным уровнем потребления алкоголя. **Методы.** Половозрелые крысы-самцы Wistar содержались 15 сут. (60-х по 85-е сут. жизни) в условиях «свободного выбора» между 10% раствором этанола и водой. Уровень экспрессии мРНК генов определяли методом ПЦР в реальном времени. **Результаты.** Были выделены 2 группы животных — со стабильно низким (группа А<sup>-</sup>; n = 14) и неуклонно растущим (группа А<sup>+</sup>; n = 12) уровнем предпочтения алкоголя. Животные группы А<sup>+</sup> характеризовались статистически значимо сниженной экспрессией мРНК генов, кодирующих ppDyn и ppNoc в стриатуме, а также ppDyn и опиоидные рецепторы (КОР и НОР) — в миндалине мозга. **Заключение.** Предполагается, что низкий уровень экспрессии генов «антигедонических» опиоидных рецепторов (КОР и НОР) и их эндогенных лигандов (ppDyn и ppNoc) в лимбических структурах мозга может рассматриваться в качестве этиопатогенетического механизма, лежащего в основе положительного подкрепляющего действия алкоголя у животных с высоким уровнем его предпочтения.

**Ключевые слова:** алкоголь; зависимость; каппа-опиоидный рецептор; ноцицептиновый рецептор; динорфин; ноцицептин; дофамин; экспрессия генов; мРНК; ПЦР.

**Для цитирования:** Шагиахметов Ф.Ш., Анохин П.К., Шамакина И.Ю., Давыдова Т.В. Сравнительный анализ экспрессии генов опиоидной системы в мозге крыс с различным уровнем предпочтения алкоголя. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 53—57.

DOI:

**Для корреспонденции:** Шагиахметов Фарид Шамилевич, e-mail: f.shagiakhmetov@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 10.10.2018

Shagiakhmetov F.Sh.<sup>1</sup>, Anokhin P.K.<sup>2</sup>, Shamakina I.Yu.<sup>2</sup>, Davydova T.V.<sup>1</sup>

## Comparative quantitative analysis of the brain opioid gene expression in rats with high and low voluntary alcohol consumption

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

<sup>2</sup> National Medical Research Center of Psychiatry and Addiction, Malyi Mogiltsevsky Pereulok 3, 119002, Moscow, Russia

**Background.** High hedonic value of alcohol is one of important risk factors for alcohol abuse and dependence. Activation of dynorphin and nociceptin opioidergic neurotransmission is suggested to be a homeostatic mechanism of negative feedback loop to arrest excessive mesolimbic dopamine release and thus, to decrease the rewarding effects of drugs of abuse and alcohol. Decreased tone of these evolutionarily closely related «anti-reward» opioidergic systems may result in increased hedonimimetic properties of alcohol and thus, represent a principal pathogenetic mechanism of substance abuse. **The aim** of this study was to analyze opioid gene (КОР, НОР, ppDyn and ppNoc) expression in mesolimbic areas (mesencephalon, striatum and amygdala) in two groups of animals with different levels of alcohol preference. **Methods.** Using a 25-day-long

(postnatal days [PND] 60 to 85) two-bottle free choice regimen (10% ethanol/water) in male Wistar rats we identified two groups of animals: low-drinking (A-) and low-drinking under the initial ethanol exposure but increasing the alcohol intake over the course of experiment (A+). mRNA levels were evaluated on PND 85 using a quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction procedure. **Results.** The A+ rats were found to have statistically significantly lower levels of ppDyn and ppNoc mRNA in the striatum and ppDyn, KOR and NOP mRNA in the amygdala than A-rats. **Conclusions.** We suggested that low levels of these «anti-hedonic» opioid gene expression in the striatum and amygdala may result in increased rewarding properties of alcohol in A+ rats and thus, may represent one of the principal mechanisms underlying high alcohol preference.

**Key words:** alcohol preference; dependence; addiction; dynorphin; kappa opioid receptor; nociceptin; orphanin FQ receptor; dopamine; gene expression; mRNA level; PCR.

**For citation:** Shagiakhmetov F.Sh., Anokhin P.K., Shamakina I.Yu., Davydova T.V. Comparative quantitative analysis of the brain opioid gene expression in rats with high and low voluntary alcohol consumption. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 53—57. (In Russian).

DOI:

**For correspondence:** Sagiakhmetov Farid Shamilevich, e-mail: f.shagiakhmetov@gmail.com

**Financing.** The study has not sponsorship.

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

**Received** 10.10.2018

## Введение

Злоупотребление алкоголем является одной из важнейших медико-социальных проблем во всем мире. Несмотря на активный экспериментальный поиск нейробиологических и молекулярных основ действия алкоголя [1—6], до сих пор остается недостаточно изученной роль опиоидных каппа- и ноцицептиновой нейромодуляторных систем мозга в патогенезе алкогольной зависимости [4]. *Цель исследования* — анализ уровня мРНК генов OPRK1, OPRL1, кодирующих опиоидные рецепторы и их эндогенные лиганды, в мезолимбических структурах мозга хронически алкоголизированных крыс с различным уровнем предпочтения алкоголя, сформированным в условиях свободного выбора между этанолом и водой.

## Методика

Работа выполнялась на аутбредных крысах-самцах Wistar (питомник лабораторных животных «Столбовая» ФГБУ «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»). Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НИИОПП. На протяжении всего эксперимента животных содержали в условиях естественной освещенности, при температуре  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . В качестве пищевого рациона использовали гранулированный корм (ГОСТ Р 50258-92). Протокол эксперимента соответствовал этическим принципам и нормам проведе-

ния биомедицинских исследований с участием животных и был одобрен этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского».

С 60-х по 85-е сут. жизни (PND 60-85) животных помещали в индивидуальные клетки (460 x 300 x 160 мм) в условия «свободного выбора» между двумя поилками, с 10%-ным раствором этанола и с водой. Потребление алкоголя и воды измеряли ежедневно путем взвешивания поилок и рассчитывали уровень потребления этанола в г/кг массы тела животного. Уровень предпочтения алкоголя оценивали как отношение массы потребляемого раствора этанола к общей массе потребляемой жидкости. Через 25 сут. тестирования животных декапитировали, выделенные структуры мозга замораживали и хранили при  $-70^\circ\text{C}$ . Уровень экспрессии генов OPRK1, OPRL1 (кодирующих соответственно KOR и NOP опиоидные рецепторы), PDYN и PNOC (кодирующих соответственно опиоидные пептиды препродинарфин (ppDyn) и препроницептин (ppNoc)) изучали в структурах мезолимбической системы — среднем мозге, вентральном стриатуме и миндалине. Выделение тотальной РНК проводили с помощью набора «RNeasy Lipid Tissue Mini Kit» (QIAGEN). Количество выделенной РНК определяли спектрофотометрически (Eppendorf BioPhotometer, Германия). Синтез к-ДНК осуществляли с использованием набора «RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit» (Fermentas). Уровень экспрессии мРНК определяли, используя полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (RT-PCR) на амплификаторе Multicolor Real-Time PCR Detection System iQ75 (BioRad, Германия). Реакцию проводили в течение

40 циклов (исходная денатурация матрицы — 3 мин при 95°C; денатурация — 15 с при 95°C; отжиг праймеров — 15 с при 60°C; элонгация — 30 с при 72°C) с последующим анализом кривых плавления полученных продуктов ПЦР. Для проведения RT-PCR были использованы специфические олигонуклеотидные праймеры (ДНК-синтез, Россия). Измерения проводили в 3 параллельных образцах. Для нормирования данных в качестве «референсного» гена был выбран ген  $\beta$ -актина. Сравнение уровней экспрессии интересующих генов в опыте и контроле проводили методом «дельта — дельта Си-ти» ( $\Delta\Delta C_t$ ) [7].

Полученные результаты обрабатывали с помощью пакета программ «Statistica 6» («Statsoft», США). Для проверки нормальности распределения количественных данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Для проверки статистической значимости различий в потреблении этанола был использован двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) для повторных измерений с последующим апостериорным (post-hoc) анализом. Для оценки межгрупповых различий уровня мРНК использовали t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### Потребление алкоголя

По результатам измерений потребления этанола были выделены две группы животных (рис. 1). Начиная с 7-х сут. тестирования уровень предпочтения алкоголя (отношение массы потребляемого раствора этанола к общей массе потребляемой жидкости) неуклонно возрастал в группе  $A^+$ , сохраняясь на постоянном уровне в группе  $A^-$ . Показатели среднесуточного начального (1-е — 7-е сут.) и конечного (18-е — 25-е сут.) уровней потребления алкоголя в исследуемых группах составили: в группе  $A^+$  —  $3,2 \pm 0,2$  и  $7,2 \pm 0,9$  г/кг, в группе  $A^-$  —  $3,0 \pm 0,6$  и  $3,6 \pm 0,4$  г/кг соответственно (рис. 1).

### Уровень экспрессии мРНК

генов опиоидных рецепторов (KOP и NOP) и опиоидных пептидов (ppDyn и ppNos) в структурах мезолимбической системы

В среднем мозге установлена тенденция к снижению экспрессии мРНК гена KOP рецептора в группе животных  $A^+$  по сравнению с группой  $A^-$ . Уровень экспрессии мРНК гена NOP рецептора не различался в исследуемых группах.

В стриатуме животных группы  $A^+$  было обнаружено статистически значимое снижение уровня мРНК генов опиоидных пептидов ppNos и ppDyn и

тенденция к снижению экспрессии генов обоих опиоидных рецепторов по сравнению с группой  $A^-$  (рис. 2).

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований авторов, которыми было показано [8], что хроническая экспозиция крыс этанолу либо кокаину приводит к снижению уровня мРНК гена OPRK1, кодирующего KOP в прилежащем ядре вентрального стриатума более чем на 80%. Важно отметить, что качественные и количественные изменения экспрессии мРНК, кодирующей KOP рецептор, были идентичными в случае двух различных по механизму действия психоактивных веществ. Общим для них является способность значительно повышать уровень экстраклеточного дофамина в прилежащем ядре системы расширенной миндалины мозга [6, 9].

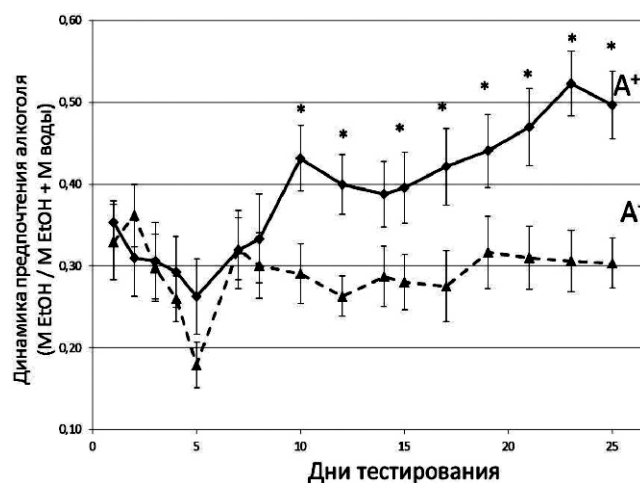


Рис. 1. Динамика показателей, характеризующих предпочтение алкоголя животными.

$A^-$  (животные со стабильно низким уровнем потребления этанола в течение всего эксперимента,  $n = 14$ );  $A^+$  (животные с растущим уровнем потребления этанола,  $n = 12$ ). По оси ординат — средний по группе показатель предпочтения этанола (отношение массы потребляемого 10% раствора этанола к общей массе потребляемой жидкости), по оси абсцисс — сут. эксперимента. \*  $p < 0,05$  — по отношению к соответствующему показателю в группе  $A^-$ .

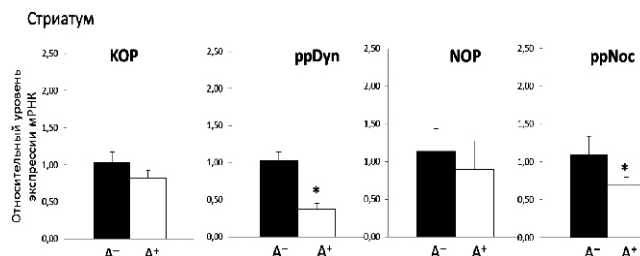


Рис. 2. Относительные уровни экспрессии мРНК генов опиоидных KOP и NOP рецепторов и предшественников их эндогенных лигандов — препродинарфина (ppDyn) и препроноцицептина (ppNos) в стриатуме мозга животных с различным уровнем предпочтения алкоголя. Обозначения те же и на рис. 1, \*  $p < 0,05$  (t-критерий Стьюдента для независимых выборок).

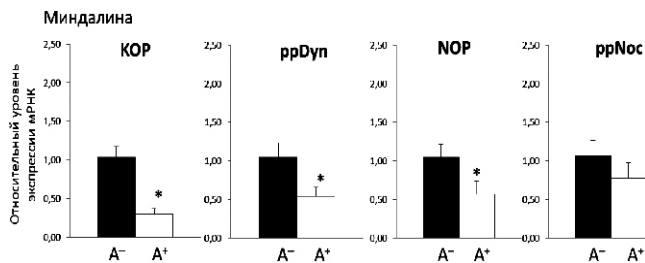


Рис. 3. Относительные уровни экспрессии мРНК генов опиоидных KOR и NOP рецепторов и предшественников их эндогенных лигандов — препродинорфина (ppDyn) и препроноцицептина (ppNos) в миндалине мозга животных с различным уровнем предпочтения алкоголя. Обозначения те же, что на рис. 1, \* p<0,05 (t-критерий Стьюдента для независимых выборок).

Как известно, ключевую роль в экспрессии генов, кодирующих ppDyn и ppNos, играет активация D1 рецепторов (DRD1), расположенных на определенной популяции ГАМКергических шипиковых нейронов стриатума, коэкспрессирующих эти опиоидные пептиды [10]. Другими авторами показано снижение количества D1 рецепторов в вентральном стриатуме и хвостатом ядре на срезах мозга больных алкоголизмом (post mortem), употреблявших алкоголь в количестве не менее 80 г/сут. [11, 12]. Возможно, эти изменения могли быть следствием хронического повышения экстраклеточного уровня дофамина в стриатуме субъектов с высоким уровнем потребления алкоголя. Полагают, что степень повышения экстраклеточного уровня дофамина в вентральном стриатуме определяет выраженность положительного подкрепления в ответ на прием ПАВ [13]. Учитывая роль динорфина и ноцицептина в подавлении избыточной дофаминергической нейротрансмиссии в стриатуме [6], наблюдаемый низкий уровень экспрессии мРНК генов опиоидных пептидов ppDyn и ppNos в группе животных с высоким предпочтением алкоголя (A<sup>+</sup>), по нашему мнению, может свидетельствовать о сниженной эффективности отрицательной обратной связи в системе стриатум-средний мозг и более выраженном повышении уровня экстраклеточного дофамина в стриатуме (и соответственно положительного подкрепления) в ответ на потребление алкоголя у животных данной группы.

В миндалине животных группы A<sup>+</sup> экспрессия мРНК генов NOP и KOR рецепторов, а также опиоидного пептида ppDyn, была существенно ниже, чем в группе A<sup>-</sup>. Кроме того, в группе A<sup>+</sup>, наблюдалась тенденция к снижению экспрессии гена ppNos (рис. 3).

Исследования поведения показали, что ГАМКергическая система центральной миндалины (CeA) играет ключевую роль в реализации положительно подкрепляющих эффектов этанола и развитии анксиогенеза в остром периоде синдрома отмены [14, 15]. Каппа-опиоидная и ноцицептиновая системы играют

важную роль в регуляции баланса возбуждающей и тормозной нейротрансмиссии в этой структуре мозга. Эволюционно-генетическое родство каппа-опиоидного и ноцицептинового (также известного ранее как «каппа-3») рецепторов [16], с учетом их функциональной гомологичности в регуляции активности мезостриарных нейронных контуров, предполагает возможность существования функциональной схожести и на уровне регуляции ГАМКергической нейротрансмиссии в CeA. Действительно, было показано, что ноцицептин, так же, как динорфин, снижает высвобождение ГАМК в CeA, возникающее в ответ на введение этанола [14, 15], и, очевидно, выраженность его положительных подкрепляющих эффектов.

Таким образом, результаты исследования показали, что животные группы A<sup>+</sup> характеризуются сниженным уровнем экспрессии мРНК генов KOR и NOP рецепторов и их эндогенных лигандов в стриатуме и миндалине. Низкая экспрессия генов, кодирующих динорфин и ноцицептин на фоне высокого уровня дофамина у животных группы A<sup>+</sup> может быть одной из причин дисфункции гомеостатических механизмов. Таким образом, снижение тонуса каппа-опиоидной и ноцицептиновой систем, осуществляющих отрицательную регуляцию гедонического гомеостаза, может быть причиной более высокого уровня экстраклеточного дофамина и, соответственно, предпочтения алкоголя животными с прогрессивным ростом его потребления (группа A<sup>+</sup>). Иными словами, если вызванное этанолом повышение уровня мезолимбической дофаминергической нейротрансмиссии отражает выраженность положительных подкрепляющих эффектов алкоголя, то сниженный тонус ноцицептин/каппа-опиоидной системы нейропептидов нам представляется важным этиопатогенетическим фактором, определяющим более высокую гедоническую ценность алкоголя у предпочитающих его животных.

### Литература (п.п. 6-16 см. References)

1. Анохина И.П., Векшина Н.Л. и др. Некоторые биологические механизмы врожденной предрасположенности к алкоголизму. *Физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 1992; 78(12): 30-8.
2. Анохина И.П., Шамакина И.Ю. *Фундаментальные механизмы зависимости от психоактивных веществ*. Наркология. Национальное руководство (под ред. Н.Н. Иванца, И.П. Анохиной, М.А. Винниковой). Москва; ГЭОТАР-Медиа. 2016: 96-115.
3. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Мешеров Ш.К. *Дофамин и подкрепляющие системы мозга*. СПб; Лань, 2002.
4. Шагиахметов Ф.Ш., Проскуракова Т.В., Шамакина И.Ю. Динорфин/каппа-опиоидная система мозга как перспективная мишень для терапии зависимости от психоактивных веществ. *Нейрохимия*. 2015; 32(4): 285.
5. Шагиахметов Ф.Ш., Гришин С.А., Анохин П.К., Шамакина И.Ю. *Фундаментальные основы терапевти-*



ческого действия опиоидных антагонистов при лечении зависимости от алкоголя: роль каппа-опиоидных рецепторов. *Вопросы наркологии*. 2015; (4): 73-96.

### Referenses

1. Anokhina IP, Vekshina NL et al. The biological mechanisms of a congenital predisposition to alcoholism *Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 1992; Dec; 78(12); 30-8. (in Russian)
2. Anokhina IP, Shamakina IY. Fundamentals of drug addiction. *Narkologiya. Natsional'noye rukovodstvo (pod redaktsiyey N.N. Ivantsa, I.P. Anokhinoy, M.A. Vinnikovoy) [Fundamental'nye mekhanizmy zavisimosti ot psikhoaktivnykh veshhestv. Narkologiya. Natsional'noye rukovodstvo (pod red. N.N. Ivantsa, I.P. Anokhinoy, M.A. Vinnikovoy)]*. Moscow; GEOTAR-Media. 2016; 96-115. (in Russian)
3. Shabanov P.D., Lebedev A.A., Meshcherov S.K. *Dopamine and brain reward system [Dofamin i podkreplyayushhie sistemy mozga]*. Saint-Petersburg; Lan', 2002.
4. Shagiakhmetov, F.S., Proskuryakova, T.V., Shamakina I.Y. The dynorphin/kappa-opioid system of the brain as a promising target for therapy for dependence on psychoactive substances. *Neurochem. J.* (2015) 9: 245. <https://doi.org/10.1134/S1819712415040157>.
5. Shagiakhmetov F.S., Grishin S.A., Anokhin P.K., Shamakina I.Y. Fundamentals of the therapeutic effect of opioid antagonists in alcohol addiction treatment. The role of K-opioid receptors. *Voprosy narkologii*. 2015; 4; 73-96. (in Russian)
6. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35(1): 217-38. doi:10.1038/npp.2009.110.
7. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
8. Rosin A, Lindholm S, Franck J, Georgieva J. Downregulation of kappa opioid receptor mRNA levels by chronic

ethanol and repetitive cocaine in rat ventral tegmentum and nucleus accumbens. *Neurosci Lett*. 1999; 5; 275(1): 1-4.

9. Torres G, Horowitz JM. Individual and combined effects of ethanol and cocaine on intracellular signals and gene expression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1996; 20(4): 561-96.

10. Muschamp JW, Carlezon WA. Roles of Nucleus Accumbens CREB and Dynorphin in Dysregulation of Motivation. Cold Spring Harbor *Perspectives in Medicine*. 2013; 3(2):a012005. doi:10.1101/cshperspect.a012005.

11. Tupala E, Tiihonen J. Striatal dopamine D1 receptors in type 1 and 2 alcoholics measured with human whole hemisphere autoradiography. *Brain Res*. 2005; 1031(1): 20-9.

12. Hirth N, Meinhardt MW, Noori HR, et al. Convergent evidence from alcohol-dependent humans and rats for a hyperdopaminergic state in protracted abstinence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113(11): 3024-9. doi:10.1073/pnas.1506012113.

13. Tuomainen P, Patsenka A, Hyytia P, Grinevich V, Kiiianmaa K. Extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens in AA and ANA rats after reverse microdialysis of ethanol into the nucleus accumbens or ventral tegmental area. *Alcohol*. 2003; 29(2); 117-24.

14. Gilpin NW, Roberto M, Koob GF, Schweitzer P. Kappa opioid receptor activation decreases inhibitory transmission and antagonizes alcohol effects in rat central amygdala. *Neuropharmacology*. 2014; 77; 294-302. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.005.

15. Roberto M, Siggins GR. Nociceptin/orphanin FQ presynaptically decreases GABAergic transmission and blocks the ethanol-induced increase of GABA release in central amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 20; 103(25); 9715-20.

16. Stevens CW, Brasel CM, Mohan S. Cloning and bioinformatics of amphibian mu, delta, kappa, and nociceptin opioid receptors expressed in brain tissue: Evidence for opioid receptor divergence in mammals. *Neuroscience letters*. 2007; 419(3); 189-94. doi:10.1016/j.neulet.2007.04.014.

### Сведения об авторах:

Шагиахметов Фарид Шамилович, e-mail: f.shagiakhmetov@gmail.com;

Анохин Петр Константинович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. психофармакологии Национального научного центра наркологии — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, e-mail: petranokhin@mail.ru;

Шамакина Инна Юрьевна, канд. биол. наук, зав. лаб. психофармакологии Национального научного центра наркологии — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, e-mail: shamakina@yahoo.com;

Давыдова Татьяна Викторовна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейрориммунопатологии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: dav-ta@yandex.ru

Бурдённый А.М.<sup>1</sup>, Уткин Д.О.<sup>2</sup>, Филиппова Е.А.<sup>1</sup>, Логинов В.И.<sup>1,3</sup>, Пронина И.В.<sup>1</sup>,  
Фридман М.В.<sup>4</sup>, Казубская Т.П.<sup>2</sup>, Кушлинский Н.Е.<sup>2</sup>, Брага Э.А.<sup>1,3</sup>

## Гиперметилирование группы генов микроРНК в первичных опухолях и перитонеальных метастазах рака яичников

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

<sup>3</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

<sup>4</sup> ФГБНУ «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, 119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3

Рак яичников отличает раннее метастазирование и высокая частота летальных исходов. Ранее нами определена группа генов микроРНК, метилирование которых вовлечено в развитие и прогрессию рака яичников. **Цель исследования** — расширить спектр генов микроРНК, гиперметируемых при раке яичников, и изучить их связь с метастазированием как в образцах первичных опухолей, так и в макрометастазах. **Методика.** Использовали метод бисульфитной конверсии ДНК с последующей метилспецифичной ПЦР. **Результаты.** На выборке из 54 образцов рака яичников показано значимое повышение частот метилирования в образцах опухолей в сравнении с гистологически неизменной тканью яичников для 6 из 7 исследованных генов микроРНК: *MIR-107*, *MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3* ( $p < 10^{-3}$ , FDR = 0,01). Установлены статистически-значимые ассоциации метилирования 5 генов с параметрами прогрессии рака, в частности — с метастазированием. При сравнении данных по частотам метилирования в образцах опухолей от 37 пациенток без метастазов и 17 пациенток с метастазами, статистически значимая ассоциация с метастазированием показана для *MIR-1258* ( $p \leq 0,04$ ), *MIR-130b* ( $p \leq 0,01$ ), *MIR-34b/c* ( $p \leq 0,001$ ), и на уровне тенденции — для *MIR-9-1*, *MIR-9-3*. При анализе первичных опухолей и перитонеальных метастазов от 13 пациенток для этих 5 генов подтверждена связь с метастазированием. **Заключение.** Выявлена системная роль гиперметилирования группы генов микроРНК в перитонеальном метастазировании у больных раком яичников.

**Ключевые слова:** рак яичников, микроРНК, гены, гиперметилирование, перитонеальное метастазирование, первичные опухоли, макро-метастазы.

**Для цитирования:** Бурдённый А.М., Уткин Д.О., Филиппова Е.А., Логинов В.И., Пронина И.В., Фридман М.В., Казубская Т.П., Кушлинский Н.Е., Брага Э.А. Гиперметилирование группы генов микроРНК в первичных опухолях и перитонеальных метастазах рака яичников. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 58—66.

DOI:

**Для корреспонденции:** Брага Элеонора Александровна, e-mail: eleonora10\_45@mail.ru

**Финансирование:** Исследование выполнено за счет средств Российского научного фонда, грант 14-15-00654.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.09.2018

Burdennyu A.M.<sup>1</sup>, Utkin D.O.<sup>2</sup>, Filippova E.A.<sup>1</sup>, Loginov V.I.<sup>1,3</sup>, Pronina I.V.<sup>1</sup>,  
Fridman M.V.<sup>4</sup>, Kazubskaya T.P.<sup>2</sup>, Kuslinskii N.E.<sup>2</sup>, Braga E.A.<sup>1,3</sup>

## Hypermethylation of a group of microRNA genes in primary tumors and peritoneal metastases of ovarian cancer

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

<sup>2</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoe Shosse 24, Moscow 115478, Russia

<sup>3</sup> Research Center of Medical Genetics, Moskvorechje 1, Moscow 115478, Russia

<sup>4</sup> N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Gubkina Str. 3, Moscow 119333, Russia

Ovarian cancer is characterized by the early metastatic activity and high frequency of poor prognosis. Earlier we described a group of miRNA genes where methylation is involved in the development and progression of ovarian cancer. **Aim.** To expand the array of miRNA genes hypermethylated in ovarian cancer and to study their correlation with metastatic activity both in primary tumors and macro-metastases. **Methods.** For our study, we used DNA bisulfite conversion followed by

methyl-specific PCR. **Results.** A significant increase in methylation frequency was observed in 54 samples of ovarian cancer compared with histologically intact ovarian tissue for 6 of 7 studied miRNA genes, *MIR-107*, *MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, and *MIR-9-3* ( $p < 10^{-3}$ , FDR = 0.01). Five miRNA genes statistically significantly correlated with cancer progression, particularly with the metastatic activity. When comparing the methylation status of tumor samples from 37 non-metastatic and 17 metastatic patients we found statistically significant correlations with metastasis for *MIR-1258* ( $p \leq 0.04$ ), *MIR-130b* ( $p \leq 0.01$ ), and *MIR-34b/c* ( $p \leq 0.001$ ), and tendencies for *MIR-9-1* and *MIR-9-3*. Analysis of primary tumors and matched peritoneal metastases in 13 patients confirmed the association between methylation and metastasis for these 5 genes. **Conclusion.** This study demonstrated a systemic role of hypermethylation for the group of miRNA genes in peritoneal metastasis in patients with ovarian cancer.

**Keywords:** ovarian cancer, microRNA, genes, hypermethylation, peritoneal metastasis, primary tumors, macro-metastases.

**For citation:** Burdenny A.M., Utkin D.O., Filippova E.A., Loginov V.I., Pronina I.V., Fridman M.V., Kazubskaya T.P., Kuslinskii N.E., Braga E.A. Hypermethylation of a group of microRNA genes in primary tumors and peritoneal metastases of ovarian cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 58—66. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Eleonora A. Braga, e-mail: eleonora10\_45@mail.ru

#### Information about authors:

Burdenny A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>

Utkin D.O., <https://orcid.org/0000-0002-6620-2073>

Filippova E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>

Pronina I.V., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

Kazubskaya T.P., <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation, grant 14-15-00654.

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

**Received** 10.09.2018

## Введение

Метастазирование первичных опухолей осуществляется поэтапно — от изменения биохимии, морфологии и миграционных способностей опухолевых клеток к появлению на их поверхности рецепторов, обеспечивающих направленную миграцию к органам-мишеням и далее к формированию в органе-мишени специфического микроокружения, в котором мигрирующие метастатические клетки могут выжить [1]. В обеспечение этих особенностей вовлечены специфические гены и сигнальные пути, в регуляции которых важную роль играют микроРНК [2, 3]. МикроРНК — семейство коротких рибонуклеиновых кислот длиной 19—24 нуклеотидов, не кодирующих белки или пептиды, но выполняющих функцию посттранскрипционного регулятора экспрессии генов-мишеней и играющих критичную роль в онкогенезе, в частности, в метастазировании [2, 3]. МикроРНК отличается широкая мультитаргетность и способность к наиболее динамичной регуляции генов.

Рак яичников представляет группу крайне агрессивных злокачественных опухолей, с высокой частотой летальных исходов, что обусловлено выявлением заболевания на поздних стадиях, осложненным метастазированием в лимфатические узлы, брюшину и отдаленные органы [4, 5]. При выявлении опухолей яичников на

I—II клинических стадиях уровень 5-летней выживаемости достигает 70%; однако более половины случаев выявляют на поздних стадиях, когда уровень 5-летней выживаемости в среднем составляет 30%.

В диссеминацию рака яичников вовлечено множество таких взаимосвязанных биологических процессов: повышение миграционной активности раковых клеток, эпителиально-мезенхимальный переход, разрушение внеклеточного матрикса, образование сфероидов, апоптоз, аутофагия, ангиогенез, формирование метастазов, в том числе по всей брюшине [6]. Перитонеальное метастазирование сопровождается развитием асцита — наиболее частой причиной неблагоприятного исхода.

К настоящему времени накоплена обширная информация о влиянии микроРНК на метастазирование рака яичников (см. обзоры [6, 7]). Показано, что в диагностике и прогнозе течения этого заболевания перспективны профили экспрессии микроРНК [8]. Кроме самих микроРНК, системную роль в регуляции их генов-мишеней играют факторы, изменяющие уровень их экспрессии, в частности, aberrантное метилирование регуляторных CpG-островков генов микроРНК. За последнее десятилетие показана роль гиперметилирования для широкого круга генов микроРНК в опухолях разных локализаций [2, 9]. Инте-

ресно отметить, что среди генов микроРНК гиперметилирование регуляторных CpG-островков встречается в несколько раз чаще, чем среди генов, кодирующих белки [9, 10]. Профили гиперметилирования генов микроРНК предложены как потенциальные маркеры для диагностики и прогноза рака легкого, почки, молочной железы, толстой кишки и простаты [11—15]. В то же время анализ гиперметилирования генов микроРНК в опухолях яичников ограничен единичными исследованиями, например, относительно aberrантного метилирования генов семейства miR-9 [16].

Недавно нами определена группа генов микроРНК, метилирование которых вовлечено в развитие и прогрессию рака яичников [17]. Так, для 12 микроРНК (miR-124-3p, -125b-5p, -127-5p, 129-5p, -132-3p, -137, -148a-3p, -191-5p, -193a-5p, -203a, -339-3p, -375) установлена статистически значимая зависимость между изменениями статуса метилирования и уровня экспрессии, которая подтвердила роль метилирования в регуляции экспрессии генов микроРНК в опухолях яичников. Кроме того, мы показали статистически значимую ассоциацию гиперметилирования 10 генов микроРНК (MIR-124-2, -124-3, -125B-1, -127, -129-2, -137, -193A, -203A, -339, -375) с метастазированием рака яичников и предложили системы маркеров для диагностики и предсказания метастазирования [17].

**Цель работы:** расширить спектр генов микроРНК, гиперметируемых при раке яичников, и изучить их связь с метастазированием, в образцах первичных опухолей и макро-метастазах брюшины.

## Методика

Образцы рака яичников собраны и морфологически охарактеризованы в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства Здравоохранения РФ. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан», получено разрешение этического комитета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства Здравоохранения РФ, а также информированное согласие больных. Анализировали образцы рака яичников у больных, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. Все опухоли яичников были классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и гистологически верифицированы на основании критериев классификации ВОЗ [18]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70—80%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3—5 мкм), окрашенных гематоксилин-эозином. В исследовании ис-

пользованы парные образцы опухолей и гистологически неизмененных тканей яичников, полученные от 54 больной раком яичников, включая 37 образцов от пациентов, у которых не было выявлено метастазов, и 17 образцов от пациенток, у которых выявлены метастазы в регионарных лимфатических узлах, и/или в брюшине, в отдаленных органах. Кроме того, исследованы 13 образцов первичных опухолей, для которых были также собраны образцы метастазов, обнаруженных в брюшине. Клинико-гистологические характеристики всех опухолевых образцов приведены в табл. 1. Образцы тканей хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора SilentCrusher S (Heidolph, Германия). Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике.

Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную ПЦР (МС-ПЦР) проводили, как описано ранее [19]. Модифицированную бисульфитом ДНК (1—2 мкг) очищали с помощью Centrifugal Filter Microcon, Ultracel YM-30 (Millipore, США), хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  и использовали в качестве матрицы при проведении МС-ПЦР. ПЦР проводили на амплификаторе DNA Engine Dyad Cycler T-100 (Bio-Rad, США) с использованием олигонуклеотидов и условий амплификации, описанных в работах [11, 19]. Для каждого гена анализировали от 3 до 6 CpG-динуклеотидов. Препарат метилированной ДНК человека (#SD1131, «Thermo Scientific») использовали как контроль для метилированного аллеля, а препарат неметилированной ДНК человека (Male, #G1471, «Promega») — как контроль для неметилированного аллеля. Продукты ПЦР от разных генов разделяли одновременно с использованием 2% агарозного геля. Чтобы определить интенсивность люминесценции продукта ПЦР применяли Gel DOC Ez Imager software («Bio-Rad»). Метилирование учитывали в образцах, в которых сигнал был эквивалентен маркеру (7 нг/мкл). МС-ПЦР повторяли трижды, и учитывали как метилированные только образцы, на которых сигнал был всегда положительным.

Статистический анализ полученных данных проводили с применением точного критерия Фишера; изменения считали значимыми при  $p \leq 0,05$ . Достоверность значений  $p$  проверяли с помощью поправки Бенджамини—Хохберга на множественное сравнение; результат считали значимым при  $FDR$  (false discovery rate) равным 0,05 или ниже.

## Результаты и обсуждение

Частоты встречаемости метилирования 7 генов микроРНК (MIR-107, MIR-1258, MIR-130b, MIR-212, MIR-34b/c, MIR-9-1, MIR-9-3), иссле-

дованных с использованием представительной выборки образцов тканей яичников от 54 пациенток, приведены в табл. 2. Результаты анализа показали статистически значимое повышение частоты метилирования 6 из 7 (кроме *MIR-212*) исследованных генов в образцах опухолей по сравнению с парными образцами гистологически неизмененных тканей яичников

(35—57% против 4—19%;  $p \leq 0,001$ ,  $FDR = 0,01$ , табл. 2). Примечательно, что с наибольшей частотой гиперметилирование отмечалось для *MIR-107*, *MIR-34b/c* и *MIR-9-1* (52-57%). Эти результаты указывают на связь метилирования данных 6 генов с патогенезом рака яичников. Для *MIR-212* изменений в частоте метилирования не наблюдалось.

Таблица 1

Клинические и гистологические характеристики основной выборки из 54 образцов первичных опухолей и дополнительной выборки из 13 первичных опухолей и перитонеальных метастазов

Клинические и гистологические характеристики		N = 54	N = 13
Гистологический тип опухоли	Пограничная серозная аденома	4	0
	S	42	12
	E	4	1
	CC	2	0
	Mu	2	0
Стадия	I	9	0
	II	9	0
	III	28	13
	IV	4	0
Степень дифференцировки	G1	6	0
	G2	12	7
	G3	32	6
Перитонеальные метастазы	T3b	0	3
	T3c	13	10
Поражение регионарных лимфоузлов	N0	38	12
	N1	16	1
Отдаленные метастазы	M0	50	13
	M1	4	0
Примечание. S — серозная цистаденокарцинома; E — эндометриоидная цистаденокарцинома; Mu — муциозная цистаденокарцинома; CC — светлоклеточная цистаденокарцинома; G3 — низкодифференцированная; G2 — умереннодифференцированная; G1 — высокодифференцированная.			

Таблица 2

Частота метилирования генов микроРНК в опухолях яичников

Ген микроРНК	Локализация в геноме	Образцы рака яичников (54)		Условная норма (54)		p
		n	%	n	%	
<i>MIR-107</i>	10q23.31	28	52	2	4	$1,3 \times 10^{-8}$
<i>MIR-1258</i>	2q31.3	20	37	3	6	$0,96 \times 10^{-4}$
<i>MIR-130-b</i>	22q11.2	20	37	4	7.4	0,0004
<i>MIR-212</i>	17p13.3	10	19	12	22	0,8
<i>MIR-34b/c</i>	11q23.1	29	54	10	19	0,0003
<i>MIR-9-1</i>	1q22	31	57	5	9	$1,3 \times 10^{-7}$
<i>MIR-9-3</i>	15q26.1	19	35	3	6	$5,9 \times 10^{-7}$
Примечание. Даны число и процент образцов, в которых данный ген микроРНК метилирован от общего количества образцов (N = 54). Условная норма соответствует парным образцам гистологически неизмененной ткани яичников (N = 54). Статистическая значимость определена по тесту Фишера и подтверждена с учетом поправки Бенджамини—Хохберга на множественное сравнение ( $FDR = 0,01$ ).						

Данные по частотам метилирования исследованных генов микроРНК, полученные на репрезентативной выборке из 54 образцов рака яичников, были сопоставлены с клинико-гистологическими характеристиками пациенток (рис. 1).

Как видно из рис. 1 (А), наблюдается статистически значимая ( $p \leq 0,003$ ) ассоциация метилирования трех генов *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3* с более тяжелой (III/IV) клинической стадией. Частоты метилирования этих генов микроРНК при повышении стадии от I—II до III—IV вырастают в 3—5 раз (74% против 20% у *MIR-34b/c*; 76% против 25% у *MIR-9-1*; 50% против 10% у *MIR-9-3*). С учетом поправки Бенджамини—Хохберга на множественное сравнение значения  $p$  для этих генов статистически достоверны при  $FDR = 0.05$  или ниже.

Как видно из рис. 1 (Б), те же микроРНК показывают высоко значимую связь с размером и степенью инвазии опухоли; значения  $p$  для генов *MIR-34b/c* и *MIR-9-1* значимы при  $FDR = 0,05$  и ниже. Стоит отметить, что частоты метилирования *MIR-34b/c* при переходе от T1 к T3 увеличиваются в 3 раза (от 22% до 73%), *MIR-9-1* — в 7 раз (от

11% до 76%); в случае *MIR-9-3* в образцах с T1 метилирование не выявлено, а с T3 частота метилирования 52%. Таким образом, установлена строгая зависимость между частотой метилирования трёх генов (*MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*) и стадией рака яичников, а также размером и степенью инвазии опухоли.

Для генов *MIR-9-1*, *MIR-9-3* показана также ассоциация повышенной частоты метилирования с пониженной степенью дифференцировки (значения  $p \leq 0,001$ , что статистически значимо при  $FDR = 0.01$ ; рис. 1, В). Можно отметить, что при переходе от опухолей со средней и высокой степенями дифференцировки клеток к опухолям с низкой степенью дифференцировки частота метилирования гена *MIR-9-1* увеличивается в 5 раз (от 17% до 88%), а гена *MIR-9-3* — в 9 раз (от 6% до 56%).

Проведено сравнение частот метилирования всех исследованных генов микроРНК в группе пациенток, у которых выявлено метастазирование в региональные лимфатические узлы или/и отдаленных органах, или/и в брюшине (17 женщин), и в группе пациенток, у которых метастазирование не выявлено

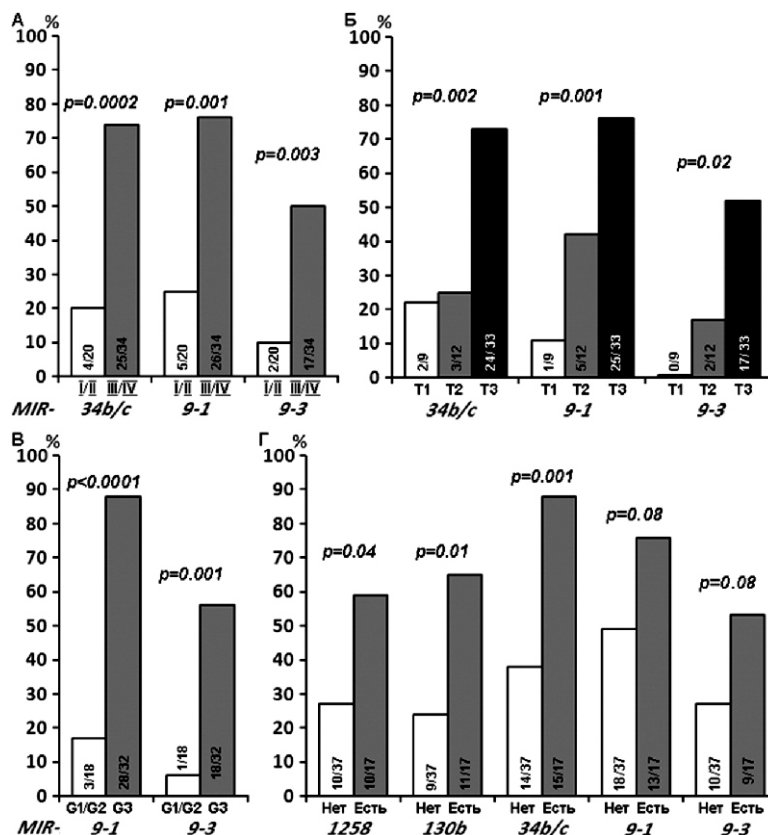


Рис. 1. Зависимость между частотой метилирования генов микроРНК (*MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*) и прогрессией рака яичников.

А — клиническая стадия; Б — размер и степень инвазии опухоли: T1, T2, T3 соответствуют T1a-с, T2a-с, T3a-с [18]; В — степень дифференцировки; Г — метастазирование: НЕТ — группа пациенток без метастазов, ЕСТЬ — группа пациенток с метастазами.

(37 женщин). Показана значимая ( $p < 0.05$ ) ассоциация гиперметилирования с метастазированием для 3 генов микроРНК (*MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*), и на уровне тенденции для генов *MIR-9-1* и *MIR-9-3* (рис. 1, Г). Наиболее сильная ассоциация с метастазированием выявлена для генов *MIR-130b* и *MIR-34b/c* ( $p < 0,01$ , что статистически значимо при  $FDR = 0,05$ ).

Так как метастазирование является наиболее важным связанным с выживаемостью прогностическим фактором, метилирование исследуемых 7 генов было изучено на дополнительной выборке из образцов опухолей, собранных вместе с метастазами опухоли яичника в брюшину во время хирургического удаления опухоли у 13 пациенток. Результаты представлены на рис. 2. Дополнительная выборка образцов включала:

- 1) 3 триплета, состоящие из образцов условно-нормальных тканей, первичных опухолей и перитонеальных метастазов (Мп1-Мп3);
- 2) 10 первичных опухолей и парных перитонеальных метастазов (Мп4-Мп13).

Из рис. 2 видно метилирование 5 из 7 генов микроРНК в большинстве первичных опухолей и перитонеальных метастазах, как в триплетах, так и парах, но отсутствие метилирования генов микроРНК в нормальных образцах, представленных в 3 триплетах (Мп1-Мп3). Можно отметить, что метилирование генов *MIR-107* и *MIR-212* выявлено только в двух парных образцах первичной опухоли и метастаза, в то время как метилирование 5 генов *MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1* и *MIR-9-3* выявлено соответственно в 6, 9, 7, 8 и 6 парных образцах первичной (родительской) и вторичной опухоли (или метастаза).

Полученные результаты подтвердили системную роль гиперметилирования 5 генов микроРНК *MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1* и *MIR-9-3* в эпигенетической модификации ДНК первичных опухолей в процессе метастазирования. Что касается дальнейших эпигенетических aberrаций

в клетках уже вторичных опухолей, мы не видим глобальных изменений в статусе метилирования этих 5 генов микроРНК при сравнении тканей метастазов и первичных опухолей. В то же время, и нет полного соответствия между каждой первичной опухолью и метастазом. Можно предположить, что имеют место оба события: как появление нового метилирования в образцах метастазов при его отсутствии в первичной опухоли, так и исчезновение метилирования во вторичной опухоли при наличии его в первичной.

В данной работе показана высокая частота гиперметилирования 6 генов микроРНК *MIR-107*, *MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3* ( $p < 10^{-3}$ ,  $FDR = 0,01$ ), и полное отсутствие изменений в статусе метилирования *MIR-212* в злокачественных опухолях яичников. Гиперметилирование вносит вклад в подавление экспрессии генов-супрессоров и генов микроРНК в опухолях разных локализаций [20]. Наши результаты по гиперметилированию *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3* и *MIR-130b* в злокачественных опухолях яичников расширяют предыдущие наблюдения и подтверждают данные, полученные в других исследованиях о супрессорной функции кодируемых ими микроРНК *miR-34b*, *miR-34c*, *miR-9*, *miR-130b* при раке яичников [21-24]. Гиперметилирование *MIR-107* и *MIR-1258* в опухолях яичников согласуются с данными литературы о супрессорных функциях *miR-107* при раке молочной железы и *miR-1258* при раке желудка [25, 26].

Отсутствие изменений в статусе метилирования *MIR-212* в опухолях яичников, по-видимому, объясняется более значимым вкладом модификаций гистонов, чем метилирования ДНК в регуляцию уровня *miR-212*, как это было отмечено при немелкоклеточном раке легкого [27].

В представленной работе также установлена связь гиперметилирования 5 генов микроРНК (*MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*) с параметрами прогрессии рака яичников, в том числе с метастазированием.

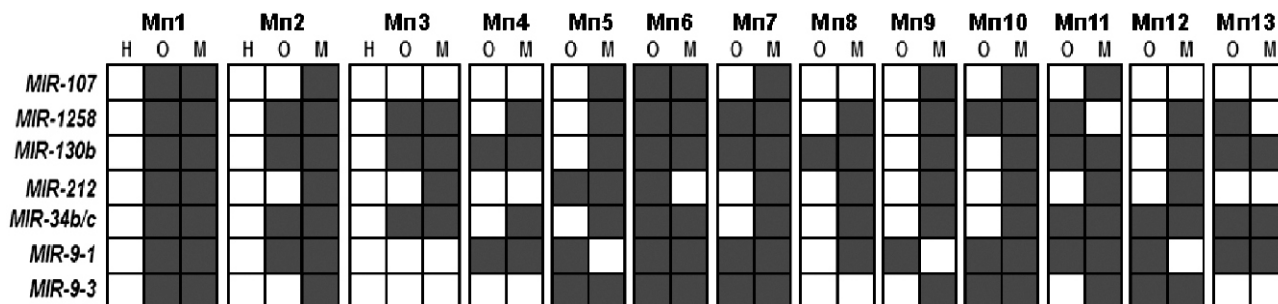


Рис. 2. Паттерны метилирования 7 генов микроРНК в 3 триплетах (Мп1, Мп2, Мп3) и в 10 образцах опухолей с перитонеальными метастазами (Мп4-Мп13), собранных от 13 пациенток.

Примечание. Н – гистологически неизменная (условно-нормальная) ткань яичников, О – первичная опухоль, М – метастаз. Серый квадратик указывает на выявление метилирования в образце, белый квадратик – отсутствие метилирования данного гена.

Связь гиперметилирования *MIR-130b* с метастазированием рака яичников подтверждает представление об антиметастатических свойствах *miR-130b* и согласуется с данными о способности *miR-130b* подавлять клеточную подвижность и инвазию в клеточной культуре рака яичников, а также с данными о роли эпигенетической инактивации *MIR-130b* в развитии множественной лекарственной устойчивости при раке яичников [24, 28]. Сниженная экспрессия этой микроРНК также ассоциирована с III—IV клиническими стадиями этого заболевания [24, 28].

Установленная нами значимая связь гиперметилирования *MIR-1258* с метастазированием рака яичников согласуется с данными о роли этой микроРНК в подавлении метастазирования при раке молочной железы и желудка, а также с данными о прогрессировании рака печени при потере микроРНК *miR-1258* [26, 29—31]. Вовлеченность *miR-1258* в подавление прогрессии и метастазирования опосредуется через её мишени — гепараназу и протеинкиназу *CDC28* [26, 29—31].

Результаты, полученные на перитонеальных метастазах, подтвердили системное участие гиперметилирования 5 генов микроРНК *MIR-1258*, *MIR-130b*, *MIR-34b/c*, *MIR-9-1* и *MIR-9-3* в эпигенетической модификации ДНК первичных опухолей во время процесса метастазирования.

В отношении дальнейших эпигенетических aberrаций в клетках уже вторичных опухолей, мы не обнаружили глобальных изменений в статусе метилирования данных 5 генов микроРНК в перитонеальных метастазах в сравнении с первичной опухолью. Однако в некоторых образцах первичных опухолей и перитонеальных метастазов наблюдаются дополнительные изменения, причем как появление дополнительного метилирования в метастазах при его отсутствии в первичной опухоли, так и потеря метилирования во вторичной опухоли при его наличии в первичной. Известно, что метастатические клетки в процессе продвижения от первичной опухоли претерпевают дальнейшие изменения, например, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), который может динамично обращаться вспять, и тогда клетки могут претерпевать обратный мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП), как и другие процессы репрограммирования опухолевой клетки в процессе ее миграции и колонизации в органе-мишени [1]. По-видимому, вторичная опухоль может, например, обладать характеристиками эпителиальных клеток в большей степени, чем исходная родительская опухоль.

Так, интересная особенность обнаружена для *miR-424*, уровень которой повышен в первичных опухолях рака молочной железы, но понижен в метастазах по сравнению с родительскими первичными опухолями [32]. Авторы предполагают двухфазное изменение экспрессии этой микроРНК при смене ЭМП на МЭП.

При ЭМП *miR-424* проявляет свойства онкогена, а при обратном переходе, МЭП, она выступает как антиметастатическая и супрессорная микроРНК.

В работе голландских исследователей с участием Консорциума по метастазам рака молочной железы отмечено, что изменения экспрессии микроРНК в макро-метастазах в сравнении с первичной «метастазирующей» опухолью не такие выраженные, как между «метастазирующей» опухолью и «неметастазирующей»; хотя и выявлено изменение уровня экспрессии отдельных микроРНК [33].

Следует отметить, что, несмотря на то, что к настоящему времени накоплена обширная информация о влиянии микроРНК на метастазирование рака яичников (точнее на свойства «метастазирующих» первичных опухолей; обзоры [6, 7]), практически отсутствуют работы направленные на изучение функции микроРНК и тем более метилирования генов микроРНК в макро-метастазах, в том числе перитонеальных метастазах рака яичников. И наше исследование в этом смысле можно считать пионерским.

### Литература

(п.п. 3—5: 7—10; 14—18; 20—33 см. References)

1. Чикина А.С., Александрова А.Ю. Метастазирование: клеточные механизмы и их регуляция. *Молекулярная биология*. 2014; 48(2): 195-213. doi: 10.1134/S0026893314020046.
2. Логинов В.И., Рыков С.В., Фридман М.В., Брага Э.А. Метилирование генов микроРНК и онкогенез. *Биохимия*. 2015; 80(2): 184-203. doi: 10.1134/S0006297915020029.
6. Брага Э.А., Фридман М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярные механизмы в метастазировании рака яичников: ключевые гены и регуляторные микроРНК. *Биохимия*. 2017; 82(5): 717-731. doi: 10.1134/S0006297917050017.
11. Рыков С.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Логинов В.И., Брага Э.А. Новые гены микроРНК, подверженные метилированию в опухолях легкого. *Генетика*. 2013; 49(7): 896-901. doi: 10.1134/S1022795413070119.
12. Береснева Е.В., Рыков С.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Ермилова В.Д., Казубская Т.П. и др. Профиль метилирования группы генов микроРНК при светлоклеточном почечноклеточном раке. Связь с прогрессией рака. *Генетика*. 2013; 49(3): 366-75. doi: 10.1134/S1022795413030034.
13. Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Хоконова В.В., Куревлев С.В., Казубская Т.П. и др. Новые гены микроРНК, гиперметилированные при раке молочной железы. *Молекулярная биология*. 2016; 50(5): 797-802. doi: 10.1134/S0026893316050101.
19. Брага Э.А., Фридман М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярные механизмы в метастазировании рака яичников: ключевые гены и регуляторные микроРНК. *Биохимия*. 2017; 82(5): 717-731. doi: 10.1134/S0006297917050017.



## References

- Chikina A.S., Aleksandrova A.Iu. The cellular mechanisms and regulation of metastasis formation. *Molekulyarnaya biologiya*. 2014; 48(2): 165-80; DOI: 10.1134/S0026893314020046. (in Russian)
- Loginov V.I., Rykov S.V., Fridman M.V., Braga E.A. Methylation of miRNA genes and oncogenesis. *Biokhimiya*. 2015; 80(2): 145-62. doi: 10.1134/S0006297915020029. (in Russian)
- Chan S.H., Wang L.H. Regulation of cancer metastasis by microRNAs. *J Biomed Sci*. 2015; 22: e9. doi: 10.1186/s12929-015-0113-7.
- Kinose Y., Sawada K., Nakamura K., Kimura T. The role of microRNAs in ovarian cancer. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: e249393. doi: 10.1155/2014/249393.
- Coward J.I., Middleton K., Murphy F. New perspectives on targeted therapy in ovarian cancer. *Int J Womens Health*. 2015; 7: 189-203. doi: 10.2147/IJWH.S52379.
- Braga E.A., Fridman M.V., Kushlinskii N.E. Molecular Mechanisms of Ovarian Carcinoma Metastasis: Key Genes and Regulatory MicroRNAs. *Biokhimiya*. 2017; 82(5): 529-41. doi: 10.1134/S0006297917050017. (in Russian)
- Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, Nopora A. Potential microRNA-related Targets for Therapeutic Intervention with Ovarian Cancer Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2018; 15(1): 1-15. DOI:10.21873/cgp.20061.
- Shi M., Mu Y., Zhang H., Liu M., Wan J., Qin X. et al. MicroRNA-200 and microRNA-30 family as prognostic molecular signatures in ovarian cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(32): e11505. doi: 10.1097/MD.00000000000011505.
- Kunej T., Godnic I., Ferdin J., Horvat S., Dovc P., Calin G.A. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mutat Res*. 2011; 717(1-2): 77-84. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.008.
- Piletic K., Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol*. 2016; 90(10): 2405-19. doi: 10.1007/s00204-016-1815-7.
- Rykov S.V., Khodyrev D.S., Pronina I.V., Kazubskaya T.P., Loginov V.I., Braga E.A. Novel miRNA genes methylated in lung tumors. *Genetika*. 2013; 49(7): 782-6. doi: 10.1134/S1022795413070119. (in Russian)
- Beresneva E.V., Rykov S.V., Hodyrev D.S., Pronina I.V., Ermilova V.D., Kazubskaya T.P. et al. Methylation profile of group of miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma; involvement in cancer progression. *Genetika*. 2013; 49(3):320-8. doi: 10.1134/S1022795413030034. (in Russian)
- Loginov V.I., Burdennyy A.M., Pronina I.V., Khokhlova V.V., Kurevljov S.V., Kazubskaya T.P. et al. Novel miRNA genes hypermethylated in breast cancer. *Molekulyarnaya biologiya*. 2016; 50(5):705-9. doi: 10.1134/S0026893316050101. (in Russian)
- Weisenberger D.J., Liang G., Lenz H.J. DNA methylation aberrancies delineate clinically distinct subsets of colorectal cancer and provide novel targets for epigenetic therapies. *Oncogene*. 2018; 37(5): 566-577. doi: 10.1038/onc.2017.374.
- Torres-Ferreira J., Ramalho-Carvalho J., Gomez A., Menezes F.D., Freitas R., Oliveira J. et al. MiR-193b promoter methylation accurately detects prostate cancer in urine sediments and miR-34b/c or miR-129-2 promoter methylation define subsets of clinically aggressive tumors. *Mol Cancer*. 2017; 16(1): e26. doi: 10.1186/s12943-017-0604-0.
- Li X., Pan Q., Wan X., Mao Y., Lu W., Xie X. et al. Methylation-associated Has-miR-9 deregulation in paclitaxel-resistant epithelial ovarian carcinoma. *BMC Cancer*. 2015; 15: e509. doi: 10.1186/s12885-015-1509-1.
- Loginov V.I., Pronina I.V., Burdennyy A.M., Filipova E.A., Kazubskaya T.P., Kushlinsky D.N. et al. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis. *Gene*. 2018; 662:28-36. doi: 10.1016/j.gene.2018.04.005.
- Kurman R.J., Carcangiu M.L., Herrington C.S., Young R.H. (Eds.): WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. (4th edition). *IARC: Lyon* 2014.
- Braga E.A., Loginov V.I., Pronina I.V., Khodyrev D.S., Rykov S.V., Burdennyy A.M. et al. Upregulation of RHOA and NKIRAS1 genes in lung tumors is associated with loss of their methylation as well as with methylation of regulatory miRNA genes. *Biokhimiya*. 2015; 80(4): 483-94. doi: 10.1134/S0006297915040124. (in Russian)
- Vrba L., Munoz-Rodriguez J.L., Stampfer M.R., Futscher B.W. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(1):e54398. doi: 10.1371/journal.pone.0054398.
- Corney D.C., Flesken-Nikitin A., Godwin A.K., Wang W., Nikitin A.Y. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res*. 2007; 67(18): 8433-8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1585.
- Yu Z., Kim J., He L., Creighton C.J., Gunaratne P.H., Hawkins S.M. et al. Functional analysis of miR-34c as a putative tumor suppressor in high-grade serous ovarian cancer. *Biol Reprod*. 2014; 91(5): e113. doi: 10.1095/biolreprod.114.121988.
- Tang H., Yao L., Tao X., Yu Y., Chen M., Zhang R. et al. miR-9 functions as a tumor suppressor in ovarian serous carcinoma by targeting TLN1. *Int J Mol Med*. 2013; 32(2): 381-8. doi: 10.3892/ijmm.2013.1400.
- Paudel D., Zhou W., Ouyang Y., Dong S., Huang Q., Giri R. et al. MicroRNA-130b functions as a tumor suppressor by regulating RUNX3 in epithelial ovarian cancer. *Gene*. 2016; 586(1): 48-55. doi: 10.1016/j.gene.2016.04.001.
- Gao B., Hao S., Tian W., Jiang Y., Zhang S., Guo L. et al. MicroRNA-107 is downregulated and having tumor suppressive effect in breast cancer by negatively regulating brain-derived neurotrophic factor. *J Gene Med*. 2017; 19(12). doi: 10.1002/jgm.2932.
- Shi J., Chen P., Sun J., Song Y., Ma B., Gao P. et al. MicroRNA-1258: An invasion and metastasis regulator that targets heparanase in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2017; 13(5): 3739-45. doi: 10.3892/ol.2017.5886.
- Incoronato M., Urso L., Portela A., Laukkanen M.O., Soini Y., Quintavalle C. et al. Epigenetic regulation of miR-212 expression in lung cancer. *PLoS One*. 2011; 6(11): e27722. doi: 10.1371/journal.pone.0027722.
- Yang C., Cai J., Wang Q., Tang H., Cao J., Wu L. et al. Epigenetic silencing of miR-130b in ovarian cancer promotes the development of multidrug resistance by targeting colony-stimulating factor 1. *Gynecol Oncol*. 2012; 124(2): 325-34. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.10.013.
- Zhang L., Sullivan P.S., Goodman J.C., Gunaratne P.H., Marchetti D. MicroRNA-1258 suppresses breast cancer brain metastasis by targeting heparanase. *Cancer Res*. 2011; 71(3): 645-54. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1910.
- Tang D., Zhang Q., Zhao S., Wang J., Lu K., Song Y. et al. The expression and clinical significance of microRNA-1258 and heparanase in human breast cancer. *Clin Biochem*. 2013; 46(10-11): 926-32. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.01.027.

31. Hu M., Wang M., Lu H., Wang X., Fang X., Wang J. et al. Loss of miR-1258 contributes to carcinogenesis and progression of liver cancer through targeting CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B. *Oncotarget*. 2016; 7(28): 43419-43431. doi: 10.18632/oncotarget.9728.

32. Drasin D.J., Guarnieri A.L., Neelakantan D., Kim J., Cabrera J.H., Wang C.A. et al. TWIST1-Induced miR-424 Reversibly Drives Mesenchymal Programming while Inhibi-

ting Tumor Initiation. *Cancer Res*. 2015; 75(9): 1908-21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2394.

33. Schrijver W.A., van Diest P.J.; Dutch Distant Breast Cancer Metastases Consortium., Moelans C.B. Unravelling site-specific breast cancer metastasis: a microRNA expression profiling study. *Oncotarget*. 2017; 8(2): 3111-23. doi: 10.18632/oncotarget.13623.

### Сведения об авторах:

*Бурденный Алексей Михайлович*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

*Уткин Дмитрий Олегович*, врач-хирург, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

*Филиппова Елена Александровна*, аспирант, мл. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

*Логинов Виталий Игоревич*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП и ст. науч. сотр. лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный Центр»;

*Пронина Ирина Валерьевна*, канд. биол. наук, науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

*Фридман Марина Владиславовна*, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. системной биологии и вычислительной генетики ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН;

*Казубская Татьяна Павловна*, доктор мед. наук, врач-онкогенетик, ст. науч. сотр. лаб. клинической онкогенетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

*Кушлинский Николай Евгеньевич*, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, зав. отделом клинической биохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

*Брага Элеонора Александровна*, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., зав. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП и вед. науч. сотр. лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный Центр».

Салеева Д.В.<sup>1</sup>, Михайлов В.Ф.<sup>1</sup>, Шуленина Л.В.<sup>1</sup>, Виноградов В.В.<sup>3</sup>,  
Бахтин А.А.<sup>3</sup>, Акопян К.В.<sup>3</sup>, Незнанова М.В.<sup>1</sup>, Засухина Г.Д.<sup>2</sup>

## Функционирование регуляторных РНК, влияющих на развитие опухолевых клеток, у больных раком гортани

<sup>1</sup> Государственный научный центр «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, 123098, г. Москва, Россия, ул. Маршала Новикова, д. 23

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 117971, г. Москва, Россия, ул. Губкина, д. 3

<sup>3</sup> Федеральный научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА России, 123182, г. Москва, Россия, Волоколамское шоссе, д. 30, корп. 2

**Цель.** Определение прогностической значимости и роли экспрессии некодирующих РНК (длинные РНК и микроРНК), и белка кодирующих генов в патогенезе рака гортани. **Методика.** Исследован биопсийный материал и периферическая кровь 35 пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак гортани (ПРГ) с классификацией от T1N0M0 до T4N1M0. Контролем служили образцы близлежащей гистологически неизменной ткани гортани тех же больных. Для оценки экспрессии генов исследовали кровь 27 здоровых доноров. Содержание мРНК генов (*p53*, *CCND1*, *ORA0V1*, *hPTEN*), длинных некодирующих РНК (днРНК): *NEAT1*, *MALAT1*, *ROR*, а также зрелых микроРНК (*miR-21*, *miR-27a*, *miR-34a*, *miR-101*, *miR-124*, *miR-125b*, *miR-181a*) в опухолевой ткани и крови определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). **Результаты.** Выявлено увеличение содержания мРНК генов *CCND1*, *hPTEN*, днРНК *NEAT1*, *MALAT1* и *miR-21*, *miR-27a* в крови у пациентов с ПРГ. Установлено, что уровень мРНК генов *CCND1*, *ORA0V1* был значимо выше при исследовании биоптатов у больных 3-й — 4-й стадии, чем у больных 1-й — 2-й стадии заболевания. Такая же закономерность выявлена для днРНК *NEAT1*, *MALAT1* и для *miR-101*. Экспрессия *miR-27a* и *miR-124* на более поздних стадиях болезни была ниже, чем у пациентов 1—2 стадии. **Заключение.** Выявлена возможность использования исследованных днРНК, микроРНК и мРНК белоккодирующих генов для индивидуального прогноза заболевания при создании панели биомаркеров.

**Ключевые слова:** плоскоклеточная карцинома гортани; микроРНК; длинные некодирующие РНК; биомаркеры; экспрессия.

**Для цитирования:** Салеева Д.В., Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Виноградов В.В., Бахтин А.А., Акопян К.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д. Функционирование регуляторных РНК, влияющих на развитие опухолевых клеток, у больных раком гортани. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 67—74.

DOI:

**Для корреспонденции:** Салеева Дарья Владиславовна, e-mail: dasha\_saleeva@inbox.ru

**Финансирование.** Работа выполнена с финансовой поддержкой по гранту РФФИ (16-03-00013).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 23.01.2018

Saleeva D.V.<sup>1</sup>, Mikhailov V.F.<sup>1</sup>, Shulenina L.V.<sup>1</sup>, Vinogradov V.V.<sup>3</sup>, Bakhtin A.A.<sup>3</sup>,  
Akopian K.V.<sup>3</sup>, Neznanova M. V.<sup>1</sup>, Zasukhina G.D.<sup>2</sup>

## Activities of regulatory RNAs that affect development of tumor cells in patients with laryngeal cancer

<sup>1</sup> A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Marshala Novikova Str. 23, 123098, Moscow, Russia

<sup>2</sup> V.I. Vavilov Institute of General Genetics, the Russian Academy of Sciences, Gubkina Str. 3, 117971, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Clinical Research Centre for Otorhinolaryngology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Volokolamskoe Shosse 30, Bldg 2, 123182, Moscow, Russia

**Aim.** To study the role of non-coding RNA (long RNAs and microRNAs) expression and protein-coding genes in the pathogenesis of laryngeal cancer to determine their prognostic significance for oncotransformation. **Methods.** The expression of long non-coding RNAs, microRNAs and protein-coding genes was examined in biopsy samples (fresh frozen tissue) and peripheral blood samples from 35 patients with laryngeal squamous cell cancer (LSCC) at T1N0M0 — T4N1M0 stages. Samples of surrounding, histologically unchanged tissues collected from the same patients were used as control. Gene expres-

sion was evaluated in blood samples from 27 healthy donors. Contents of gene mRNAs (*p53*, *CCND1*, *ORAOV1*, *hPTEN*), long non-coding RNAs (lncRNA) (*NEAT1*, *MALAT1*, *ROR*), and mature miRNAs (miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-101, miR-124, miR-125b, miR-181a) were measured in tissue and blood using real-time PCR. **Results.** Contents of *CCND1* and *hPTEN* gene mRNAs, lncRNAs (*NEAT1*, *MALAT1*), miR-21, and miR-27a were increased in blood of patients with LSCC. Levels of *CCND1* and *ORAOV1* gene mRNAs were significantly higher in biopsy samples from stage 3-4 patients compared to stage 1-2 patients. A similar expression pattern was observed for lncRNAs *NEAT1* and *MALAT1* and miR-101. On the other hand, expression of miR-27a and miR-124 was lower at later stages than at stages 1-2. **Conclusion.** The studied lncRNAs, microRNAs and protein-coding genes can be used in development of a biomarker panel for individual prognosis of the disease.

**Keywords:** laryngeal squamous cell carcinoma; microRNA; long non-coding RNA; biomarkers; expression.

**For citation:** Saleeva D.V., Mikhailov V.F., Shulenina L.V., Bakhtin A.A., Vinogradov V.V., Akopian K.V., Neznanova M.V., Zasukhina G.D. Activities of regulatory RNAs that affect development of tumor cells in patients with laryngeal cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 67—74. (In Russian).

**DOI:**

**Acknowledgement.** The study was supported by the grant Russian Foundation for Basic Research grant (16-03-00013).

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

#### Information about authors:

Saleeva D.V., <https://orcid.org/0000-0002-5870-5594>  
Mikhailov V.F., <https://orcid.org/0000-0001-9170-3526>  
Shulenina L.V., <https://orcid.org/0000-0003-2215-4193>  
Zasukhina G.D., <https://orcid.org/0000-0002-9871-0902>  
Bakhtin A.A., <https://orcid.org/0000-0003-0232-0545>  
Akopian K.V., <https://orcid.org/0000-0002-7619-314X>  
Vinogradov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-7808-5396>  
Neznanova M. V., <https://orcid.org/0000-0002-0635-6783>

Received 23.01.2018

## Введение

Плоскоклеточный рак гортани (ПРГ) занимает 7-е место среди наиболее распространенных опухолей в мире, а смертность — на 6-м месте среди других видов этой патологии [1].

В последнее время интенсивно изучаются генетические механизмы развития ПРГ [2, 3]. Установлено, что при формировании опухолей наблюдаются мутации в генах *p53* и *hPTEN*, в связи с чем онкосупрессорные свойства белков этих генов снижаются, увеличивается число копий генов *CCND1*, *ORAOV1* и *NEAT1*, расположенных в 11 хромосоме [4—6].

Эпигенетические изменения являются необходимым звеном при онкотрансформации и, в отличие от структурных повреждений генома, поддаются коррекции. Поэтому определение регуляторных РНК, важных для формирования карциномы гортани может быть полезно не только для индивидуального прогноза заболевания, но и для проведения эффективной терапии [7]. В настоящее время, очевидно, что для точной диагностической и прогностической оценки ПРГ необходимо создание панели маркеров, состоящей из комплекса таких показателей. Из изменяющихся со-тен микроРНК и днРНК в данном исследовании нами проверена возможность использования наиболее

перспективных из них, таких, как miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-101, miR-181a и днРНК *MALAT1*, *ROR* и *NEAT1*, с увеличенной экспрессией в опухолях ПРГ, а также miR-124, miR-125b, содержание которых в опухоли может как увеличиваться, так и снижаться [8—12].

*Цель исследования:* изучение экспрессии некодирующих РНК (длинные РНК и микроРНК) и структурных генов в патогенезе плоскоклеточного рака гортани и определение их прогностической значимости.

## Методика

Для изучения экспрессии днРНК, микроРНК, а также мРНК белоккодирующих генов использовали биопсийный материал и периферическую кровь 35 пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак гортани (классификация T1N0M0 — T4N1M0). В качестве контроля для оценки уровня экспрессии генов в опухоли гортани служили образцы близлежащей гистологически неизменной ткани тех же самых больных, а для оценки экспрессии генов в крови в исследовании были включены здоровые доноры в количестве 27 человек (по данным Центра переливания крови Минздрава России) и 5 человек

с парезом гортани без онкологических заболеваний. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменно-добровольного информированного согласия пациентов. Работа одобрена этической комиссией.

Содержание мРНК генов, днРНК, а также зрелых микроРНК в опухолевой ткани и крови определяли методом ПЦР в реальном времени. Биопсийный образец от каждого пациента (0,05г), подвергали гомогенизации в растворе охлажденного тризола (0,5 мл). Общую РНК, содержащую фракцию зрелых микроРНК, получали с использованием коммерческого набора «Trizol RNA Prep 100» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Обратную транскрипцию для мРНК генов и длинных некодирующих РНК осуществляли с помощью набора «GenePak RT Core» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) по стандартному протоколу, представленному фирмой-производителем. Для обратной транскрипции зрелых микроРНК использовался тот же набор лиофилизированных реагентов «GenePak RT Core» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия), содержащий вместо случайных гекса-, нанонуклеотидных праймеров специфический шпилькообразный праймер к зрелой микроРНК. Обратная транскрипция проводилась по схеме: 16°C/30 мин, 42°C/30 мин, 85°C/5 мин. Затем проводили ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе «DTPrime 5M3» («НПО ДНК-Технология», Россия) с применением наборов «Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)» или «Thermo Scientific Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X)» («Thermo Scientific», США) и специфических праймеров. Для выбора олигонуклеотидной последовательности праймеров и флуоресцентно-меченных зондов к исследуемым генам, а также температурного профиля ПЦР была использована биоинформационная база данных NCBI и собственные данные [13]. Последовательность праймеров для днРНК соответствовала приведенным в работах [14, 15] (условия проведения ПЦР-РВ адаптированы к нашим условиям). Расчет относительной экспрессии исследуемых генов и микроРНК проводили с использованием метода  $\Delta\Delta Ct$ . В качестве референсного гена использовали ген *b-actin*, имеющий относительно постоянный уровень экспрессии в опухоли гортани и периферической крови больных. Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета статистических программ «Statistica 7.0». Каждую ПЦР проводили не менее двух раз. Для оценки статистической значимости различий применяли непараметрический критерий Манна—Уитни и Фишера. В присутствии нулевого варианта использовали тест Шеллинга—Вольфейля. Различия считали значимыми при уровне показателя  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Исследование выбранных нами показателей может иметь как диагностическую, так и прогностическую значимость.

Результаты, полученные при обследовании всех 35 пациентов вне зависимости от пола, стадии заболевания и возраста до лечения представлены в табл. 1.

Обращает на себя внимание, что изменение содержания мРНК в опухолях отлично от их изменения содержания в крови. Проведенное исследование позволило установить, что из всех изученных нами показателей статистически значимые различия между опухолью и контрольным плоскоклеточным эпителием наблюдались у *hPTEN*, *miR-21* и *miR-27a*. Содержание мРНК гена *hPTEN* в опухолях составляла 0,57, что почти в 2 раза ниже контрольного уровня, принятого за единицу, экспрессия микроРНК *miR-21* была увеличена в 7,5 раз в опухолевой ткани, а микроРНК *miR-27a* — снижена почти в 2 раза по отношению к контрольной группе.

Как клеточный регулятор и супрессор опухолей *hPTEN* препятствует пролиферации, выживанию и росту клеток. Полученный нами результат о снижении содержания гена *hPTEN* при ПРГ соответствует литературным данным о функционировании его как онкосупрессора [16].

Как видно из табл. 1, экспрессия *miR-21* увеличивается в опухолях по сравнению с контрольной группой в 7,5 раз, что указывает на его роль, как онкогена. Аналогичные результаты были получены также другими авторами по изменению значения *miR-21* в опухолях гортани [17]. *MiR-21* играет важную роль в процессах онкогенеза: ассоциируется с плохим прогнозом, сниженным апоптозом, высокой инвазией и возможностью к метастазированию [10].

В работах по исследованию *miR-27a* показано, что для многих типов опухолей данная микроРНК, является онкогеном. Она стимулирует рост опухоли и развитие метастазов, на клеточном уровне поддерживая процесс миграции и инвазии в раковых клетках [18, 19]. Полученные данные о снижении экспрессии *miR-27a* при ПРГ соответствуют данным литературы о возможном онкосупрессорном действии *miR-27a* при плоскоклеточной карциноме [20].

По остальным показателям не было выявлено статистически значимых различий в экспрессии генов в биоптатах ПРГ, по сравнению с группой контроля. Отсутствие изменений можно объяснить тем, что в качестве контроля нами использовался эпителий здоровых тканей, расположенных в непосредственной близости с опухолью, клетки которой выбрасывают экзосомы, содержащие мРНК, микроРНК и днРНК, для осуществления межклеточной коммуни-

кации, что может приводить к увеличению показателей в окружающих опухоль тканях [21]. В исследованиях других авторов, в качестве контроля использовался биоптат плоскоклеточного эпителия гортани, взятого у добровольцев с диагнозами, не связанными с онкологией [19].

Сравнение показателей крови доноров и больных ПРГ подтверждает влияние опухоли на содержание РНК-продуктов в других тканях (в этом случае в качестве контроля использовалась периферическая кровь доноров без онкологических заболеваний). Отмечено 7 показателей, для которых уровень транскрипционной активности существенно отличается от таковой в группе доноров. Содержание мРНК гена *CCND1* в периферической крови у онкобольных в 24,3 раза выше, чем у здоровых доноров, мРНК гена *hPTEN* — в 2,55. Кроме того, статистически значимо повышается активность днРНК *MALAT1* и *NEAT1* в 2 и 1,7 раза соответственно. Транскрипционная активность *miR-21* в 73,7 раза, а активность *miR-27* — в 3,48 раза выше уровня нормы. Для *miR-124* наблюдается снижение активности в 67 раз в крови больных ПРГ по сравнению со здоровыми донорами. Полученные данные позволяют говорить только о диагностической значимости, поскольку в таблице приведена выборка значений, полученных от всех опухолей без их дифференцировки по стадиям.

Оценка прогностической значимости может осуществляться при помощи биомаркеров, позволяющих дифференцировать 1—2 и 3—4 стадии заболевания. Известно, что у больных 3—4 стадии прогноз значительно хуже, чем у больных 1—2 стадии, как по качеству, так и по продолжительности жизни после лечения [2]. Распределение пациентов (%) с высокими и низкими значениями исследуемых показателей для 1—2 стадии и 3—4 стадии ПРГ представлено в табл. 2.

В качестве контрольной группы были выбраны показатели экспрессии генов в окружающей опухоль нормальной ткани у пациентов 1—2 стадии ПРГ. Медиана контрольной группы принята за единицу. Изменения показателя более чем в 2 раза считалось как высокое (>2) или низкое (<0,5) значение. Высокий уровень содержания отмечен в таблице знаком ↑, низкий — ↓. Знаком суммы (Σ) обозначалась сумма более чем в 2 раза изменившихся уровней показателей. Число обследованных в каждой группе принято за 100%. Результаты представлены в процентах относительно общего числа пациентов соответствующей группы.

*NEAT1* — это днРНК, являющаяся транскрипционной мишенью гена *p53*, вовлекаемая в клеточный ответ на стресс или повреждение ДНК. Высокий уровень *NEAT1* ингибирует экспрессию *p53*, способствует увеличению пролиферации и выживаемости клеток, что ассоциируется с плохим прогнозом для

Таблица 1

Содержание мРНК генов, микроРНК и днРНК в опухолевой ткани и крови пациентов с плоскоклеточным раком гортани

Показатель	Биоптат ткани		Периферическая кровь	
	Опухоль	Контроль (окружающая опухоль ткань)	Пациенты	Доноры
мРНК гена <i>P53</i>	0,78 [0,43–1,03]	1,0 [0,46–1,32]	—	—
мРНК гена <i>CCND1</i>	0,812 [0,47–1,32]	1,0 [0,55–1,87]	24,3* [11,3–34,3]	1,0 [0,5–2,83]
мРНК гена <i>ORA0VI</i>	0,8 [0,004–2,46]	1,0 [0,2–3,2]	—	—
мРНК гена <i>hPTEN</i>	0,57* [0,32–0,93]	1,0 [0,53–2,0]	2,55* [2,0–3,03]	1,0 [0,57–2,0]
днРНК <i>NEAT1</i>	1,23 [0,81–2,46]	1,0 [0,75–1,62]	1,7* [1,6–2,64]	1,0 [0,4–1,86]
днРНК <i>MALAT1</i>	1,23 [0,75–2,14]	1,0 [0,49–1,57]	2,0* [1,31–2,63]	1,0 [0,46–2,0]
днРНК <i>ROR</i>	1,14 [0,71–1,86]	1,0 [0,55–1,8]	1,27 [0,68–2,22]	1,0 [0,55–1,68]
микроРНК <i>miR-21</i>	7,5* [5,2–13]	1,0 [0,57–2,1]	73,73* [21,11–137,18]	1,0 [0,21–3,06]
микроРНК <i>miR-27a</i>	0,53* [0,25–1,3]	1,0 [0,5–2,4]	3,48* [1,07–8,57]	1,0 [0,01–2,47]
микроРНК <i>miR-34a</i>	0,96 [0,21–1,19]	1,0 [0,25–3,68]	—	—
микроРНК <i>miR-101</i>	0,93 [0,5–1,9]	1,0 [0,4–1,9]	—	—
микроРНК <i>miR-124</i>	0,81 [0,35–1,31]	1,0 [0,5–1,31]	0,015* [0,005–0,27]	1,0 [0,07–2,73]
микроРНК <i>miR-125b</i>	1,52 [0,06–0,6]	1,0 [0,59–6,59]	—	—
микроРНК <i>miR-181a</i>	—	—	1,31 [0,3–3,4]	1,0 [0,4–3,03]

Примечание. \* — различия с показателями группы "Контроль" и "Доноры" статистически значимы (p<0,05). Медиана групп контроля ("окружающая опухоль ткань", или "доноры" для крови) принята за единицу.

онкологических больных [6]. Проведенное исследование показало прогностическую значимость днРНК *NEAT1*, поскольку у больных 3—4 стадии наблюдается статистически значимое увеличение содержания *NEAT1* как в опухоли, так и в окружающей ее ткани у 40% и 28,6%, соответственно, по сравнению с группой больных 1—2 стадии (табл. 2).

Известны другие днРНК, имеющие прогностическую ценность. Так, днРНК *ROR* проявляет свойства онкогена при многих видах рака [22]. В исследовании Zhang et al. было показано, что активация *p53* приводит к увеличению транскрипционной активности днРНК *ROR*, которая по механизму обратной петли угнетает экспрессию *p53* [23]. Полученные результаты показали, что в опухолях 1—2 стадии наблюдается высокое содержание днРНК *ROR* по сравнению с окружающими опухоль здоровыми тканями. Анализ индивидуальных значений экспрессии показал, что у 42,7% пациентов с 3—4 стадии в нормальном плоскоклеточном эпителии гортани уровень днРНК *ROR* также повышался.

В наших исследованиях статистически значимое увеличение экспрессии днРНК *MALAT1* выявлено у 18,8% в опухолях больных 3—4 стадии по сравнению с 8,3% в опухолях 1—2 стадии ( $p < 0,05$ ). Повышенная экспрессия *MALAT1* приводит к активации клеточной миграции, пролиферации и инвазии, а также выступает важным регулятором апоптоза [9].

Нами был исследован также ряд микроРНК. Экстремальные значения *miR-27a* наблюдались у 75% больных в 1—2 стадии и были выше, чем у пациентов в 3—4 стадии (42,8%). Данная микроРНК значима при развитии ПРГ, поскольку высокий уровень

этой микроРНК коррелирует с плохим прогнозом у больных [12].

*miR-101* может выполнять различные функции в клетке: подавление пролиферации клеток, активации апоптоза, ингибирования ангиогенеза и регуляции клеточного цикла [8]. *miR-101* проявляет себя как онкоген во многих типах рака, однако при ПРГ *miR-101* может замедлять развитие опухолей [24]. Нами было показано, что экспрессия *miR-101* в опухолях 3—4 стадии ПРГ была на низком уровне у 33% больных, в то время как у больных 1—2 стадии лишь у 9,1% ( $p < 0,05$ ). В нашем исследовании экстремальная экспрессия *miR-101* в опухолях 3—4 стадии была у 53,3% по сравнению с 27,3% больных 1—2 стадии. Таким образом, наблюдается более высокий уровень экспрессии онкосупрессора *miR-101* у больных 3—4 стадии, что позволяет судить о нем, как о перспективном прогностическом маркере.

В ряде работ было продемонстрировано, что экспрессия *miR-124* снижается при различных типах рака, кроме того, *miR-124* ассоциирована с опухолевым ростом, метастазированием и плохим прогнозом. Следует отметить, что в ряде работ [11, 25] у больных ПРГ была подчеркнута ее роль как онкосупрессора. Нами показано, что у 44,4% больных 1—2 стадии в опухолях наблюдается увеличение экспрессии *miR-124*, у 22,2% — снижение. В окружающей опухоль ткани содержание *miR-124* больных 3—4 стадии повышалось у 58,3%, а в опухолях той же группы — у 23,1%. Число пациентов с гиперэкспрессией *miR-124* в опухолях больных 3—4 стадии было значимо ниже по сравнению с группой опухолей у больных 1—2 стадии.

Таблица 2

Изменение экспрессии некодирующих РНК и белок-кодирующих генов у пациентов (%) 1—2 стадии (17 человек) и 3—4 стадии (18 человек) ПРГ

Показатель	1—2 ст. ПРГ						3—4 ст. ПРГ					
	Контроль			Опухоль			Контроль			Опухоль		
	↓, %	↑, %	Σ	↓, %	↑, %	Σ	↓, %	↑, %	Σ	↓, %	↑, %	Σ
мРНК гена <i>CCND1</i>	9	18	27	22,3*	11,1	33,4	14,3	35,7*	50*	21,4*	21,4	42,8*
мРНК гена <i>hPTEN</i>	18,2	9,1	27,3	0	0	0	0	40*	40	14,3	21,4**	35,7
мРНК гена <i>ORA0V1</i>	10	30	40	28,6*	14,3	42,9	46,1*	38,5	84,6*	71,4* **	14,3	85,7* **
днРНК <i>NEAT1</i>	27,3	0	27,3	0	0	0	7,1*	28,6*	35,7	0	40* **	40*
днРНК <i>ROR</i>	16,7	16,7	33,4	16,7	58,3*	75,0*	21,4	42,8*	64,2*	22,2	—	22,2
днРНК <i>MALAT1</i>	8,3	25	33,3	8,3	8,3*	16,6	37,5	0	37,5*	6,3	18,8**	25,1
микроРНК <i>miR-27a</i>	16,7	41,7	58,3	33,3*	41,7	75,0	0	71,4*	71,4	7,1*	35,7**	42,8**
микроРНК <i>miR-101</i>	18,2	27,3	45,5	9,1*	18,2*	27,3*	33,3	6,7*	40,0	33,3**	20,0	53,3**
микроРНК <i>miR-124</i>	20	0	20	22,2	44,4*	66,6*	0	58,3*	58,3*	15,4	23,1* **	38,5* **

Примечание. \* — различия с показателями группы "Контроль для 1—2 ст." статистически значимы ( $p < 0,05$ ). \*\* — отличия с показателями группы "Опухоль 1—2 ст." статистически значимы ( $p < 0,05$ ). Медиана показателей группы "ткань окружающая опухоль 1—2 стадии" принята за единицу.

Различия, наблюдаемые в уровнях экспрессии микроРНК и днРНК у пациентов, указывают на важность индивидуального определения этих показателей при выборе терапевтической цели. На рисунке представлены индивидуальные данные больных 1—2 и 3—4 стадий ПРГ по изучению показателей экспрессии днРНК *NEAT1*, днРНК *ROR*, мРНК генов *hPTEN* и *CCND1*, а также микроРНК *miR-27a* и *miR-124*, коррекция которых может быть использована в персонализированной терапии.

Анализ индивидуальной экспрессии днРНК *NEAT1* и *ROR* показал, что их содержание существенно увеличивается у пациентов с 3—4 стадией ПРГ (рис. а, б). Кроме того, в опухолях с более агрессивным течением (3 и 4 стадии) было обнаружено снижение экспрессии гена *hPTEN*, что может быть прогностическим маркером при оценке ответа на радиотерапию (рис. в).

Функционирование *CCND1* как онкогена, стимулирующего пролиферативные процессы в клетках плоскоклеточного эпителия, указывает на необходимость определения его содержания у больных. Нами

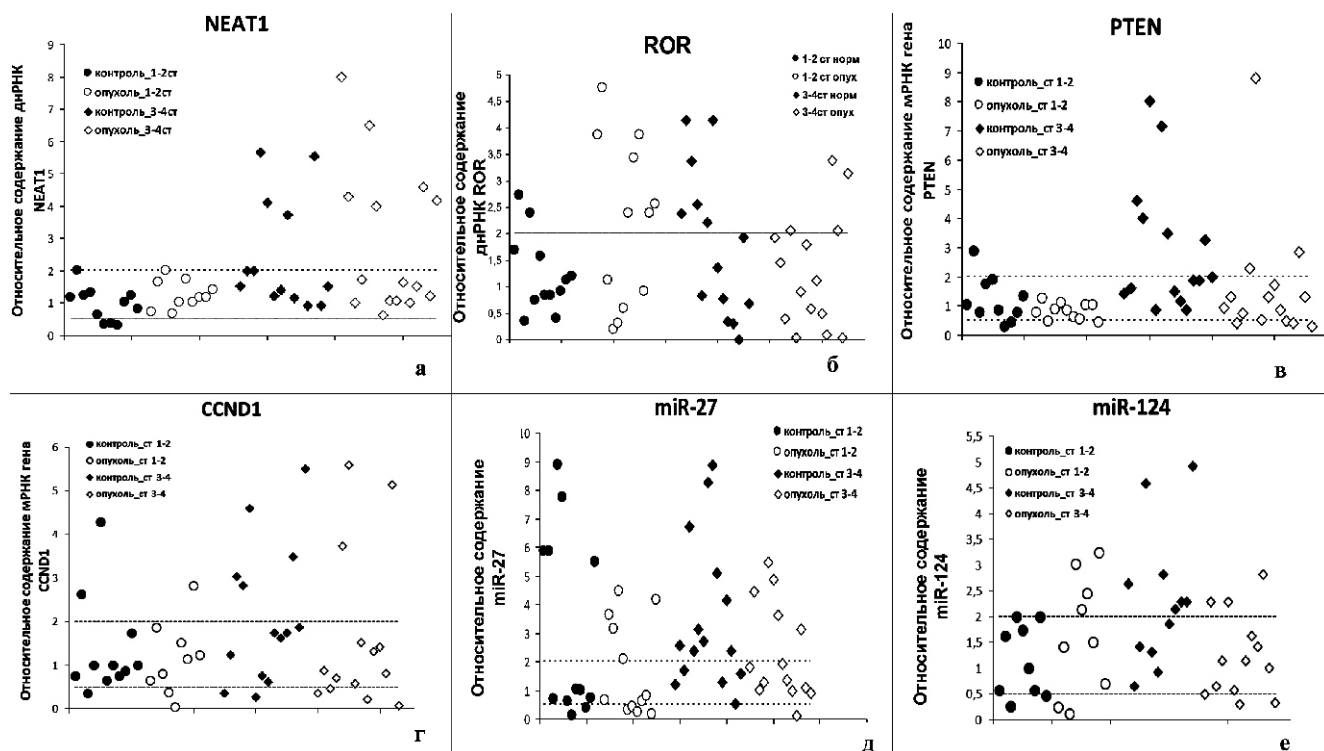
показано, что в биоптатах у пациентов с 3—4 стадиями заболевания, уровень *CCND1* существенно выше контрольного (рис. г). Обнаружение избыточной экспрессии *CCND1* поможет выявлять пациентов с плохим прогнозом и использовать этот показатель как прогностический.

Индивидуальные различия в экспрессии *miR-27a* показывают, что данная микроРНК значима при развитии ПРГ, и её содержание требует коррекции (рис. д).

Данные по выраженным индивидуальным различиям уровней экспрессии микро- и длинных РНК, имеют большое значение для диагностико-прогностических заключений и подходов к персонализированной терапии.

### Заключение

Профиль экспрессии мРНК и некодирующих РНК важен для понимания патогенеза онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний [13, 26]. Определение экспрессии таких соединений в биоптатах и биологиче-



Индивидуальные значения относительного содержания днРНК *NEAT1* (а), днРНК *ROR* (б), мРНК гена *hPTEN* (в), мРНК гена *CCND1* (г), микроРНК *miR-27a* (д), микроРНК *miR-124* (е) в опухолях пациентов 1—2 и 3—4 стадий ПРГ.

По оси ординат указаны значения относительного содержания изученных показателей, представленных по отношению к медиане соответствующих величин в окружающей опухоль гистологически неизменной ткани пациентов 1—2 стадии ПРГ, принятой за единицу.

Штриховые линии ( $y = 0,5$  и  $y = 2$ ) — линии двукратного увеличения или снижения значений по сравнению с медианой контрольной группы 1—2 ст ПРГ. Темным кружком обозначены индивидуальные показатели в окружающей опухоль нормальной ткани пациентов с 1—2 стадией ПРГ, светлым — в опухолях пациентов 1—2 стадии. Данные, полученные в нормальной ткани у пациентов 3—4 стадии обозначены на рисунке темным ромбиком, а в опухолях пациентов с ПРГ 3—4 стадии — светлым.



ских жидкостях может способствовать как ранней диагностике, так и определению стадии и прогноза заболевания. Продемонстрированное в работе увеличение экспрессии мРНК генов *CCND1*, *ORAOV1*, днРНК *NEAT1*, *MALAT1*, *ROR*, микроРНК *miR-21*, *miR-27a*, *miR-34*, *miR-101*, *miR-181a* и снижение функциональной активности онкосупрессоров свидетельствует о дисрегуляции систем сохранения стабильности генома и пролиферации, приводящих к развитию ПРГ. Коррекция содержания днРНК и микроРНК в опухолях, может играть ключевую роль в подходах к специфическим особенностям терапии.

Повышение и снижение экспрессии генов при ПРГ может влиять на устойчивость к химиотерапии или радиотерапии. В связи с этим перспективна разработка комбинированной терапии, включающей в себя направленное ингибирование или активацию функционирования генетических детерминант.

Полученные нами данные показали значительные отличия в экспрессии разных генов при одной и той же стадии заболевания в зависимости от особенностей индивида. Это необходимо учитывать при оценке прогностической значимости исследуемых показателей и их возможном использовании в клинической практике.

### Литература

(п.п. 1—6; 8—12; 14—25 см. References)

7. Засухина Г.Д., Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Васильева И.М. Роль некодирующих РНК в клетках человека после воздействия ионизирующей радиации. *Цитология*. 2017; 59(9): 563-73.
13. Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Раева Н.Ф., Салева Д.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д. МикроРНК в крови пациентов с раком предстательной железы как возможный показатель ранних осложнений лучевой терапии. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2017; 57(6): 598-607.
26. Калинин М.Н., Щеглова Н.Е. МикроРНК и полиморфизм генов их биогенеза в патогенезе атеросклероза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(1): 43-50.

### References

1. Yu Q., Li B., Li P., Shi Z., Vaughn A., Zhu L., Fu S. Plasma microRNAs to predict the response of radiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma patients. *Am J Transl Res*. 2015; 7 (10): 2060-71.
2. Darido C., Georgy S.R., Cullinane C., Partridge D.D., Walker R., Srivastava S. et al. Stage-dependent therapeutic efficacy in PI3K/mTOR-driven squamous cell carcinoma of the skin. *Cell Death Differ*. 2017; 1476-5403.
3. Lau H.K., Wu E.R., Chen M.K., Hsieh M.J., Yang S.F., Wang L.Y., Chou Y.E. Effect of genetic variation in microRNA binding site in WNT1-inducible signaling pathway protein 1 gene on oral squamous cell carcinoma susceptibility. *PloS one*. 2017; 12 (4).

4. Jiang L., Zeng X., Yang H., Wang Z., Shen J., Bai J., Zhang Y., Gao F., Zhou M., Chen Q. Oral cancer overexpressed 1 (ORAOV1): a regulator for the cell growth and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2008; 123 (8): 1779-86.
5. Musgrove E.A., Caldon C., Barraclough J., Stone A., Sutherland R.L. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2011; 11 (8): 558-72.
6. Yu X., Li Z., Zheng H., Chan M.T., Wu W.K. NEAT1: A novel cancer-related long non-coding RNA. *Cell proliferation*. 2017; 50 (2).
7. Zasukhina G.D., Mikhailov V.F., Shulenina L.V., Vasilyeva I.M. Role of non-coding RNA in human cells after radiation exposure. *Tsitologiya*. 2017; 59 (9): 563-73. (in Russian)
8. Barbato C., Pezzola S., Caggiano C., Antonelli M., Frisone P., Ciotti M.T., Ruberti F.A. lentiviral sponge for miR-101 regulates RanBP9 expression and amyloid precursor protein metabolism in hippocampal neurons. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014; 8 (9).
9. Feng J., Tian L., Sun Y., Li D., Wu T., Wang Y., Liu M. Expression of long non-coding RNA MALAT-1 is correlated with progress and apoptosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol*. 2012; 9 (4).
10. Folini M., Gandellini P., Longoni N., Profumo V., Callari M., Pennati M., Colecchia M., Supino R., Veneroni S. Salvioni R. et al. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. *Molecular Cancer*. 2010; 9 (12).
11. Hunt S., Jones A.V., Hinsley E.E., Whawell S.A., Lambert D.W. MicroRNA-124 suppresses oral squamous cell carcinoma motility by targeting ITGB1. *FEBS Lett*. 2014; 585 (1): 187-92.
12. Tian Y., Fu S., Qiu G.B., Xu Z.M., Liu N., Zhang X.W., Chen S., Wang Y., Sun K.L., Fu W.N. MicroRNA-27a promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting PLK2 in laryngeal carcinoma. *BMC cancer*. 2014; 14 (678).
13. Shulenina L.V., Mikhailov V.F., Raeva N.F., Saleva D.V., Neznanova M.V., Zasukhina G.D. MicroRNA in the Blood of Prostate Cancer Patients as a Possible Indicator of Development of Early Complications of Radiotherapy. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2017; 57 (6): 598-607. (in Russian)
14. Li Yu, Li Ya, Chen W., He F., Tan Z., Zheng J., Wang W., Zhao Q., Li J. NEAT expression is associated with tumor recurrence and unfavorable prognosis in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2015; 6 (29).
15. Zhang Y., Xia J., Li Q., Yao Y., Eades G., Gernapudi R., Duru N., Kensler T. W., Zhou Q. NRF2/Long Non-coding RNA ROR Signaling Regulates Mammary Stem Cell Expansion and Protects against Estrogen Genotoxicity. *Journal of biological chemistry*. 2014; 289 (45): 31310-8.
16. Shi Y., Wang J., Chandarlapaty S., Cross J., Thompson C., Rosen N., Jiang X. PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1. *Nature structural & molecular biology*. 2014; 21 (6): 522-7.
17. Arantes L.M., Laus A.C., Melendez M.E., de Carvalho A.C., Sorroche B.P., De Marchi P.R., Evangelista A.F., Scapulatempo-Neto C., de Souza Viana L., Carvalho A. L. MiR-21 as prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma patients undergoing an organ preservation protocol. *Oncotarget*. 2017; 8 (6): 9911-21.
18. Tang W., Zhu J., Su S., Wu W., Liu Q., Su F., Yu F. MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *PloS one*. 2012; 7 (12).

19. Tanaka K., Miyata H., Sugimura K., Fukuda S., Kanemura T., Yamashita K. et al. miR-27 is associated with chemoresistance in esophageal cancer through transformation of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts. *Carcinogenesis*. 2015; 36(8): 894-903.
20. Li W.Q., Yu H.Y., Zhong N.Z., Hou L.J., Li Y.M., He J. et al. MiR27a suppresses the clonogenic growth and migration of human glioblastoma multiforme cells by targeting BTG2. *International journal of oncology*. 2015; 46(4): 1601-8.
21. Yang C., Robbins P.D. The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clinical & developmental immunology*. 2011; 2011.
22. Qu C.H., Sun Q.Y., Zhang F.M., Jia Y.M. Long non-coding RNA ROR is a novel prognosis factor associated with non-small-cell lung cancer progression. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2017; 21 (18): 4087-91.
23. Zhang A., Zhou N., Huang J., Liu Q., Fukuda K., Ma D., Lu Z., Bai C., Watabe K., Mo Y.Y. The human long non-coding RNA-RoR is a p53 repressor in response to DNA damage. *Cell research*. 2013; 23 (3): 340-50.
24. Li M., Tian L., Ren H., Chen X., Wang Y., Ge J., Wu S., Sun Y., Liu M., Xiao H. MicroRNA-101 is a potential prognostic indicator of laryngeal squamous cell carcinoma and modulates CDK8. *Journal of translational medicine*. 2015; 13 (271).
25. Samsonov R., Burdakov V., Shtam T., Radzhabova Z., Vasilyev D., Tsyrlina E. et al. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental*. 2016; 37 (9): 12011-21.
26. Kalinkin M.N., Shcheglova N.E. MicroRNAs and polymorphism of genes of biogenesis in the pathogenesis of atherosclerosis. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(1): 43-50. (in Russian).

#### Сведения об авторах:

Салеева Дарья Владиславовна, мл. науч. сотр., e-mail: [dasha\\_saleeva@inbox.ru](mailto:dasha_saleeva@inbox.ru);

Михайлов Владимир Федорович, канд. биол. наук, зав. лаб. молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов;

Шульенина Лилия Викторовна, ст. науч. сотр., канд. биол. наук;

Засухина Галина Дмитриевна, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр.

Бахтин Артур Александрович, зав. лаб. патологической анатомии, канд. мед. наук, врач-патологоанатом;

Акопян Карен Валерьевич, канд. мед. наук, зав. отд-нием, врач-онколог;

Виноградов Вячеслав Вячеславович, доктор мед. наук, онколог, ЛОР-хирург высшей квалификационной категории;

Незнанова Мария Викторовна, мл. науч. сотр.

Соколовская А.А.<sup>1</sup>, Максимова М.Ю.<sup>3</sup>, Вирюс Э.Д.<sup>1</sup>, Московцев А.А.<sup>1,2</sup>,  
Иванов А.В.<sup>1</sup>, Александрин А.А.<sup>1</sup>, Кубатиев А.А.<sup>1,2</sup>

## Апоптоз и фенотип тромбоцитов у больных с острым ишемическим инсультом

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, Балтийская, 8

<sup>2</sup> ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

<sup>3</sup> Научный центр неврологии, 125367, Москва, Волоколамское ш., д. 80

Цель исследования — расширение представлений о роли апоптоза и фенотипе тромбоцитов у больных после острого ишемического инсульта и изучение прогностической ценности некоторых мембранно-связанных белков. **Методика.** Исследования выполнены на биологическом материале 18 пациентов в возрасте 59,0—78,0 лет с первичным ишемическим инсультом. Выделение тромбоцитов проводили методом иммуномагнитной сепарации в течение первых 24 ч и после 7 сут. ишемического инсульта. Для характеристики фенотипа тромбоцитов использовали моноклональные антитела. Анализ апоптоза тромбоцитов проводили по измерению экспрессии фосфатидилсерина (ФС) и с помощью белка Аннексина V. Для измерения митохондриального мембранного потенциала (ММП) использовали катионный краситель JC-1. **Результаты.** По нашим данным, процент тромбоцитов, экспрессирующих активационный маркер CD62p (P-селектин) был у пациентов в 1-е сут. инсульта выше, чем у здоровых субъектов (18,3% и 4,1% соответственно,  $p < 0,05$ ). Процент экспрессии ФС на тромбоцитах пациентов с инсультом в 1-е сут. инсульта был значительно выше, чем в контрольной группе (20,6% и 3,2% соответственно,  $p < 0,01$ ). Зафиксировано падение ММП в тромбоцитах человека у пациентов с инсультом в 1-е сут. инсульта до 70% против 94% в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). **Заключение.** Таким образом, при ишемии мозга имеет место изменение фенотипа тромбоцитов, повышение уровня экспрессии ФС, падение ММП. Всё это свидетельствует об усилении апоптоза и отражает факт активации тромбоцитов. Дальнейшее исследование фенотипических характеристик тромбоцитов в комбинации с биомаркерами апоптоза позволит лучше понять роль тромбоцитов при ишемическом инсульте и способствовать разработке методов для мониторинга эффектов антитромбоцитарной терапии.

**Ключевые слова:** тромбоциты; апоптоз; ишемический инсульт; аннексин-5; митохондриальный мембранный потенциал; проточная цитометрия.

**Для цитирования:** Соколовская А.А., Вирюс Э.Д., Максимова М.Ю., Московцев А.А., Иванов А.В., Кубатиев А.А. Апоптоз и фенотип тромбоцитов у больных с острым ишемическим инсультом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4) 75—83.

DOI:

**Для корреспонденции:** Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. регуляции агрегатного состояния крови, отдел молекулярной и клеточной патофизиологии, ФГБНУ НИИОПП, e-mail: alice.sokolovskaya@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила 10.09.2018

Sokolovskaya A.A.<sup>1</sup>, Maksimova M.Y.<sup>3</sup>, Virus E.D.<sup>1</sup>, Moskovtsev A.A.<sup>1,2</sup>,  
Ivanov A.V.<sup>1</sup>, Aleksandrin V.V.<sup>1</sup>, Kubatiev A.A.<sup>1,2</sup>

## Platelet apoptosis and phenotype in patients with acute ischemic stroke

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

<sup>2</sup> Russian Medical Academy of Postdoctoral Education, Barrikadnaya Str., 2/1, Bldg 1, Moscow 125993, Russia

<sup>3</sup> Research Center of Neurology, Volokolamskoye Shosse 80, Moscow 125367, Russia

**Aim.** To develop of knowledge of platelet apoptosis and phenotype in patients with acute ischemic stroke and to study the prognostic value of some membrane-bound proteins. **Method.** The study included 18 patients aged 59—78 with acute ischemic stroke. Platelet were isolated by immunomagnetic separation within the first 24 hours and at 7 days of ischemic stroke. The expression of surface antigens was measured using monoclonal antibodies. For detection of phosphatidylserine (PS) externalization platelets were incubated with Annexin V. The mitochondrial membrane potential (MMP) was mea-

sured using JC-1 during platelets apoptosis. Immediately after the incubation, platelets were analyzed by flow cytometry. **Results.** On day 1 of stroke, the expression of CD62p (P-selectin) was higher than in healthy subjects (18.3% vs. 4.1%, respectively,  $p < 0.05$ ). The PS externalization on platelets from patients with stroke was significantly higher than in healthy subjects (20.6% vs. 3.2%, respectively,  $p < 0.01$ ). A decrease in MMP to 70% was observed in platelets from patients with stroke compared to 94% in the control group ( $p < 0.05$ ). **Conclusion.** Therefore, acute ischemic stroke was associated with the following platelet abnormalities: increased PS expression and declined MMP in parallel with increased P-selectin expression, which reflects platelet activation. Further studies of platelet phenotype and apoptosis biomarkers will provide a deeper insight into the pathogenetic role of platelets in ischemic stroke and contribute to the development of methods for monitoring effects of antiplatelet therapy.

**Keywords:** platelets, apoptosis, ischemic stroke, Annexin-V, mitochondrial membrane potential, flow cytometry.

**For citation:** Sokolovskaya A.A., Maksimova M.Y., Virus E.D., Moskovtsev A.A., Ivanov A.V., Aleksandrin V.V., Kubatiev A.A. Platelet apoptosis and phenotype from patients with acute ischemic stroke. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 75–83. (in Russian).

**For correspondence:** Alisa Sokolovskaya, PhD, Leading Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «General Pathology and Pathophysiology», e-mail: alice.sokolovskaya@gmail.com

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

#### Information about authors:

Sokolovskaya A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0112-2734>

Maksimova M.Y., <https://orcid.org/0000-0002-7682-6672>

Virus E.D., <https://orcid.org/0000-0001-9371-6494>

Aleksandrin V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4625-6522>

Ivanov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2424-6115>

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Received 10.09.2018

## Введение

Тромбоциты — это безъядерные клетки крови, происходящие из мегакариоцитов, с размером приблизительно 2,0—4,0 мкм и продолжительностью жизни от 7 до 10 сут.

Решающую роль в контроле апоптоза тромбоцитов играют такие внутриклеточные события, как деполяризация мембран митохондрий ( $\Delta\Psi_m$ ), экстернализация фосфатидилсерина (ФС) на внешней поверхности мембран, активация каспаз 3, 9 и 8 активация и транслокация проапоптотических белков Вах и Бак в митохондрию [1—4]. Адаптируясь к различным патологическим процессам, тромбоциты могут «менять» свой фенотип через различные типы рецепторов, входящих в состав мембран гранул тромбоцитов, которые экспрессируются на поверхности тромбоцитов только после их активации [5]. К числу таких рецепторов относят P-селектин, локализованный исключительно во внутриклеточных гранулах [6].

Существуют противоречивые данные о реактивности тромбоцитов и их активности при остром инфаркте головного мозга. По некоторым данным, тромбоциты активируются при остром ишемическом инсульте. Другие исследователи высказывают предположение,

что повышенная экспрессия белка клеточной адгезии (P-селектина) является предиктом активации тромбоцитов и/или эндотелиальных клеток, что, в свою очередь, может привести к развитию ишемического инсульта [7]. Экспрессия на поверхности тромбоцитов различных типов мембранно-связанных белков играет определенную роль в апоптозе тромбоцитов при инсульте [8, 9]. Повышенная активность тромбоцитов расценивается как прогностический фактор риска у пациентов с инфарктом миокарда [10].

В настоящее время фенотип тромбоцитов, т.е. экспрессию мембранных рецепторов, определяют методом проточной цитофлуориметрии.

Однако, несмотря на неоднократные упоминания о том, что тромбоциты вовлечены в патогенез ишемического инсульта, понимание их роли в патогенезе до конца не выяснены. Определение фенотипа тромбоцитов в комбинации с биомаркерами апоптоза остаётся наименее исследованной областью.

*Цель исследования* — расширение представлений о роли апоптоза и фенотипа тромбоцитов у больных с острым ишемическим инсультом и оценка возможной прогностической ценности некоторых мембранно-связанных белков.

## Методика

**Характеристика пациентов.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена этическим комитетом Научного центра неврологии. Исследования проведены на пациентах Научного центра неврологии в течение первых 24 ч и через 7 сут. после развития ишемического инсульта.

18 пациентов в возрасте 59,0—78,0 лет были включены в основную группу больных с первичным ишемическим инсультом. Диагноз был основан на клинических данных и результатах магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга с использованием режима диффузионно-взвешенных изображений, а также дуплексного сканирования артерий головного мозга и трансторакальной эхокардиографии.

Основные критерии включения пациентов в основную группу: атеротромботический и кардиогенный эмболический инсульт в соответствии с международными критериями TOAST [11]; госпитализация в течение первых 24 ч с момента появления неврологических нарушений; возраст 45—80 лет; наличие информированного согласия, подписанное пациентом или его родственниками по первой линии. Критерии исключения: лакунарный инсульт; криптогенный инсульт; геморрагический инсульт; эпилепсия; беременность; сахарный диабет 1 типа; острый инфаркт миокарда; наличие кардиостимулятора; декомпенсированная почечная, печеночная или дыхательная недостаточность; хроническая сердечная недостаточность III—IV функционального класса; онкологические заболевания; хронические воспалительные, аутоиммунные и гематологические нарушения; инфекционные осложнения в течение 15 сут. после инсульта.

Контрольная группа состояла из 10 здоровых добровольцев в возрасте 45—60 лет. Критерий исключения — транзиторные ишемические атаки (ТИА), геморрагический инсульт и черепно-мозговая травма.

Тяжесть неврологических нарушений оценивалась по шкале инсульта Национальных институтов здравоохранения США (NIHSS) [12]. Деятельность пациента в повседневной жизни определялась с помощью индекса Бартела (BI) [13]. Оценка функционального восстановления проводилась с использованием модифицированной шкалы Ранкина (mRs) на 15 сут. ишемического инсульта. Благоприятный функциональный прогноз соответствовал оценке по mRs  $\leq 2$  баллов. Оценка по mRs  $> 2$  баллов свидетельствовала о неблагоприятном функциональном прогнозе [14].

Характер и локализация очаговых изменений мозга устанавливались с использованием МРТ в режимах T1- и T2-взвешенных изображений, FLAIR и

диффузионно-взвешенных изображений (DWI) на оборудовании Magnetom Verio 3.0 T (Siemens, Германия).

Венозную кровь брали у пациентов, которые не принимали антиагрегантные препараты в течение предшествующих 14 сут.

Кровь (~5 мл) из локтевой вены брали с помощью 5 мл одноразового шприца, содержащего цитрат натрия (2,5%). (BD, США). Образцы обрабатывались не позднее 1,5 ч после венопункции.

**Реактивы и растворы.** В работе были использованы агонисты активации тромбоцитов: тромбин (10 Unit/mL) (Crono-Log Corp, Havertown, США) и ионофор кальция A23187 (5 мг) (Alexis Corporation, Швейцария). Додецилсульфат натрия (SDS) и Диметилсульфоксид (ДМСО) — реагенты компании Sigma Aldrich (США). Анализ апоптоза проводили с использованием Аннексина V, меченного FITC или -PE по протоколу, описанному в инструкции (BD Pharmingen, США). Для измерения митохондриального мембранного потенциала (ММП) использовали JC-1 — липофильный катион 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазол карбоцианин йодид, 5 мг (Molecular Probes, США). Буфер Тирод (без кальция) — 4 мМ HEPES, 135 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 2,4 мМ KCl, 2,4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5,6 мМ D-глюкоза, 3,3 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,35 мг/мл бычий сывороточный альбумин (БСА), pH 7,4. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с 1% раствором параформальдегида (ПФА) для фиксации клеток.

Для характеристики поверхностных рецепторов тромбоцитов человека использовали моноклональные антитела CD62p/PE (clone AK-4, BD Biosciences, США), CD45/FITC (clone HI30, BD Biosciences, США) и CD61/PE (clone Y2/51, Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Для выделения суспензий тромбоцитов человека методом деплеции использовали магнитные микрочастицы CD45 и CD235a (Glycophorin A) (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). В качестве изотипических контролей, для исключения неспецифического связывания, были использованы мышиные МКА против IgG1 и IgG2a человека (BD Biosciences, США).

**Выделение тромбоцитов методом иммуномагнитной сепарации клеток (технология MACS).** Выделение суспензий тромбоцитов человека проводили согласно протоколу технологии MACS путем деплеции (нетронутых клеток) на MS колонках и использованием магнитных микрочастиц CD45 и гликофорина А.

Суть метода деплеции по технологии MACS заключается в том, что метятся и задерживаются на колонке клетки, которые необходимо удалять из суспензии (эритроциты, лимфоциты), немеченые тромбоци-

ты будут проходить через колонку. CD45 является общим лейкоцитарным антигеном (LCA) и представлен на Т- и В-лимфоцитах, гранулоцитах, моноцитах и макрофагах, на созревающих эритроцитах антиген отсутствует. Гликофорин А является наиболее представленным гликофоорином на мембране эритроцитов. В нашем случае немеченые тромбоциты проходят через колонку в пробирку.

Плазму, богатую тромбоцитами, получали центрифугированием цельной цитратной крови пациентов и доноров. Кровь центрифугировали при 200 g, в течение 10 мин при комнатной температуре. Из супернатанта отбирали 700 мкл образца и добавили 200 мкл CD45 MicroBeads и 200 мкл GlycophorinA MicroBeads и инкубировали при 25°C 6 мин. Сразу после инкубации наносили весь объём меченого образца на колонку MiniMACS, предварительно отмытую цитратным буфером (ФСБ, 2 mM Citrate, 0,5% БСА). Выход всего образца после колонки составлял ~2000 мкл. Подсчёт тромбоцитов проводили в камере Горяева.

**Активация тромбоцитов.** Полученные суспензии тромбоцитов ресуспендировали в буфере Тироде и разводили в нем в количестве  $1 \times 10^8$  тромбоцитов/мл. Тромбоциты в количестве  $1 \times 10^7$  в 100 мкл инкубировали с апоптоз-индуцирующими агентами: тромбином (100 нМ) или A23187 (5 и 10 мкМ) при комнатной температуре 15 мин.

**Проточная цитофлуориметрия. Анализ апоптоза с использованием Аннексина V.** Одним из характерных признаков апоптоза является выход (экстернализация) фосфатидилсерина (ФС) на внешнюю сторону плазматической мембраны, что может быть выявлено с помощью белка Аннексина V, связанного с флуоресцентными красителями. После инкубации с A23187 (5 или 10 мкМ) тромбоциты в количестве 10 мкл ( $1 \times 10^6$ ) переносили из положительного контроля в пробирку, содержащую 100 мкл Аннексина V-FITC (или Аннексина V-PE) в связывающем буфере. Те же действия предпринимали и для неактивированных тромбоцитов. Все образцы инкубировали при комнатной температуре в темноте 15 мин, затем добавляли 400 мкл связывающего буфера и немедленно анализировали образцы на проточном цитофлуориметре.

**Анализ Митохондриального Мембранного Потенциала (ММП).** Смесь тромбоцитов доводили до нужного объема ( $1-2 \times 10^6$  клеток в 1 мл) буфером Тироде. Каждый исследуемый образец инкубировали с JC-1 (2 мкг/мл) в течение 30 мин. Образец доводили буфером Тироде до объема 1 мл и немедленно анализировали методом проточной цитометрии. Принцип анализа ММП заключается в том, что в присутствии повышенного мембранного потенциала

краситель JC-1 аккумулируется в митохондриях в виде агрегатов по каналу красной флуоресценции (FL2). Во время деполаризации мембраны JC-1 не накапливается внутри мембраны, он образует мономерные формы, регистрируемые по каналу зелёной флуоресценции (FL1). То есть происходит изменение спектра флуоресценции от красного (FL2) к зеленому (FL1), что и регистрируется методом проточной цитометрии.

**Фенотипическая характеристика поверхностных рецепторов тромбоцитов человека.** Тромбоциты в количестве  $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$  клеток в 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами (МКА) и изотипическими контролями 30 мин при 4°C. Для характеристики использовали моноклональные антитела CD62p/PE, CD45/FITC и CD61/PE. После инкубации к клеткам добавляли 400 мкл ФСБ буфера и анализировали на проточном цитофлуориметре.

Все образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованным воздухоохлаждаемым аргоновым лазером (длина волны 488 нм).

На цитограмме проточного цитофлуориметра на основании рассеивания клеток FSC (прямое) и SSC (боковое) устанавливали соответствующее окно дискриминации (гейт), который содержал основной пул тромбоцитов, с целью удаления мелких (дебрис) и крупных (агрегаты) частиц. Интенсивность флуоресценции проводилась с учетом анализа гистограмм. На гистограммах по оси X отображена интенсивность флуоресценции, по оси Y — число событий (число клеток). В каждом образце накапливали не менее 10—30 тысяч событий в зависимости от цели исследования. Длина волны для зелёной флуоресценции (FITC) устанавливалась в канале FL1 (515—545 нм), для красной (фикоэритрин-PE) флуоресценции в канале FL2 (563—607 нм). Сбор данных проводили в программе CELLQuest (Becton Dickinson, США).

**Статистическая обработка результатов.** Результаты проточной цитофлуориметрии представлены как среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для определения статистической значимости различий между средними при доверительном уровне 95% ( $p < 0,05$ ) использовали *t*-критерий Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Для исследований нами был использован метод иммуномагнитной сепарации тромбоцитов человека по технологии MACS. Данный метод позволяет достаточно быстро получать до 100% чистых тромбоцитов.

Антиген CD61 (интегрин бета III) присутствует на всех нормальных покоящихся и активированных

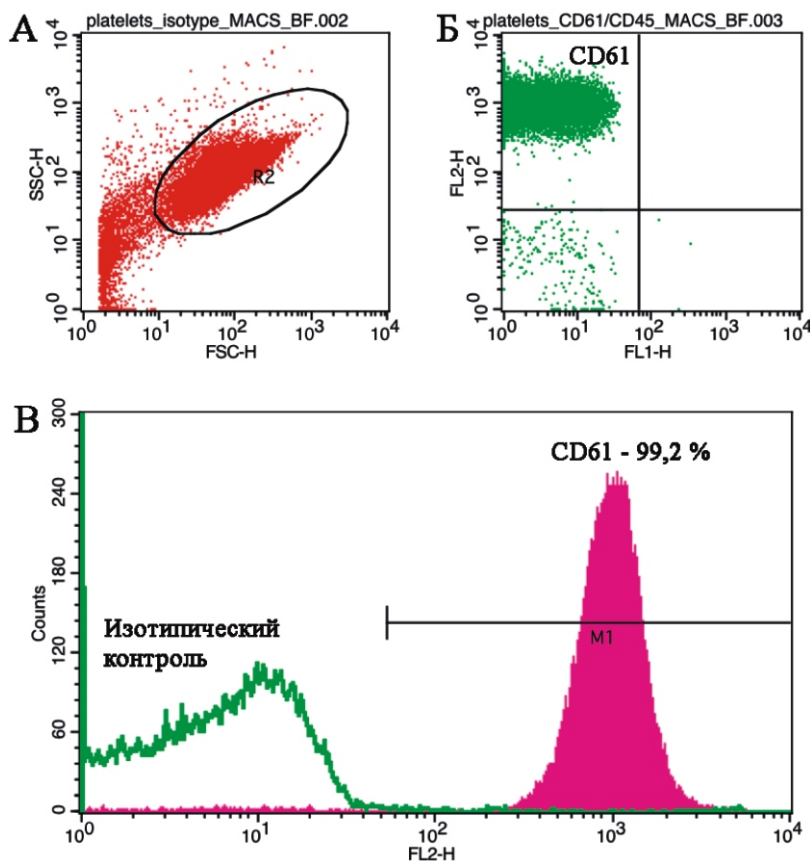


Рис. 1. Экспрессия CD61 на поверхности тромбоцитов донора из контрольной группы после применения метода иммуномагнитной сепарации по технологии MACS. (А) – цитометрический анализ распределения тромбоцитов по размеру (FSC) и гранулярности (SSC), (Б) – двойное окрашивание тромбоцитов с антителами CD61/PE и CD45/FITC, (В) – гистограмма данного эксперимента, где по оси X отображена интенсивность флуоресценции, а по оси Y – число событий. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

тромбоцитах. Полученная, методом иммуномагнитного сепарации, популяция клеток здоровых доноров почти в 100% случаев экспрессировала на поверхности CD61 ( $99,2 \pm 0,2\%$ ) (рис. 1).

Для оценки степени активации тромбоцитов использовали маркер активации CD62p (P-селектин). CD62p относится к классу молекул клеточной адгезии и локализуется в активированных и в тельцах Вейбеля-Паладе эндотелиальных клеток. В ответ на активирующие сигналы, белок CD62p мигрирует к поверхности тромбоцитов, после чего тромбоциты выделяют такие белки, как тромбоглобулин [15].

На рис. 2А показана экспрессия CD62p на тромбоцитах донора, активированных ионофором кальция или тромбином. Рис. 2 Б отображает экспрессию CD62p на поверхности тромбоцитов у одного из пациентов в 1-е сут. инсульта (14%).

Процент тромбоцитов, экспрессирующих CD62p, был выше у пациентов в 1-е сут. ишемического инсульта по сравнению с аналогичным показателем у здоровых субъектов ( $18,3 \pm 3,6\%$  и  $4,1 \pm 1,40\%$  соответственно,  $p < 0,05$ ).

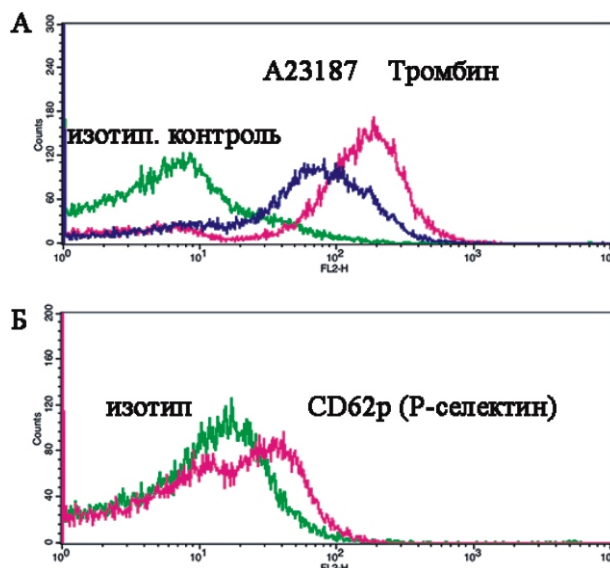


Рис. 2. Распределение клеток по уровню экспрессии CD62p (P-селектин) на поверхности тромбоцитов донора из контрольной группы, активированных ионофором кальция и тромбином (А) и больно-го с ишемическим инсультом в 1-е сут. инсульта (Б). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

Для оценки апоптоза нами была определена экспрессия маркеров поверхностной активности тромбоцитов, как с агонистом, так и без него. На рис. 3 представлены флуориметрические показания экстернализации ФС тромбоцитов доноров под воздействием ионофора кальция (A23187). Отчетливо выявляется концентрационная зависимость экстернализации ФС, обнаруженной при помощи белка Annexина V-FITC. Таким образом, результаты эксперимента демонстрирует корректность выбранного метода для оценки апоптоза тромбоцитов человека.

На рис. 4 показана экспрессия ФС на тромбоцитах донора и пациента с инсультом. Как видно из рис. 4, процент экспрессии ФС на тромбоцитах пациентов с инсультом был значительно выше, чем в контрольной группе ( $20,6\% \pm 9,3\%$  и  $3,2 \pm 1,60\%$  соответственно,  $p < 0,01$ ).

Цитометрические точечные графики тромбоцитов, демонстрирующие окрашивание JC-1, представлены на рис. 5. В качестве положительного контроля показано как изменяется деполяризация мембраны в тромбоцитах человека, активированного ионофором кальция. Видно, как под воздействием ионофора кальция (A23187) почти 60% тромбоцитов было деполяризовано (Б). Деполяризация мембраны в тромбоцитах человека у пациентов с инсультом представлена на рис. 5 двумя конкретными случаями и отображает падение мембранного потенциала до  $68,3 \pm 17,0\%$ , тогда как в контроле оно составляло  $93,5 \pm 5,2\%$  ( $p < 0,05$ ). На рис. 6 представлены средние статические значения в контрольной группе и группе больных в первые 24 ч после инсульта.

Как показано в некоторых исследованиях, экспрессия CD62 $\rho$  и CD63 значительно выше у пациен-

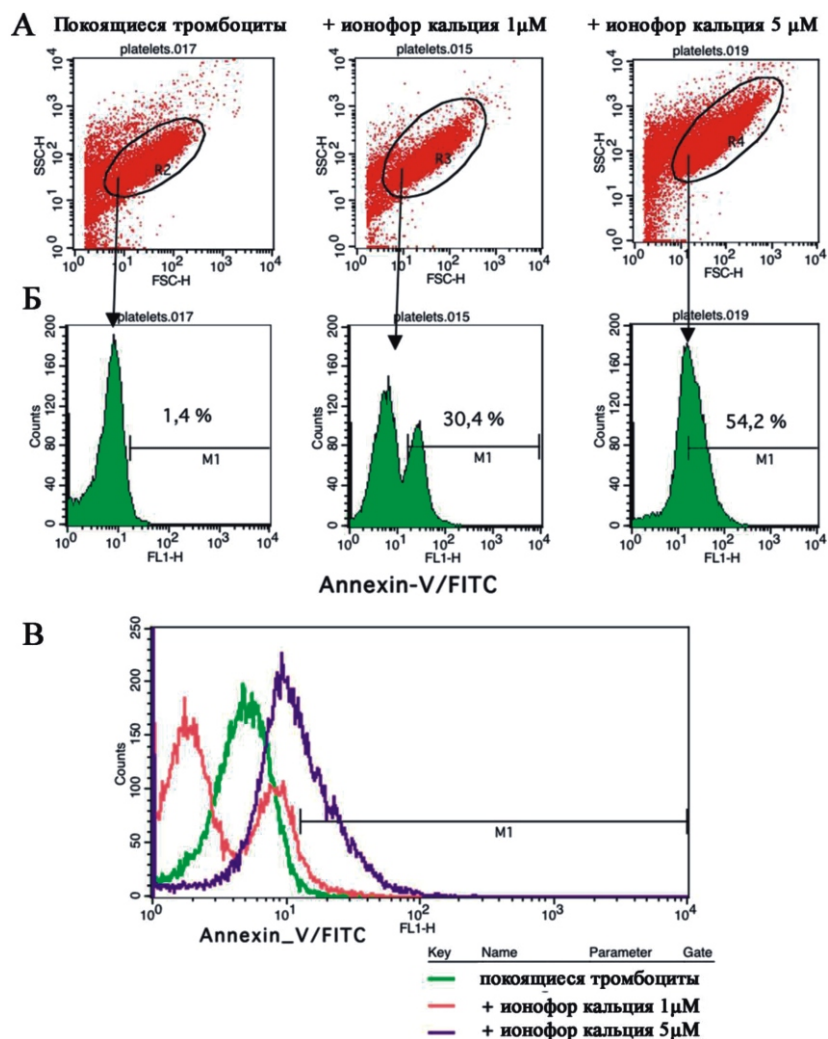


Рис. 3. Экстернализация ФС на тромбоцитах донора. (А) – цитометрический анализ распределения клеток по размеру (FSC) и гранулярности (SSC), (Б) – соответствующие гистограммы, где по оси X отображена интенсивность флуоресценции, а по оси Y – число событий. (В) – гистограммы данного эксперимента путем их наложения (overly). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.



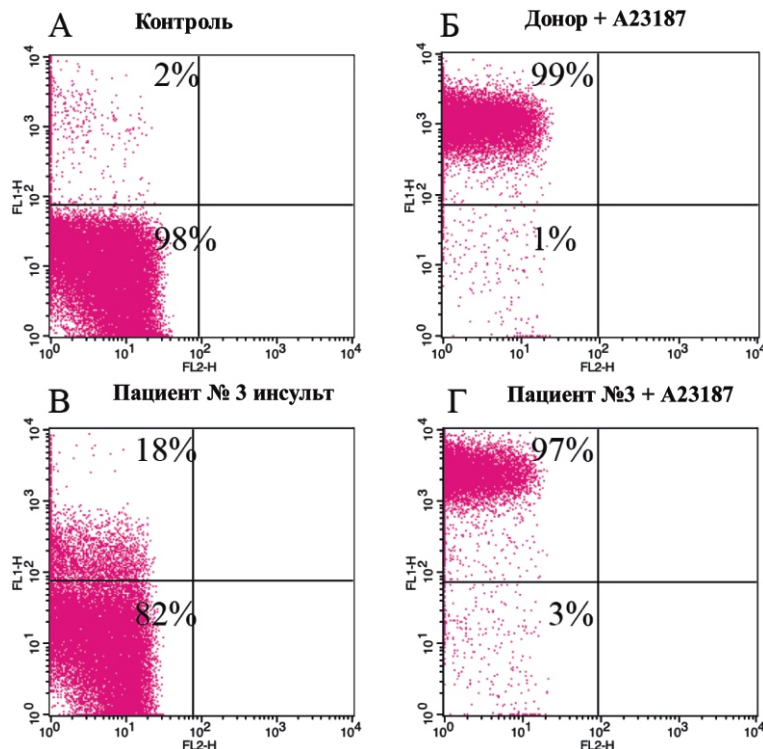


Рис. 4. Экстернализация фосфотидилсерина на тромбоцитах донора из контрольной группы (Б), больного с в 1-е сут. инсульта (В) и (Г) – тромбоциты того же больного, активированные ионофором кальция (A23187). В контроле (А) – тромбоциты донора в буферном растворе. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

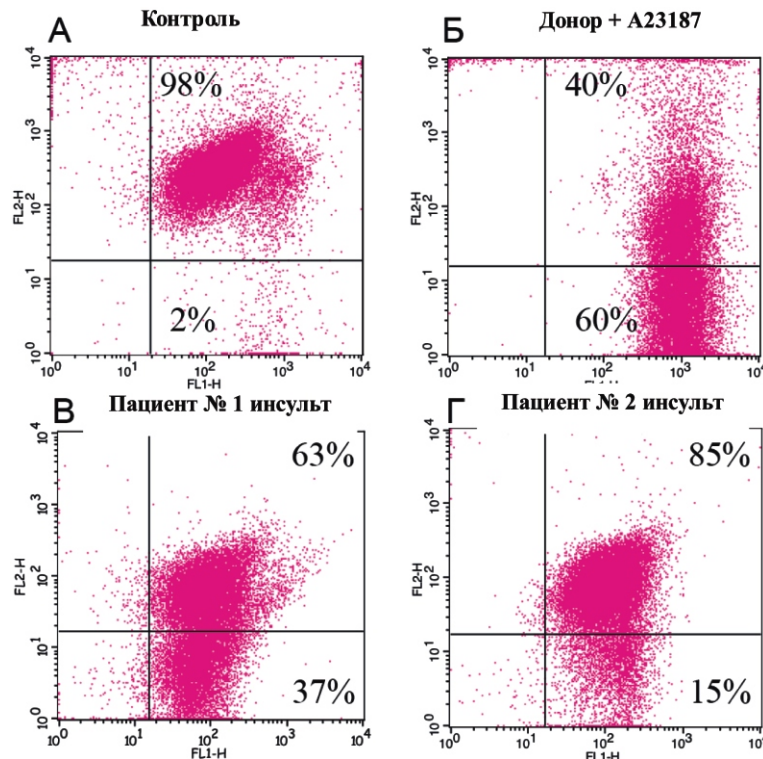


Рис. 5. Деполяризация мембраны (ММП) в тромбоцитах донора из контрольной группы (А). (Б) – активированные ионофором кальция (A23187) тромбоциты того же донора. (В, Г) – тромбоциты пациентов в 1-е сут. инсульта с ишемическим инсультом. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

тов с острым инсультом, чем в контрольной группе. Однако различия в экспрессии CD62<sub>p</sub> наблюдаются до 1 мес., в то время как экспрессия CD63 не является значимой уже на 7-е сут. после инсульта [16]. По другим данным уменьшение экспрессии CD62<sub>p</sub> на тромбоцитах наблюдается в течение 2 нед. после инсульта, в то время как экспрессия CD63 повышается на протяжении 3 мес. после инсульта [17]. Вероятней всего, экспрессия указанных маркеров активации тромбоцитов связана с различными вариантами ишемического инсульта. Есть основание предполагать, что в будущих работах маркер CD63 будет рассматриваться как предиктор повторных ишемических событий. В то же время экспрессия CD62<sub>p</sub> и CD63 не всегда коррелирует с количеством лейкоцитов, фибриногеном или С-реактивным белком, что указывает на то, что параметры активации тромбоцитов независимы от воспалительных показателей [6].

Как CD62<sub>p</sub>, так и CD63 экспрессируются исключительно на активированных тромбоцитах. Независимо от стадии инсульта оба маркера активации тромбоцитов могут прогнозировать рецидив ишемического инсульта и быть полезными при мониторинге антитромбоцитарной терапии. Была предложена гипотеза, согласно которой, высокоэкспрессируемые в острой стадии инсульта CD62<sub>p</sub> и CD63, впоследствии снижаются, но остаются повышенными по сравнению с здоровыми донорами [17].

Современные лабораторные методы не всегда оценивают все пути реактивности и активации тромбоцитов. По некоторым данным, ишемический инсульт может характеризоваться увеличением числа тромбо-

цитарно-лейкоцитарных агрегатов (platelet-leukocyte aggregates) [6, 18].

Строгая корреляция между экспрессией белка Аннексина — V и экспрессией CD62<sub>p</sub> во время апоптоза (или в поздней активации) предполагает взаимосвязь между активацией и апоптозом тромбоцитов. Скорее всего, апоптоз тромбоцитов может проявляться раньше, чем активация тромбоцитов [19].

В исследованиях митохондриальной деполаризация мембраны, как одного из важных событий апоптоза тромбоцитов, была отмечена строгая корреляция между экспрессией CD62<sub>p</sub> и сигналом JC-1 в тромбоцитах человека, измеренных на 3-и сут. после УФ-облучения [20]. Важность измерения мембранного потенциала подтверждена в экспериментах при изучении патогенеза сахарного диабета на тромбоцитах крыс и пациентах с сахарным диабетом [21]. Все это говорит о том, что митохондриальная дисфункция тромбоцитов может отражать, по крайней мере, частично, ишемию мозга.

В предыдущих наших исследованиях на экспериментальной модели глобальной ишемии мозга у крыс нами было показано, что экспрессия ФС на тромбоцитах крыс после глобальной ишемии мозга была значительно выше, чем в контрольной группе крыс. Феномен апоптоза тромбоцитов при глобальной ишемии мозга у крыс был также подтвержден с помощью выраженной деполаризации митохондриальной мембраны [22].

Из-за относительно небольшого размера тромбоцитов их мембрана и мембранные белки представляют большую долю клеточной массы по сравнению с другими клетками. Благодаря таким высокотехнологичным методам, как протеомный анализ, было показано, что в тромбоцитах присутствует большое количество рецепторов с неопределенными функциями [23].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что выявленные нами функциональные характеристики тромбоцитов при ишемии мозга отличаются от характеристик тромбоцитов в контрольных группах. Процент экспрессии ФС на тромбоцитах пациентов с ишемическим инсультом значительно выше, чем в контрольной группе. У 2 пациентов с ишемическим инсультом зафиксировано падение мембранного потенциала и одновременно повышенная экспрессия Р-селектина, что отражает факт активации тромбоцитов. У 2 пациентов зафиксировано незначительное падение ММП на 7-е сутки.

Дальнейшее исследование фенотипических характеристик тромбоцитов в комбинации с биомаркерами апоптоза позволит лучше понять роль тромбоцитов при ишемии мозга и способствовать разработке методов для мониторинга эффектов антитромбоцитарной терапии.

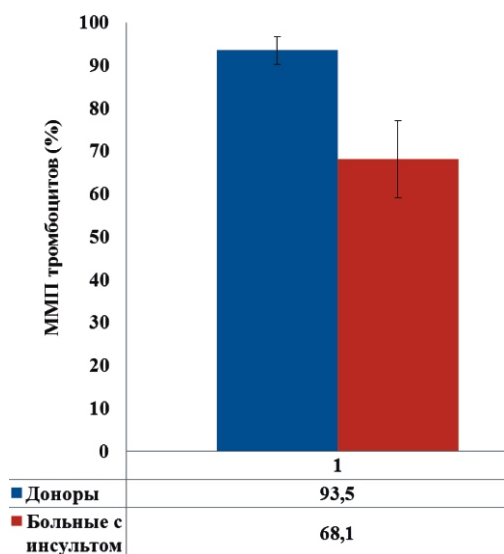


Рис. 6. Деполаризация мембраны (ММП) в тромбоцитах в контрольной группе и группе больных впервые 24 ч после инсульта.

## Литература (1, 2, 5—9, 11—21, 23 см. References)

3. Миндукшев И.В., Рукояткина Н.И., Добрылко И.А. Особенности апоптоза безъядерных клеток тромбоцитов и эритроцитов человека. *Российский физиологический журнал имени И.М. Сеченова*. 2013;1:92 — 110.
4. Артеменко Е.О., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А. Программируемая клеточная смерть тромбоцитов при их сверхактивации. *Онкогематология*. 2014; 3: 63 — 6.
10. Габбасов З.А., Рызжкова Е.В. Фенотип тромбоцитов и инфаркт миокарда. *Креативная кардиология*. 2014; 2: 48 — 59
22. Соколовская А.А., Вирюс Э.Д., Александрин В.В., Роткина А.С., Никифорова К.А., Московцев А.А., Иванов А.В., Кубатиев А.А. Апоптоз тромбоцитов при глобальной ишемии головного мозга у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; (62)1: 27 — 35. DOI: <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.01.27-35>

## References

1. Leytin V. *Blood Rev*. 2012; Mar; 26(2): 51-63. doi: 10.1016/j.blre.2011.10.002.
2. Josefsson EC, White MJ, Dowling MR, Kile BT. Platelet life span and apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2012; 788: 59-71. doi: 10.1007/978-1-61779-307-3\_5.
3. Mindukshev I.V., Rukoyatkina N.I., I.A. Dobrylko, E.A. Skvertchinskaya, E.R. Nikitina, Krivoslyk V.V., S.P. Gambaryan, A.I. Krivchenko. Characterisation of nucleated cells apoptosis: human platelets and erythrocytes. *Russian journal of physiology*. 2013; 99(1): 93-110. (in Russian).
4. Artemenko E.O., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. Programmed cell death of platelets during their overactivation. *Oncohematology*. 2014; 3: 63-6. doi: <http://dx.doi.org/10.17650/1818-8346-2014-9-3-63-66>. (in Russian).
5. Kenneth J. Clemetson and Jeannine M. Clemetson. Platelet Receptors, Platelets 3rd edition, Copyright © 2013 Elsevier Inc. 169-193.
6. Jaremol P., M. Eriksson1, T. L. Lindahl2, S. Nilsson3 & M. Milovanovic Platelets and acute cerebral infarction Platelets, 2012; Early Online:1-5
7. Ferroni P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP. Is soluble P selectin determination a more reliable marker of in vivo platelet activation than CD62P flow cytometric analysis? *ThrombHaemost* 1999; 81:472-473.
8. Cevik Ozge, The apoptotic actions of platelets in acute ischemic stroke, *Mol Biol Rep* (2013) 40:6721-6727
9. Nagy Bela, Jr, Ildiko Beke Debreceni, and Janos Kappelmayer. Flow Cytometric Investigation of Classical and Alternative Platelet Activation Markers. *EJIFCC*. 2013 Jan; 23(4): 124-134.

## Сведения об авторах:

- Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;  
 Максимова Марина Юрьевна, доктор мед. наук, проф. зав. отделением нарушений мозгового кровообращения Научного центра неврологии.  
 Вирюс Э.Д., канд. хим. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;  
 Московцев А.А., канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, доцент, каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;  
 Иванов А.В., канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;  
 Александрин В.В., канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ НИИОПП;  
 Кубатиев А.А., доктор мед. наук, акад. РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП, зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

10. Gabbasov Z.A., Ryzhkova E.V. Platelet phenotype in myocardial infarction. *Kreativnaya Kardiologiya*. 2014; 2: 48 — 59. (in Russian).

11. Adams H.P.Jr., Bendixen B.H., Kappelle L.J., Biller J., Love B.B., Gordon D.L. et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993; 24(1) 35-41. PMID: 7678184.

12. Brott T., Adams H.P.Jr., Olinger C.P., Marler J.R., Barsan W.G., Biller J. et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke*. 1989; 20(7): 864-870. PMID: 2749846.

13. Mahoney F.I., Barthel D.W. Functional evaluation: The Barthel Index. *Md. State. Med. J*. 1965; 14: 61-65. PMID: 14258950.

14. Sulter G., Steen C., De Keyser J. Use of the Barthel index and modified Rankin scale in acute stroke trials. *Stroke*. 1999; 30(8) 1538-1541. PMID: 10436097.

15. Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2003;24:2166-2179.

16. Tsai NW, Chang WN, Shaw CF, Jan CR, Chang HW, Huang CR, et al. Levels and value of platelet activation markers in different subtypes of acute non-cardio-embolic ischemic stroke. *Thromb Res*. 2009;124(2):213-218.

17. Marquardt Lars, Med Cand; Andreas Ruf, MD; Ulrich Mansmann, PhD; Ralph Winter, MD; Matthias Schuler, MD; Florian Bugge, MD; Horst Mayer, MD; Armin J. Grau, MD. Course of Platelet Activation Markers After Ischemic Stroke. *Stroke* November 2002.

18. Lukasik M, Rozalski M, Luzak B, Michalak S, Kozubski W, Watala C. Platelet activation and reactivity in the convalescent phase of ischaemic stroke. *Thromb Haemost* 2010;103: 644-650.

19. Unsal Ozgen, Ozerol Elif, Mehmet Aminci. Relationship between activation and apoptosis in platelets. *Turk J Hematol* 2007; 24:171-176.

20. Verhoeven Arthur J., Robin Verhaar, Eric G.W. Gouwerok, and Dirk de Korte. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *TRANSFUSION* 45:82-89, 2005.

21. Wu F., Liu Y., Luo L., Lu Y., Yew D.T., Xu J. et al. Platelet mitochondrial dysfunction of DM rats and DM patients. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015; 8: 6937-46.

22. Sokolovskaya A.A. Virus E.D., Aleksandrin V.V et al. Platelets apoptosis in rats after global brain ischemia. *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 2018; 62(1): 27-35. (in Russian).

23. Krishnan S, Gaspari M, Della Corte A, et al. OFF gel-based multidimensional LC-MS/MS approach to the cataloguing of the human platelet proteome for a interactom profile. *Electrophoresis* 2011; 32: 686-95.

Кузник Б.И.<sup>1,2</sup>, Давыдов С.О.<sup>1,2</sup>, Гусева Е.С.<sup>1,2</sup>, Смоляков Ю.Н.<sup>1</sup>, Степанов А.В.<sup>1,2</sup>, Цыбиков Н.Н.<sup>1</sup>

## Роль форменных элементов крови в формировании гемостаза при гипертонической болезни

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», 672000, г. Чита, Россия, ул. Горького, д. 39а

<sup>2</sup> Инновационная клиника «Академия здоровья», 672038, г. Чита, Россия, ул. Коханского, д. 13

**Цель** — изучение роли отдельных форменных элементов крови в развитии гемостаза у здоровых женщин и, больных гипертонической болезнью (ГБ). **Методика.** В исследовании приняли участие 102 женщины. Контрольную группу составили 30 относительно здоровых женщин. Больные ГБ были разделены на 2 подгруппы: в одну (ГБ-1) вошли 37 женщин с гипертонической болезнью II стадии, в другую (ГБ-2) — 35 женщин с ГБ II стадии, регулярно проходящих на протяжении 2—3 лет по 3—4 курса кинезитерапии. Определяли число тромбоцитов, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), концентрацию фибриногена и пространственный рост фибринового сгустка, включающий время задержки роста сгустка, начальную и стационарную скорость его роста, плотность и размер сгустка. С помощью корреляционного анализа оценивалась роль отдельных форменных элементов крови в развитии гемостаза у здоровых и больных ГБ женщин. **Результаты.** У всех обследованных женщин обнаружено увеличение числа лимфоцитов и эозинофилов, возрастание предрасположенности к тромбообразованию, выявляемое с помощью оценки тромбодинамических свойств сгустка, возрастание скорости формирования и размеры фибринового сгустка. У женщин в группе ГБ-2 эти сдвиги выражены в меньшей степени. У здоровых женщин обнаружены прямые корреляции между числом моноцитов, АЧТВ и тромбиновым временем, и отрицательные — между числом лимфоцитов и АЧТВ. Число эозинофилов у здоровых женщин положительно коррелирует с протромбиновым временем и плотностью сгустка. В ГБ-1 отмечается негативная связь между числом нейтрофилов и скоростью образования сгустка, а также положительная связь между числом моноцитов, скоростью и размером сгустка и между числом базофилов и тромбиновым временем. У больных ГБ-2, принимавших кинезитерапию число эритроцитов отрицательно коррелирует с АЧТВ, количество тромбоцитов обнаруживает положительную корреляцию с тромбиновым временем, скоростью и размерами сгустка, а общее число лейкоцитов — с протромбиновым временем и скоростью образования сгустка. Содержание нейтрофилов положительно коррелирует с протромбиновым временем и отрицательно со скоростью образования сгустка. Количество лимфоцитов и эозинофилов отрицательно коррелирует со скоростью образования сгустка, а базофилов — с уровнем фибриногена и скоростью появления сгустка. **Заключение.** В формировании гемостаза у здоровых женщин и больных ГБ ведущая роль принадлежит тромбоцитам и различным популяциям лейкоцитов. Обсуждается положительное влияние кинезитерапии.

**Ключевые слова:** гипертоническая болезнь, тромбоциты, нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, эозинофилы, базофилы, корреляции, показатели коагулограммы и тромбодинамики.

**Для цитирования:** Кузник Б.И., Давыдов С.О., Гусева Е.С., Смоляков Ю.Н., Степанов А.В., Цыбиков Н.Н. Роль форменных элементов крови в формировании гемостаза при гипертонической болезни. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 84—92.

DOI:

**Для корреспонденции:** Кузник Борис Ильич, доктор мед. наук, проф. каф. нормальной физиологии, ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», e-mail: bi\_kuznik@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила 19.02.2018

Kuznik B.I.<sup>1,2</sup>, Davydov S.O.<sup>1,2</sup>, Guseva E.S.<sup>1,2</sup>, Smolyakov Y.N.<sup>1</sup>, Stepanov A.V.<sup>1,2</sup>, Tsybikov N.N.<sup>1</sup>

## The role of blood cells in formation of hemocoagulation shifts in essential hypertension

<sup>1</sup> Chita State Medical Academy, Gorkogo Str. 39a, Chita 672090, Russia, pochta@chigma.ru

<sup>2</sup> Innovative Clinic «Health Academy», Kohanskogo Str. 13, Chita 672038, Russia, support@az-chyta.ru

**Aim.** To study the role of different blood cells in the development of coagulation potential in healthy women and patients with essential hypertension (EH). **Methods.** The study included 102 women. The control group consisted of 30 relatively

healthy women. Patients with EH were divided into 2 subgroups: the first subgroup (EH-1) included 37 women with stage II arterial hypertension, the second subgroup (EH-2) — 35 women with stage II EH who received 3-4 courses of kinesitherapy for 2-3 years on a regular basis. The following values were determined: platelet count, activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), thrombin time (TT), fibrinogen concentration, and spatial fibrin clot growth, including the delay time of clot lengthening, initial and steady growth rate, and clot density and size. The role of different blood cells in the development of coagulation potential was evaluated in healthy and EH women using the correlation analysis. **Results.** All women had increased numbers of lymphocytes and eosinophils; showed a predisposition to thrombosis as was evident from thrombodynamic properties of the clot; and increased formation rate and size of the fibrin clot. These changes were less pronounced in the EH-2 group. In healthy women, a direct correlation was observed between the number of monocytes, APTT and the thrombin time. and a negative correlation — between the number of lymphocytes and APTT. In this group, the number of eosinophils positively correlated with the prothrombin time and the clot density. In the EH-1 group, the number of neutrophils inversely correlated with the rate of clot formation; the number of monocytes positively correlated with the clot formation rate and size; and the number of basophils positively correlated with the thrombin time. In EH-2 patients receiving kinesitherapy, the number of red cells inversely correlated with APTT; the number of platelets positively correlated with the thrombin time, the clot formation rate and size; and the total number of leukocytes positively correlated with the prothrombin time and the clot formation rate. The neutrophil count positively correlated with the prothrombin time and negatively — with the rate of clot formation. The number of lymphocytes and eosinophils negatively correlated with the rate of clot formation, and the number of basophils — with the fibrinogen level and the rate of clot emergence. **Conclusion.** Platelets and leukocyte populations play the main role in the formation of coagulation potential in healthy women and patients with EH. The beneficial effect of kinesitherapy is discussed.

**Keywords:** essential hypertension, thrombocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils, correlations, coagulogram parameters, thrombodynamics.

**For citation:** Kuznik B.I., Davydov S.O., Guseva E.C., Smolyakov Y.N., Stepanov A.V., Tsybikov N.N. The role of blood corpuscles in forming hemocoagulative shifts in essential hypertension. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 84—92.

**DOI:**

**For correspondence:** Kiznik Boris Ilich, Doctor of Medical Sciences, professor of department of normal physiology, Chita State Medical academy, Russia, Chita, Gorkogo str. 39a, 672000; E-mail: bi\_kuznik@mail.ru

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

**Information about authors:**

Kuznik B.I., <https://orcid.org/0000-0002-2502-9411>

**Received** 19.02.2018

## Введение

Неоспоримо доказано, что все форменные элементы крови — эритроциты, лейкоциты и тромбоциты — принимают участие в сосудисто-тромбоцитарном и коагуляционном гемостазе, а также процессе стабилизации и растворения фибринового сгустка [1]. Вместе с тем, за последние годы появились данные, что форменным элементам крови принадлежит далеко не последняя роль в развитии заболеваний сердечно-сосудистой системы. Так, в исследованиях, проведенных F Ozcan и соавт. [2], установлено, что число эритроцитов является легко и быстро воспроизводимым тестом, прогнозирующим раннюю стадию повреждения почек у пациентов с гипертонической болезнью. Доказано, что повышенная агрегация эритроцитов у больных эссенциальной гипертонией способствует повышению как систолического, так и диастолического кровяного давления [3, 4].

Тромбоциты, являясь клетками, принимающими участие в развитии воспалительных процессов, играют существенную роль не только в возникновении

атеросклероза, но и могут способствовать повреждению почек, что приводит к возникновению гипертонии [5]. Более того, при гестационной гипертонии и преэклампсии отношение тромбоциты/нейтрофилы и тромбоциты/лимфоциты значительно повышается, считается даже, что это является предиктором указанных патологических состояний беременности [6].

У пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) или хронической левожелудочковой недостаточностью, а также у больных с легочной артериальной гипертонией, отмечается увеличение числа нейтрофилов и снижение количества лимфоцитов [7—9].

Согласно данным H.C. Zhang и соавт. [10], хроническое воспаление не только способствует развитию гипертонии, но и непосредственно связано с усиленной инфильтрацией Т-клетками поражаемых органов и последующей продукцией цитокинов. Так, у крыс со спонтанно развившейся гипертонией особо важную роль играют Т-регуляторные лимфоциты и выделяемые ими цитокины.

Существует значительное число исследований, свидетельствующих о роли моноцитов в развитии атеросклероза [11—13], что не может не отразиться на деятельности сердечно-сосудистой системы. Установлено, что эозинофилам отводится важная роль в развитии гранулематоза, некротического васкулита, что способствует возникновению инфаркта миокарда (ИМ) [14]. Прямые корреляционные отношения между числом эозинофилов и уровнем гипертензии выявляются у больных, подвергшихся чрезкожным коронарным вмешательствам с развившимся впоследствии ИМ [15]. В то же время приводятся сведения, согласно которым эозинофилы блокируют деятельность адипоцитов, снижают тем самым уровень адипонектина 2, усиливающего тонус сосудов [16]. Наконец, базофилы, содержащие в своём составе факторы, способствующие как повышению (серотонин, тромбоксан А<sub>2</sub> и др.), так и понижению кровяного давления (гистамин и др.), также могут оказывать воздействие на развитие гипертонической болезни. Установлено, что усиленный Th<sub>2</sub>-иммунный ответ, опосредованный увеличением количества циркулирующих базофилов, способствует прогрессированию атеросклеротических изменений [17].

Не подлежит сомнению, что при ГБ развивается гиперкоагуляция и тормозится фибринолиз, что нередко приводит к развитию ИМ и инсульта, зачастую заканчивающихся летальным исходом.

Вместе с тем, мы не встретили работ, в которых бы в комплексе изучалось воздействие различных форменных элементов (эритроцитов, лейкоцитов и их популяций, тромбоцитов) на состояние системы гемостаза у здоровых людей и больных ГБ.

*Цель исследования:* выявить роль отдельных форменных элементов крови в развитии гемокоагуляционного потенциала у здоровых женщин и больных гипертонической болезнью.

## Методика

*Клиническая характеристика больных и методы исследования.* Исследования проведены на 102 женщинах. Все проводимые мероприятия соответствовали этическим стандартам, разработанным на основе Хельсинкской декларации всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г, и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 №266. Все пациентки давали письменное информированное согласие на обследование.

Контрольную группу составили 30 относительно здоровых женщин в возрасте  $55,2 \pm 2,9$  года и индек-

сом массы тела (ИМТ) —  $24,4 \pm 2,3$ . Больные гипертонической болезнью были разделены на 2 подгруппы. В первую подгруппу (ГБ-1) вошли 37 женщин, страдающих артериальной гипертензией II стадии и имеющие высокий дополнительный риск развития сердечно-сосудистых осложнений. Средний возраст обследуемых этой группы составил  $57,8 \pm 4,3$  года, а ИМТ  $28,6 \pm 4,4$ . Все женщины этой группы получали лечение в виде монотерапии или комбинации двух антигипертензивных препаратов.

Известно, что умеренная физическая нагрузка благотворно влияет на течение гипертонической болезни [17—19]. Вот почему в отдельную группу (ГБ-2) мы выделили 35 женщин (возраст  $56,7 \pm 4,1$  года; ИМТ —  $28,2 \pm 4,3$ ), также страдающих артериальной гипертензией II стадии с высоким дополнительным риском развития сердечно-сосудистых осложнений, регулярно проходивших на протяжении 2—3 лет по 3—4 полуторамесячных курса кинезотерапии.

У здоровых женщин (контроль) АД соответствовало  $124,5 \pm 8,5/75,2 \pm 6,7$ , у больных с гипертонией, находящихся только на медикаментозной терапии (ГБ-1) —  $135,7 \pm 11,5/79,4 \pm 9,3$  и у пациенток с ГБ, получающих медикаментозную терапию и занимающихся физическими упражнениями (ГБ-2) —  $127,5 \pm 9,2/76,9 \pm 6,8$ . На момент исследования у 31 женщины 2-й группы был достигнут целевой уровень артериального давления (АД), у 6 — цифры АД соответствовали 1 степени артериальной гипертонии, что потребовало дополнительной коррекции доз получаемых препаратов. Среди пациенток ГБ-2 регулярная коррекция АД потребовалась лишь в одном случае, у остальных женщин регистрировались целевые значения давления.

Кровь для исследования брали утром натощак. Изучались следующие показатели, характеризующие состояние свёртывающей активности крови: число тромбоцитов, активированное частичное тромбопластиновое время — АЧТВ, протромбиновое время (ПВ) с вычислением МНО, тромбиновое время (ТВ), концентрация фибриногена. Все перечисленные методы вошли в современные руководства по исследованию свёртывающей системы крови [20] и не нуждаются в описании. Запись коагулограммы осуществлялась на аппарате «HUMACLOT Duo Plus» (HUMAN, Германия) с реактивами фирмы «Технология — Стандарт», (Барнаул, Россия). Определение числа тромбоцитов производилось на гемометре «PENTRA 80» (HORIBA ABX, Франция).

Кроме перечисленных методов исследования определялся пространственный рост фибринового сгустка, осуществляемый с помощью прибора «Регистратор Тромбодинамики Т-2» [21]. При использовании

данного метода регистрируются следующие параметры: задержка роста сгустка, начальная скорость его роста, стационарная скорость роста, плотность и размер сгустка на 30-й мин исследования.

Подсчет форменных элементов крови производился на гемоанализаторе РЕНТРА-80, Horiba ABX Diagnostics (США).

Статистическая обработка данных выполнена с помощью языка R (<http://cran.r-project.org>) версии 3.4.0. Для описания количественных признаков определялись медианы (Me), 25% перцентили (P25) и 75% перцентили (P75). Для сравнения количественных показателей использовали непараметрический критерий рангов Манна—Уитни. Для оценки связи между GDF 11 и другими изучаемыми показателями применен метод ранговой корреляции Спирмена. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$  и вероятными при  $p < 0,1$ .

### Результаты и обсуждение

Вначале было решено изучить, как изменяется общее число лейкоцитов, отдельных их популяций и соотношение различных видов белых кровяных телец у больных ГБ, принимающих и не принимающих курсы кинезитерапии (табл. 1).

Оказалось, что у больных ГБ, как занимающихся (ГБ-2), так и не занимающихся (ГБ-1) кинезитерапией по сравнению с относительно здоровыми женщинами (контроль) общее содержание эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов не изменено. Вместе с тем, у больных ГБ-1 в сравнении с контролем увеличено общее число лимфоцитов и эозинофилов. У больных ГБ-2 возрастание числа лимфоцитов проявляет лишь тенденцию, тогда как сохраняется явное увеличение числа эозинофилов.

Как свидетельствуют проведенные нами исследования (табл. 2), у больных ГБ, независимо от мето-

дов терапии, АЧТВ, ПВ и ТВ, а также концентрация фибриногена существенно не отличаются от нормы. Одновременно у страдающих ГБ-1, уменьшается время задержки роста сгустка, но значительно увеличиваются начальная и стационарная скорость образования фибринового сгустка, а также его размеры, что свидетельствует о явном усилении процесса тромбообразования. Кроме того, у больных ГБ-1 по сравнению со здоровыми сгусток в 4,5 раза чаще начинал расти не только от субстрата (ТФ), но и центра кюветы (спонтанный рост сгустка), что говорит о наличии в отцентрифугированном субстрате плазмы повышенного числа микровезикул, несущих и не несущих ТФ [21, 22].

У больных ГБ-2 по сравнению со здоровыми отмечалось незначительное сокращение ПВ и времени задержки начала роста сгустка, намечалась тенденция к увеличению начальной скорости формирования фибринового сгустка и его роста (данные вероятностные). Следует отметить, что рост сгустка у больных ГБ-2 в центре кюветы выявлялся в 2,5 раза реже, чем при ГБ-1. Приведенные данные свидетельствуют о том, что у больных ГБ, систематически занимающихся умеренными физическими упражнениями, показатели тромбодинамики в значительной степени приближаются к норме.

Основной задачей наших исследований явилось выяснение взаимосвязи различных форменных элементов крови с исследуемыми нами показателями системы гемостаза.

Оказалось, что у здоровых женщин (табл. 3) общее число эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов практически не коррелирует с исследуемыми нами показателями системы гемостаза. Исключением из этого правила является вероятностная отрицательная связь между числом тромбоцитов и ТВ, что вполне закономерно.

Таблица 1

Сравнительный анализ содержания различных форменных элементов крови у обследуемых женщин (Me [P25-P75])

Показатели	контроль	ГБ-1	ГБ-2	p1	p2	p3
RBC, $10^{12}/л$	4,61 [4,52-4,81]	4,77 [4,62-4,95]	4,73 [4,54-4,96]	0,15	0,36	0,38
WBC, $10^9/л$	5,8 [5-6,98]	6,41 [5,6-8,21]	6,46 [5,44-7,9]	0,1	0,23	0,53
NEU, $10^9/л$	3,12 [2,49-4,08]	3,52 [2,73-4,51]	3,16 [2,77-4,05]	0,48	0,76	0,64
LYM, $10^9/л$	1,94 [1,77-2,1]	2,33 [1,91-2,76]	2,32 [1,64-2,74]	0,048	0,1	0,70
MON, $10^9/л$	0,561 [0,526-0,668]	0,635 [0,513-0,768]	0,575 [0,522-0,756]	0,31	0,50	0,59
EOS, $10^9/л$	0,125 [0,073-0,135]	0,182 [0,134-0,251]	0,166 [0,117-0,218]	0,007	0,018	0,74
BAS, $10^9/л$	0,056 [0,040-0,088]	0,053 [0,031-0,077]	0,34 [0,032-0,078]	0,61	0,56	0,96
PL, $10^{11}/л$	254 [238-259]	248 [199-282]	269 [221-291]	0,58	0,71	0,34

Примечание. Сравнение групп по критерию Манна—Уитни: p1 — между контролем и ГБ-1 группой; p2 — между контролем и ГБ-2; p3 — между ГБ-1 и ГБ-2.

У здоровых женщин обнаружены существенные прямые корреляции между числом моноцитов и АЧТВ и вероятностные — с ТВ. Между количеством лимфоцитов и АЧТВ намечаются отрицательные взаимосвязи. Число эозинофилов положительно коррелирует с протромбиновым временем и плотностью сгустка.

При ГБ-1 не обнаружено значимых и вероятностных связей между общим числом эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов и исследуемыми показателями системы гемостаза. Вместе с тем, при ГБ-1 отмечается негативная связь средней степени силы между числом нейтрофилов и скоростью образования фибринового сгустка, а также вероятностная — с начальной скоростью этого процесса. Кроме того, выявляются положительная связь средней степени силы между числом моноцитов, стационарной скоростью и размером образуемого сгустка, а также между числом базофилов и ТВ (табл. 4).

У больных ГБ-2 число эритроцитов отрицательно коррелирует с АЧТВ, общее содержание тромбоцитов проявляет положительную взаимосвязь с ТВ, начальной скоростью и размерами сгустка (последняя носит вероятностный характер), а общее число лейкоцитов — с ПВ и стационарной скоростью образования сгустка. Содержание нейтрофилов положительно коррелирует с ПВ и отрицательно со стационарной скоростью образования сгустка. Количество лимфоцитов отрицательно коррелирует со стационарной скоростью образования фибринового сгустка, тогда как число эозинофилов оказывает негативное воздействие на скорость образования фибринового сгустка (связь вероятностная). Наконец, содержание базофилов отрицательно влияет на уровень фибриногена (связь вероятностная) и стационарной скоростью образования сгустка (табл. 5).

Как же могут быть объяснены полученные нами данные?

Таблица 2

Состояние системы гемостаза у здоровых женщин и больных ГБ-1 и ГБ-2

Показатели	Контроль	ГБ-1	ГБ-2	p1	p2	p3
АЧТВ, с	30,5 ± 1,39	32 ± 2,74	31 ± 2,68	0,088	0,99	0,079
Протромбиновое время, с	15,3 ± 1,16	14,8 ± 1,28	14 ± 2,79	0,15	0,045	0,24
Тромбиновое время, с	18,2 ± 1,7	16,6 ± 2,49	16,9 ± 2,3	0,098	0,16	0,69
Фибриноген, г/л	2,54 ± 0,663	2,54 ± 0,731	2,63 ± 0,549	0,58	0,26	0,15
Скорость роста сгустка мкм/мин	29,4 ± 3,38	40,2 ± 14,9	29,6 ± 7,35	0,015	0,43	0,018
Время задержки начала роста сгустка, мин	0,9 ± 0,0866	0,821 ± 0,089	0,8 ± 0,0739	0,064	0,014	0,67
Начальная скорость роста сгустка, мкм/мин	48,9 ± 1,49	57,6 ± 8,4	54,2 ± 9,98	0,0001	0,075	0,05
Стационарная скорость роста сгустка, мкм/мин	29,4 ± 3,38	41 ± 9,09	33,1 ± 6,48	0,003	0,15	0,022
Размер фибринового сгустка через 30 мин, мкм	1130 ± 78,4	1450 ± 205	1240 ± 142	0,0002	0,060	0,005
Плотность фибринового сгустка через 30 мин, ус. ед	19400 ± 1250	18700 ± 2810	19700 ± 1730	0,47	0,46	0,33

Примечание. Сравнение групп по критерию Wilcoxon; p1 — контроль и ГБ-1; p2 — контроль и ГБ-2; p3 — ГБ-1 и ГБ-2.

Таблица 3

Корреляционные отношения между числом форменных элементов крови и показателями гемостаза у здоровых женщин

Показатели	RBC	PLT	WBC	NEU	LYM	MON	EOS	BAS
АЧТВ	r = 0,077 p = 0,81	r = 0,142 p = 0,66	r = 0,167 p = 0,60	r = 0,146 p = 0,65	r = -0,528 p = 0,078	r = 0,581 p = 0,048	r = 0,279 p = 0,38	r = 0,03 p = 0,93
Протромбиновое время	r = -0,234 p = 0,46	r = -0,293 p = 0,35	r = 0,146 p = 0,65	r = 0,04 p = 0,90	r = 0,058 p = 0,86	r = 0,128 p = 0,69	r = -0,67 p = 0,017	r = -0,258 p = 0,42
Тромбиновое время	r = 0,468 p = 0,12	r = -0,508 p = 0,092	r = 0,209 p = 0,51	r = 0,142 p = 0,66	r = -0,251 p = 0,43	r = 0,486 p = 0,11	r = -0,11 p = 0,73	r = 0,44 p = 0,15
Плотность сгустка	r = 0,259 p = 0,42	r = 0,345 p = 0,27	r = 0,198 p = 0,54	r = 0,286 p = 0,37	r = 0,099 p = 0,76	r = 0,081 p = 0,80	r = 0,65 p = 0,022	r = 0,389 p = 0,21



Мы уже указывали на то, что все без исключения форменные элементы крови способны оказывать воздействие на процессы коагуляции. Однако, в зависимости от условий, эти влияния могут отличаться прямо противоположным действием, о чем говорят и наши данные, полученные на относительно здоровых людях и больных ГБ-1 и ГБ-2.

Нами у здоровых женщин и больных ГБ-1 не обнаружено взаимосвязи между числом эритроцитов и исследуемыми показателями системы гемостаза. Вместе с тем, при ГБ-2 выявлены отрицательные корреляционные отношения между содержанием эритроцитов и АЧТВ, что на наш взгляд, вполне закономерно. Не подлежит сомнению, что с увеличением числа эритроцитов при ГБ-2 возрастает количество микро-везикул, несущих на своей поверхности отрицательно заряженные фосфолипиды, являющиеся плацдармом для осуществления процесса свёртывания крови по внутреннему механизму [1, 23].

Не ясно, почему число тромбоцитов при ГБ-2 положительно коррелирует с ТВ. В то же время вполне закономерна взаимосвязь между содержанием тромбоцитов, скоростью образования и размером кровяного сгустка.

Общее число лейкоцитов у здоровых и больных ГБ-1 не проявляет корреляционных взаимосвязей с исследуемыми показателями системы гемостаза. Между тем, при ГБ-2 количество лейкоцитов положительно связано с ПВ и отрицательно — со стационарной скоростью образования сгустка. Отрицательные корреляционные связи при ГБ-1 также обнаружены между числом нейтрофилов начальной и средней скоростью образования сгустка

Нет никакого сомнения, что положительная связь числа лейкоцитов и ПВ у здоровых зависит от количества нейтрофилов. Подобное действие нейтрофилов на концентрации протромбина у больных ГБ-2, по всей видимости, может быть обусловлено его расхо-

Таблица 4

Корреляционные отношения между числом форменных элементов крови и показателями гемостаза у больных ГБ-1

	RBC	PLT	WBC	NEU	LYM	MON	EOS	BAS
Тромб_время	r = 0,287 p = 0,12	r = 0,009 p = 0,96	r = 0,167 p = 0,38	r = 0,238 p = 0,21	r = 0,148 p = 0,44	r = 0,071 p = 0,71	r = -0,024 p = 0,90	r = 0,351 p = 0,057
Скорость образования сгустка	r = 0,044 p = 0,89	r = -0,06 p = 0,84	r = -0,308 p = 0,31	r = -0,566 p = 0,044	r = -0,11 p = 0,71	r = 0,286 p = 0,34	r = -0,165 p = 0,59	r = 0,082 p = 0,79
Начальная скорость образования сгустка	r = -0,361 p = 0,23	r = 0,39 p = 0,19	r = -0,132 p = 0,67	r = -0,511 p = 0,074	r = 0,165 p = 0,59	r = 0,379 p = 0,20	r = 0,082 p = 0,79	r = 0,055 p = 0,86
Стационарная скорость образования сгустка	r = -0,255 p = 0,40	r = 0,229 p = 0,45	r = 0,117 p = 0,70	r = -0,198 p = 0,52	r = 0,262 p = 0,39	r = 0,589 p = 0,034	r = 0,142 p = 0,64	r = 0,07 p = 0,82
Размер сгустка	r = -0,11 p = 0,72	r = 0,132 p = 0,67	r = -0,005 p = 0,99	r = -0,363 p = 0,22	r = 0,203 p = 0,51	r = 0,566 p = 0,044	r = 0,066 p = 0,83	r = 0,253 p = 0,40

Таблица 5

Корреляционные отношения между числом форменных элементов крови и показателями гемостаза у больных ГБ-2

Показатели	RBC	PLT	WBC	NEU	LYM	MON	EOS	BAS
АЧТВ	r = -0,422 p = 0,020	r = -0,098 p = 0,61	r = -0,018 p = 0,93	r = 0,132 p = 0,50	r = -0,23 p = 0,12	r = -0,096 p = 0,62	r = -0,05 p = 0,81	r = -0,08 p = 0,68
Протромбиновое время	r = -0,04 p = 0,83	r = 0,01 p = 0,96	r = 0,394 p = 0,035	r = 0,477 p = 0,009	r = 0,116 p = 0,55	r = 0,139 p = 0,47	r = -0,03 p = 0,89	r = 0,245 p = 0,20
Тромбиновое время	r = 0,223 p = 0,24	r = 0,342 p = 0,069	r = 0,195 p = 0,31	r = 0,286 p = 0,13	r = -0,01 p = 0,97	r = 0,192 p = 0,32	r = -0,1 p = 0,61	r = 0,221 p = 0,25
Фибриноген	r = -0,082 p = 0,67	r = 0,087 p = 0,66	r = -0,126 p = 0,52	r = -0,17 p = 0,38	r = -0,09 p = 0,65	r = 0,263 p = 0,17	r = -0,08 p = 0,69	r = -0,36 p = 0,053
Скорость образования сгустка	r = -0,083 p = 0,83	r = 0,45 p = 0,22	r = -0,517 p = 0,15	r = -0,45 p = 0,22	r = -0,32 p = 0,41	r = -0,333 p = 0,38	r = -0,63 p = 0,067	r = -0,47 p = 0,21
Начальная скорость образования сгустка	r = -0,283 p = 0,46	r = 0,583 p = 0,099	r = -0,3 p = 0,43	r = -0,35 p = 0,36	r = -0,37 p = 0,33	r = 0,067 p = 0,86	r = 0,05 p = 0,88	r = -0,35 p = 0,36
Стационарная скорость образования сгустка	r = -0,533 p = 0,14	r = 0,3 p = 0,43	r = -0,667 p = 0,050	r = -0,6 p = 0,088	r = -0,77 p = 0,016	r = -0,33 p = 0,38	r = -0,03 p = 0,93	r = -0,767 p = 0,016
Размер сгустка	r = -0,35 p = 0,36	r = 0,617 p = 0,077	r = -0,317 p = 0,41	r = -0,333 p = 0,38	r = -0,4 p = 0,29	r = 0,05 p = 0,90	r = -0,05 p = 0,90	r = -0,433 p = 0,24

дом при переходе в тромбин. В частности, J.I. Borissoff и соавт. [24] указывают, что генетически навязанная гиперкоагуляция у мышей ТМ (Pro/Pro) и ApoE (-/-) приводит к тяжелому атеросклерозу, уязвимости бляшек, выраженной гиперкоагуляции и спонтанному атеротромбозу. В то же время гиперкоагуляция у таких мышей связана с выраженной нейтрофилией, гиперреактивностью нейтрофилов и их апоптозом. Не исключено, что это действие обусловлено TF, экспрессируемым нейтрофилами [24].

Вместе с тем, при ГБ-1 и ГБ-2 существует негативная связь числа нейтрофилов со скоростными параметрами образования фибринового сгустка. То есть, чем больше нейтрофилов, тем меньше должна быть скорость образования фибринового сгустка.

Известно, что нейтрофилы в зависимости от условий могут как усиливать, так и тормозить процессы гемокоагуляции, что в значительной мере зависит от содержания в них катепсина G (G Cath). Так, в плазме обедненной факторами свертывания, но содержащей TF или фосфолипидные микровезикулы, Cath G вызывает комбинацию двух расходящихся эффектов различной интенсивности, зависящей от общей поверхности фосфолипидов: ускорение процесса свертывания крови и противодействие в это же время процессу генерации тромбина, что обусловлено недостаточным образованием протромбиназы. Следовательно, Cath G в каскаде коагуляции работает, по крайней мере, с двумя различными мишенями [25]. В наших экспериментах и у здоровых и у больных ГБ проявляется негативное соотношение нейтрофилов и скорости образования фибринового сгустка.

У здоровых женщин существуют прямые корреляционные связи между числом моноцитов и АЧТВ. Известно, что моноциты и макрофаги экспрессируют в основном TF (Остеруд, Кузник, 2010, 2017). В то же время моноциты и макрофаги способны синтезировать и секретировать ингибитор внешнего пути образования протромбиназы -TFPI и таким образом нейтрализовать действие тканевой (внешней) протромбиназы [1, 26, 27]. M.P McGee et al. [26] полагают, что при воспалении состояние коагуляции во многом зависит от соотношения баланса TF и TFPI, выделяемых моноцитами и макрофагами.

Следует заметить, что у больных ГБ-1 существуют положительные взаимосвязи между моноцитами, стационарной скоростью и размером образуемого сгустка, что, безусловно, может быть объяснено их способностью экспрессировать TF [1, 27, 28]. В настоящее время мы не можем ответить на вопрос, почему у здоровых женщин должно проявляться антикоагулянтное, а у больных ГБ-1 прокоагулянтное действие моноцитов, хотя, на первый взгляд, данная реакция кажется вполне целесообразной.

Согласно нашим данным, чем больше у здоровых женщин число эозинофилов, тем меньше у них должно быть ПВ и тем больше плотность фибринового сгустка, что соответствует результатам, полученным другими авторами, и объясняется способностью этих клеток экспрессировать TF [29—31]. Кроме того, эозинофилы усиливают ферментативное окисление липидов, облегчая тем самым процессы гемостаза и образования тромбов в ответ на сосудистую травму [31].

Между тем, у больных ГБ-2 эозинофилы должны оказывать отрицательное воздействие на скорость образования фибринового сгустка (связь вероятностная). Не исключено, что у больных ГБ, регулярно занимающихся умеренной физической тренировкой (кинезитерапией) проявляется компенсаторная реакция, направленная на предотвращение развития тромбоэмболических осложнений. Последнее может быть объяснено тем, что эозинофилы играют фундаментальную роль в ингибировании агрегации тромбоцитов [32].

Наши данные говорят о том, что число базофилов у больных ГБ-1 положительно коррелирует с тромбиновым временем (чем больше базофилов, тем значительнее увеличено тромбиновое время) и отрицательно — со стационарной скоростью образования сгустка. В то же время при ГБ-2 базофилы негативно связаны с уровнем фибриногена (связь вероятностная) и стационарной скоростью формирования сгустка. Нет никакого сомнения, что эти явления обусловлены наличием в базофилах в высокой концентрации естественных антикоагулянтов — гепарина, хондроитинсульфатов А и С, дерматансульфата, гепарансульфата и других [1].

Все приведенные нами данные свидетельствуют о том, что форменные элементы крови способны оказывать воздействие на состояние системы гемостаза как у здоровых, так и больных ГБ людей. В то же время эти воздействия у здоровых и больных ГБ людей, не занимающихся спортивными упражнениями (ГБ-1) и регулярно принимающих умеренную физическую нагрузку на протяжении не менее 2 — 3 лет (ГБ-2), могут носить как однонаправленный, так и прямо противоположный характер. Более того, и у здоровых и больных ГБ-1 и ГБ-2 различные популяции форменных элементов могут оказывать на процесс свертывания крови разнонаправленный характер. У здоровых людей моноциты должны препятствовать, а тромбоциты и эозинофилы усиливать коагуляционный гемостаз. При ГБ-1 нейтрофилы ослабляют, а моноциты усиливают процесс свертывания крови. При ГБ-2 нейтрофилы, лимфоциты и базофилы препятствуют, тогда как тромбоциты способствуют образованию фибринового сгустка. Напрашивается

предположение, что в этих ситуациях в большей степени проявляется эффект тех форменных элементов крови, которые представлены большим количеством клеток. Однако это предположение нуждается в дальнейшем экспериментальном подтверждении.

Нет никакого сомнения, что состояние свёртывающей системы крови у здоровых людей и больных ГБ, на которое оказывают влияние форменные элементы крови, во многом определяется гормональным фоном, а также балансом про- и противовоспалительных цитокинов, выделяемых, лейкоцитами, тромбоцитами и эндотелиальными клетками [1, 19, 33].

В настоящее время мы не можем окончательно заключить, преобладает ли у здоровых людей и больных ГБ прокоагулянтное или антикоагулянтное действие форменных элементов крови. Вполне возможно, что решение этой проблемы лежит в сфере дальнейших исследований взаимоотношений различных форменных элементов крови и процессов коагуляции у здоровых и больных людей.

### Литература

(п.п. 2—16; 18; 24—33 см. References)

1. Кузник Б.И. *Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии*. Чита; Экспресс-издательство. 2010.
17. Иванов К.П. Лейкоцитоз и адгезия лейкоцитов при развитии ишемии мозга. *Региональное кровообращение и микроциркуляция*. 2009; 1: 47-9.
19. Давыдов С.О., Кузник Б.И., Степанов А.В., Морарь Н.В., Аюшиев О.Д. Влияние кинезитерапии на содержание «гормона молодости» ирисина у здоровых и больных ишемической болезнью сердца. *Вестник восстановительной медицины*. 2015; 5: 91-8.
20. Баркаган З.С. Момот А.П. *Диагностика и контролируемая терапия системы гемостаза*. М.; НБЮДИАМЕД, 2008.
21. Пантелеев М.А., Баландина А.Н., Сошитова Н.П. и др. Пространственная динамика гемостаза и тромбоза: теория и практика. *Гемостаз, тромбоз и реология*. 2010; 4: 48-53.
22. Зубаиров М.Д., Зубаирова Л.Д. *Микровезикулы в крови: функции и их роль в тромбообразовании*. М.; ГЭО-ТАР-Медиа, 2009.
23. Башилов Н.И., Цыбиков Н.Н., Кузник Б.И. Роль внеклеточных микровезикул в условиях нормы и патологии. *Успехи современной биологии*, 2017, 137(6): 553-65.

### References

1. Kuznik B.I. *Cellular and molecular mechanisms of hemostasis regulation in norm and pathology*. [Kletochnyye i molekulyarnyye mekhanizmy regulyatsii sistemy gemostaza v norme i patologii.]. Chita; Ekspress-izdatel'stvo, 2010. (in Russian)
2. Ozcan F, Turak O, Durak A, Isleyen A, Ucar F, Gintis Z, Ucar F, Basar FN, Aydogdu S. Red cell distribution width and inflammation in patients with non-dipper hypertension. *Blood Press*. 2013 Apr; 22(2): 80-5. doi: 10.3109/08037051.2012.707336.

3. Guedes AF, Carvalho FA, Moreira C, Nogueira JB, Santos NC. Essential arterial hypertension patients present higher cell adhesion forces, contributing to fibrinogen-dependent cardiovascular risk. *Nanoscale*. 2017 Oct 12; 9(39): 14897-906. doi: 10.1039/c7nr03891g.

4. Fu GX, Ji M, Han LZ, Xu CC, Pan FF, Hu TJ, Zhong Y. Erythrocyte rheological properties but not whole blood and plasma viscosity are associated with severity of hypertension in older people. *Z. Gerontol. Geriatr*. 2017 Apr; 50(3): 233-8. doi: 10.1007/s00391-016-1039-8. Epub 2016 Apr 26.

5. Stumpf C, Raaz D, Klinghammer L, Schneider M, Schmieder RE, Garlich CD, Achenbach S. Platelet CD40 contributes to enhanced monocyte chemoattractant protein 1 levels in patients with resistant hypertension. *Eur J Clin Invest*. 2016 Jun; 46(6): 564-71. doi: 10.1111/eci.12635.

6. Jeon Y, Lee WI, Kang SY, Kim MH. Modified Complete Blood Count Indices as Predicting Markers of Preeclampsia from Gestational Hypertension: Neutrophil to Lymphocyte Ratio, Platelet to Lymphocyte Ratio, and. *Clin Lab*. 2017 Nov 1; 63(11): 1897-902. doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.170705.

7. Kalay N., Dogdu O., Koc F. et al. Hematologic parameters and angiographic progression of coronary atherosclerosis. *Angiology*. 2012; 63(3): 213-7.

8. Balta S., Kurtoglu E., Kucuk U., Demirkol S., Ozturk C. Neutrophil-lymphocyte ratio as an important assessment tool. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2014; 12(5): 537-8.

9. Harbaum L., Baaske K.M., Simon M., Oqueka T., Sinning C., Glatzel A., Luneburg N., Sydow K., Bokemeyer C., Klose H. Exploratory analysis of the neutrophil to lymphocyte ratio in patients with pulmonary arterial hypertension. *BMC Pulm Med*. 2017 Apr 26; 17(1): 72.

10. Zhang H.C., Zhang Z.S., Zhang L., Wang A., Zhu H., Li L., Si J.Q., Li X.Z., Ma K.T. Connexin 43 in splenic lymphocytes is involved in the regulation of CD4+CD25+ T lymphocyte proliferation and cytokine production in hypertensive inflammation. *Int J Mol Med*. 2018 Jan; 41(1): 13-24. doi: 10.3892/ijmm.2017.3201. Epub 2017 Oct 20.

11. Woollard K.J., Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*. 2010; 7: 77-86.

12. Ozaki Y., Imanishi T., Taruya A. et al. Circulating CD14+CD16+ monocyte subsets as biomarkers of the severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. *Circ J*. 2012; 76: 2412-18.

13. Schwartzberg S., Meledin V., Zilberman L., Golland S., George J., Shimoni S. Low circulating monocyte count is associated with severe aortic valve stenosis. *Isr Med Assoc J*. 2013 Sept; 15(9): 500-4.

14. Tian Z., Fang Q., Zhao D.C., Cui Q.C., Liu Y.T., Zeng Y., Li M.T., Jiang X.C. The clinico-pathological manifestation of cardiac involvement in eosinophilic diseases. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2010 Aug; 49(8): 684-7.

15. Verdoia M., Schaffer A., Barbieri L., Sinigaglia F., Marino P., Suryapranata H., De Luca G.; Novara Atherosclerosis Study Group (NAS). Eosinophils count and periprocedural myocardial infarction in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Atherosclerosis*. 2014 Sep; 236(1): 169-74.

16. Withers S.B., Forman R., Meza-Perez S., Sorobetea D., Sitnik K., Hopwood T., Lawrence C.B., Agace W.W., Else K.J., Heagerty A.M., Svensson-Frej M., Cruicks-

hank S.M. Eosinophils are key regulators of perivascular adipose tissue and vascular functionality. *Sci Rep.* 2017 Mar. 17; 7: 44571.

17. Ivanov K.P. Leukocytosis and leukocyte adhesion in the development of cerebral ischemia. *Regional'noe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya.* 2009; 1: 47-9. (in Russian)

18. Toyama K., Sugiyama S., Oka H., Iwasaki Y., Sumida H., Tanaka T., Tayama S., Jinnouchi H., Ogawa H. Combination treatment of rosuvastatin or atorvastatin, with regular exercise improves arterial wall stiffness in patients with coronary artery disease. *PLoS One.* 2012; 7(7): e41369.

19. Davydov S.O., Kuznik B.I., Stepanov A.V., Morar' N.V., Ayushiyev O.D. The effect of kinesitherapy on the maintenance of the «hormone of youth» irisin in healthy and sick with ischemic heart disease. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny.* 2015; 5: 91-8.

20. Barkagan Z.S., Momot A.P. *Diagnosis and controlled therapy of the hemostasis system. [Diagnostika i kontroliruyemaya terapiya sistemy gemostaza.]* Moscow; N'yudiamed; 2008. (in Russian)

21. Panteleev MA, Balandina AN, Soshitova N.P. et al. Spatial dynamics of hemostasis and thrombosis: theory and practice. *Gemostaz, tromboz i reologiya.* 2010; 4: 48-53. (in Russian)

22. Zubairov M.D., Zubayrova L.D. *Microvesicles in the blood: functions and their role in thrombus formation. [Mikrovezikuly v krvi: funktsii i ikh rol' v tromboobrazovanii.]* Moscow; GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)

23. Bashilov N.I., Tsybikov N.N., Kuznik B.I. The role of extracellular microvesicles in normal and pathological conditions. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2017; 137(6): 553-65. (in Russian)

24. Borissoff J.I., Otten J.J., Heeneman S., Leenders P., van Oerle R., Soehnlein O., Loubele S.T., Hamulyak K., Hackeng T.M., Daemen M.J., Degen J.L., Weiler H., Esmont C.T., van Ryn J., Biessen E.A., Spronk H.M., ten Cate H. Genetic and pharmacological modifications of thrombin formation in apolipoprotein e-deficient mice determine atherosclerosis severity and atherothrombosis onset in a ne-

utrophil-dependent manner. *PLoS One.* 2013; 8(2): e55784. doi: 10.1371/journal.pone.0055784. Epub 2013 Feb 7.

25. Perrin J., Lecompte T., Tournier A., Morlon L., Marchand-Arvier M., Vigneron C. In vitro effects of human neutrophil cathepsin G on thrombin generation: Both acceleration and decreased potential. *Thromb Haemost.* 2010 Sep; 104(3): 514-22. doi: 10.1160/TH09-10-0690. Epub 2010 Jun 29.

26. McGee M.P., Wallin P., Wheeler F.B. Initiation of the extrinsic pathway of coagulation by human alveolar macrophages. *Blood.* 1989; 5: 1583-9.

27. Bajaj M.S., Chosh M., Bajaj S.P. Fibronectin-adherent monocytes express tissue factor and tissue factor pathway inhibitor whereas endotoxin-stimulated monocytes primarily express tissue factor. *J. Thrombosis and Haemostasis.* 2007; 7: 1493-9.

28. Osterud B. Tissue factor in neutrophils: no. *J. of Thrombosis and Haemostasis.* 2004; 2(2): 218-20.

29. Cugno M., Marzano A.V., Lorini M., Carbonelli V., Tedeschi A. Enhanced tissue factor expression by blood eosinophils from patients with hypereosinophilia: a possible link with thrombosis. *PLoS One.* 2014 Nov 6; 9(11): e111862. doi: 10.1371/journal.pone.0111862. eCollection 2014.

30. Ishii J., Yamamoto S, Yoshimura H., Todo K., Kawamoto M., Kohara N. Multiple cerebral infarctions in a patient with hypereosinophilic syndrome with Loffler endocarditis: a case report. *Rinsho Shinkeigaku.* 2015; 55(3): 165-70. doi: 10.5692/clinicalneuro.55.165.

31. Uderhardt S., Ackermann J.A., Fillep T., Hammond V.J., Willeit J., Santer P., et al. Enzymatic lipid oxidation by eosinophils propagates coagulation, hemostasis, and thrombotic disease. *J Exp Med.* 2017 Jul 3; 214(7): 2121-38. doi: 10.1084/jem.20161070. Epub 2017 May 31.]

32. Maziero A.M., Lorenzetti R., Donato J.L., Lilla S., De Nucci G. Inhibition of human platelet aggregation by eosinophils. *Life Sci.* 2013 Sep 17; 93(9-11): 416-22. doi: 10.1016/j.lfs.2013.07.012. Epub 2013 Jul 19.

33. Kuznik B.I. Cytokines and hemostasis system. *Message 2. Cytokines and coagulation hemostasis. Tromboz, gemostaz i reologiya.* 2012; 3: 9-29. (in Russian)

### Сведения об авторах:

Кузник Борис Ильич, доктор мед. наук, проф., каф. нормальной физиологии, науч. консультант инновационной клиники «Академия Здоровья», e-mail: bi\_kuznik@mail.ru;

Давыдов Сергей Олегович, доктор мед. наук, руководитель инновационной клиники «Академия Здоровья», министр здравоохранения Забайкальского края;

Гусева Екатерина Сергеевна, канд. мед. наук, заместитель директора по клинико-экспертной и организационно-методической работе;

Смоляков Юрий Николаевич, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. медицинской физики и информатики, e-mail: smolyakov@ Rambler.ru;

Степанов Александр Валентинович, доктор мед. наук, зав. каф. безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф;

Цыбиков Намжил Нанзатович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии.

Лычева Н.А., Шахматов И.И., Макушкина Д.А., Седов А.В.

## Состояние системы гемостаза у крыс при действии однократной иммерсионной гипотермии

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
Алтайский край, 656038, г. Барнаул, Россия, проспект Ленина, д. 40

**Цель** — изучение системы гемостаза при однократной иммерсионной гипотермии у крыс. **Методика.** Исследования выполнены на 40 крысах-самцах Wistar, массой  $300 \pm 15$  г. Иммерсионную гипотермию моделировали путем погружения находящихся в индивидуальных клетках животных в воду с температурой  $5^\circ\text{C}$  при  $t$  воздуха  $7^\circ\text{C}$ . Критерием прекращения воздействия служило снижение у экспериментальных животных ректальной температуры до  $10\text{—}16^\circ\text{C}$ , что соответствовало сверхглубокой степени гипотермии. Время экспозиции было индивидуальным и составило  $55 \pm 5$  мин. Контролем служила кровь 20 животных, подвергшихся аналогичной процедуре при температуре воды  $30^\circ\text{C}$  и воздуха  $22\text{—}25^\circ\text{C}$ . Время экспозиции соответствовало времени охлаждения животных опытной группы. В дальнейшем все животные были разделены на 4 группы. У животных 1-й группы (контроль) забор крови осуществлялся сразу после извлечения из воды. У животных 2-й группы (опытная) сразу по достижении сверхглубокой степени гипотермии. В 3-й группе — кровь забирали через 24 ч после извлечения из теплой воды (контроль). В 4-й группе забор крови осуществлялся через 24 ч после прекращения охлаждения (опытная). **Результаты.** Сравнительный анализ результатов показал, что сразу по окончании однократного холодового воздействия наблюдалось увеличение агрегационной активности тромбоцитов и развитие гипокоагуляционных сдвигов, снижение концентрации антитромбина III на фоне повышения концентрации фибриногена и угнетения активности фибринолитического звена системы гемостаза. Описанный гемостазиологический статус укладывается в картину формирования дистрессорной реакции в ответ на однократное действие раздражителя. Через 1 сут. после достижения экспериментальными животными критической температуры ядра в кровотоке сохранялись гипокоагуляционные сдвиги, увеличивалась концентрация фибриногена и регистрировалось появление маркеров тромбинемии. Таким образом, через 1 сут. после общего переохлаждения сохранялся риск развития состояния тромботической готовности и усиливалось состояние дистресса. **Заключение.** Признаки нарушения гемостазиологических свойств крови, зафиксированные сразу после прекращения охлаждения, через сутки усугубляются появлением в кровотоке маркеров тромбинемии.

**Ключевые слова:** гипотермия, постгипотермический период, гемостаз, тромботическая готовность.

**Для цитирования:** Лычева Н.А., Шахматов И.И., Макушкина Д.А., Седов А.В. Состояние системы гемостаза у крыс при действии однократной иммерсионной гипотермии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 93—97.

DOI:

**Для корреспонденции:** Лычева Наталья Александровна, канд. биол. наук, доцент каф. нормальной физиологии, e-mail: Natalia.lycheva@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60054/15 мол\_а\_дк

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.07.2017

Lycheva N.A., Shahmatov I.I., Makushkina D.A., Sedov A.V.

## The state of rat hemostasis system under the action of a single exposure to immersion hypothermia

Altai State Medical University, Prospekt Lenina 40, Barnaul 656038, Altai Territory, Russia

**Aim.** To study the state of rat hemostasis system during hypothermia and in post-hypothermic period. **Methods.** The study was performed on 40 Wistar male rats weighing  $300 \pm 15$  g. Immersion hypothermia was modeled by placing the animals in individual cells in water at a water temperature of  $5^\circ\text{C}$  and an air temperature of  $7^\circ\text{C}$ . The criterion for terminating the exposure was a decrease in rectal temperature to  $10\text{—}16^\circ\text{C}$ , which corresponded to ultra-deep hypothermia. Exposure time was individual and averaged  $55 \pm 5$  minutes. The control was the blood of 20 animals withdrawn after they had been placed in water in individual cells at a water temperature of  $30^\circ\text{C}$  and an air temperature of  $22\text{—}25^\circ\text{C}$ . The exposure time was similar to the cool-

ing time of animals of the experimental group. Then all animals were divided into 4 groups. In the first group (control), blood was withdrawn immediately after removing the rats from water. In the second group (experimental) — immediately after reaching ultra-deep hypothermia. In the third group — at 24 hours after removing the rats from water (control). In the fourth group — at 24 hours after the end of cooling (experimental). **Results.** Comparative analysis of the results showed that immediately after the end of single cold exposure, the platelet aggregation activity was increased with development of hypocoagulation shifts, and the antithrombin III concentration was decreased, which was associated with increased fibrinogen concentration and inhibition of the fibrinolytic system activity. The described hemostasiological status fits into the picture of a distress response to a single action of the stimulus. One day after the experimental animals have reached the critical core temperature, hypocoagulation shifts persisted in the blood, fibrinogen concentration increased, and thrombinemia markers emerged. Therefore, one day after general hypothermia, the risk for developing the state of thrombotic readiness remained, and the state of distress increased. **Conclusions.** The signs of impaired hemostasiological properties of the blood observed immediately after the end of cooling were aggravated in 24 hours by emergence of thrombinemia markers in the blood.

**Keywords:** hypothermia, posthypothermal period, hemostasis, thrombotic readiness.

**For citation:** Lycheva N.A., Shahmatov I.I., Makushkina D.A., Sedov A.V. The state of rat hemostasis system under the action of a single exposure to immersion hypothermia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 93—97. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Lycheva Natalia Alexandrovna, Candidate of Biological Sciences, Assistant of professor of normal physiology department FSBE Institution of Higher Education «Altai State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation; 40, ul. Lenin, Barnaul, 656038, Russia, e-mail: Natalia.lycheva@yandex.ru

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

**Acknowledgments.** The reported study was funded by RFBR, according to the research project № 16-34-60054 mol\_a\_dk.

**Information about authors:**

Lycheva N.A., <http://orcid.org/0000-0002-6488-340X>

Shahmatov I.I., <http://orcid.org/0000-0002-4606-3627>

Makushkina D.A., <http://orcid.org/0000-0002-7264-6412>

Sedov A.V., <http://orcid.org/0000-0003-3200-9117>

**Received** 27.07.2017

## Введение

В естественных условиях при общем переохлаждении повреждающее действие холода на ткани вызывает комплексную ответную реакцию организма. В формирование срочного ответа на холод вовлекаются все органы и системы. При этом основным компонентом, обеспечивающим адекватность трофики тканей, для сохранения функционирования организма, является система гемостаза. Показано, что выраженность ответной реакции со стороны системы гемостаза зависит от множества факторов, определяющим из которых является уровень температуры тела, достигнутый в ходе гипотермии [1, 2]. При этом регистрируются как гипокоагуляционные нарушения в системе гемостаза [3], так и гиперкоагуляционные сдвиги, вплоть до развития ДВС-синдрома [4]. В патофизиологическом течении холодовой травмы выделяют собственно гипотермический и постгипотермический периоды. Гипотермический период характеризуется развитием декомпенсаторных изменений в организме животного. Постгипотермический период, в свою очередь, характеризуется формированием и манифестацией травматических последствий действия общего переохлаждения на организм [5—7]. По статистиче-

ским данным самое большое число летальных исходов регистрируется в первые 26 ч после возвращения температуры тела к нормальным значениям, т.е. в раннем реактивном периоде. Прогнозирование возможных нарушений со стороны системы гемостаза, развивающихся сразу после прекращения охлаждения и по истечении 24 ч, позволит минимизировать последствия повреждающего действия гипотермии на организм. **Цель исследования** — изучение состояния системы гемостаза при однократной иммерсионной гипотермии у крыс в гипотермический и постгипотермический периоды.

## Методика

Исследования выполнены на 40 крысах-самцах Wistar, массой  $300 \pm 15$  г. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Исследование одобрено этическим комитетом университета. Иммерсионную гипотермию моделировали путем помещения животных, находящихся в индивидуальных клетках, в воду при  $t 5^\circ\text{C}$  и воз-

духа 7°C. Критерием прекращения воздействия служило достижение у экспериментальных животных ректальной температуры 10—16°C, что соответствовало сверхглубокой степени гипотермии. Время экспозиции было индивидуальным и составляло в среднем  $55 \pm 5$  мин. Контролем служила кровь 20 животных, после их помещения в индивидуальные клетки в воду температурой 30°C и воздуха 22—25°C. Время экспозиции соответствовало времени охлаждения животных экспериментальной группы. В дальнейшем все животные были разделены на 4 группы. Исследования гемостаза у опытных и контрольных животных проводили непосредственно после извлечения из воды (1-я и 2-я группа) и через 24 ч (3-я и 4-я группа).

Забор крови у всех групп животных осуществлялся под наркозом (внутрибрюшинное введение раствора зоветила, 5 мг/100 г), после чего животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации. У всех животных исследовались показатели тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, а также антикоагулянтная и фибринолитическая активность плазмы крови с помощью наборов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия). Индуцированную агрегацию тромбоцитов проводили по G.V.R. Born (1962) на агрегометре «Биола» (Россия), в качестве индуктора использовался раствор аденозиндифосфата (АДФ) концентрацией 10 мкг/мл. Тромбоэластометрия выполнялась на приборе «Rotem» («Pentapharm GmbH», Германия) с использованием реагента «Natem», в состав которого входит хлорид кальция. Кровь для исследования в объеме 5 мл получали путем забора из печеночного синуса в полистироловый шприц, содержащий 0,11 М (3,8%) раствора цитрата натрия (соотношение крови и цитрата 9:1).

До проведения эксперимента на протяжении недельной адаптации к условиям вивария все крысы находились в стандартных условиях содержания.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли путем вычисления медианы (Me) и процентилей (25% и 75%). Статистический анализ выполнен с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни, на персональном компьютере с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

### Результаты и обсуждение

Полученные результаты суммированы в таблице. При анализе острого влияния гипотермии сразу по завершении воздействия наблюдалось статистически

значимое повышение числа тромбоцитов на 16% при неизменности их агрегационных свойств, тогда как через 1 сут. после прекращения гипотермического воздействия количество кровяных пластинок снижалось на 13%, а их агрегационная активность значительно возрастала (на 40%).

В то же время, сразу по достижении ректальной температуры заданного уровня и через 1 сут. после гипотермии однонаправленные изменения регистрировались как на внутреннем, так и на внешнем пути образования протромбиназы в системе гемокоагуляции. Сразу после прекращения охлаждения активированное парциальное тромбопластиновое время статистически значимо увеличивалось на (80%) и через 24 ч (1 сут.) существенно превосходило контрольные значения (на 42%). Протромбиновое время сразу по окончании охлаждения возрастало на 16% и через 1 сут. увеличивалось на 31%. Все изменения статистически значимы.

Лабораторные показатели подтверждаются и данными тромбоэластограммы. Показатель СТ статистически значимо возрастал как в группе острого воздействия (на 38%), так и в группе при оценке отсроченного влияния гипотермии (на 20%).

Через 1 сут. после прекращения холодного воздействия в кровотоке животных впервые регистрировались растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), отсутствовавшие на момент окончания общего переохлаждения. Возросший уровень фибриногена регистрировался как сразу после прекращения гипотермии (статистически значимое увеличение концентрации на 30%), так и по истечении 24 ч — увеличение концентрации на 45%.

Сразу по завершении действия гипотермии регистрировалось снижение концентрации антитромбина III на 65%, тогда как через 1 сут его уровень приходил в норму и не отличался от показателей контрольной группы. Аналогичные изменения наблюдались и в активности фибринолитического звена системы гемостаза. Так, острое воздействие приводило к угнетению активности системы фибринолиза в 4 раза ( $p < 0,05$ ), в то время как по истечении суток она возвращалась к норме, что также подтверждается данными тромбоэластографии. Показатель ML, характеризующий процент лизиса сгустка, в группе острого воздействия был значимо ниже уровня контрольных значений (на 87%), в то время как при оценке отсроченного влияния гипотермии статистически значимых различий по данному показателю обнаружено не было.

Таким образом, сразу по достижении сверхглубокой степени гипотермии наблюдалось развитие гипокоагуляционных сдвигов, снижение концентрации антитромбина III на фоне повышения концентрации

фибриногена и угнетения активности фибринолитического звена системы гемостаза. Описанный гемостазиологический статус укладывается в картину формирования дистрессорной реакции в ответ на однократное действие раздражителя. Однако при этом не выявлено маркеров тромбинемии. Появление маркеров внутрисосудистого свертывания было зарегистрировано лишь по истечении 24 ч на фоне еще более возросшей концентрации фибриногена. Появление в кровотоке РФМК демонстрирует не только усугубление дистресса, но и формирование состояния тромботической готовности.

Охлаждение водой характеризуется контактом всей поверхности тела животного с охлаждающей средой, что сопровождается одномоментным спазмом периферических сосудов и равномерным снижением кровотока в поверхностных тканях [8, 9]. Столь

мощное воздействие стрессора сопровождается выбросом в кровоток адреналина и, соответственно, активацией процессов свертывания [10, 11]. Однако локальных травм, которым сопутствует нарушение морфологической структуры ткани, при этом не наблюдается. Кроме того, снижение температуры ядра способствует снижению активности ферментов. В нашем исследовании это подтверждается активацией агрегационной активности тромбоцитов на фоне гипокоагуляционных сдвигов, зарегистрированных сразу после окончания охлаждения.

В постгипотермическом периоде мы наблюдали развитие состояния тромботической готовности. Это, по-видимому, обусловлено развитием нарушений в работе внутренних органов в виду ряда причин. Снижение ректальной температуры до критических величин сопровождается развитием тотальной вазо-

Таблица

Результаты исследования показателей системы гемостаза у крыс сразу после достижения ректальной температуры +10 — +16°C и по истечении 24 ч

Параметр	Контроль (1-я гр.) (n = 10)	Гипотермия (2-я гр.) (n = 10)	Контроль (3-я гр., через 24 ч) (n = 10)	Гипотермия (4-я гр., через 24 ч) (n = 10)	p
Количество тромбоцитов, 10 <sup>9</sup> /л	529,5 [505,5-562,0]	643,0 [596,0-691,0]	504,0 [497,0-558,5]	447,0 [428,0-482,0]	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>3-4</sub> <0,05
Агрегация, отн. ед.	5,6 [2,9-13,5]	4,5 [2,5-7,5]	16,4 [12,8-29,9]	24,9 [22,7-26,9]	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>3-4</sub> <0,05
Силиконовое время, с	136,0 [108,7-163,0]	150,5 [120,7-180,7]	240,0 [209,0-252,5]	234,0 [193,0-262,0]	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>3-4</sub> >0,05
АПТВ, с	11,2 [10,5-11,3]	20,7 [18,5-21]	15,3 [14,9-18,3]	24,3 [23,5-26,0]	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>3-4</sub> <0,05
Протромбиновое время, с	23,2 [21,9-24,3]	26,8 [25,6-29,1]	23,9 [21,7-25,5]	29,0 [25,0-30,3]	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>3-4</sub> <0,05
РФМК, мг/100 мл	3,0 [3,0-3,0]	3,0 [3,0-4,2]	3,0 [3,0-3,0]	5,5 [4,5-6,0]	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>3-4</sub> <0,05
Фибриноген, г/л	2,1 [2,1-2,2]	2,8 [2,4-3,4]	2,2 [2,0-2,5]	3,1 [2,4-3,3]	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>3-4</sub> <0,05
ВПФМ, г	1,9 [1,9-2,1]	2,0 [1,8-2,7]	2,3 [2,3-2,3]	2,5 [2,1-2,9]	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>3-4</sub> >0,05
АТ III, %	118,0 [118,0-118,0]	77,2 [72,3-78,7]	110,0 [103,6-117,0]	108,9 [97,6-128,0]	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>3-4</sub> >0,05
Эуглобулиновый фибринолиз, мин	447,0 [360,0-558,0]	1689,0 [1689,0-1734,0]	340,0 [300,0-415,0]	231,0 [230,5-284]	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>3-4</sub> >0,05
СТ, с	206,0 [161,0-231,0]	286,0 [233,2-343,0]	227,5 [221,2-237,5]	262,0 [233,0-281,0]	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>3-4</sub> <0,05
CFT, с	72,0 [58,2-85,0]	84,0 [70,0-95,0]	72,5 [60,5-81,5]	55,0 [36,0-66,5]	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>3-4</sub> >0,05
ML, %	15,0 [11,0-22,0]	2,0 [0,0-4,0]	27,5 [17,2-47]	22,0 [14,5-42,5]	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>3-4</sub> >0,05

Примечание. Данные представлены в виде Me — медиана выборки; [25-75] — проценти выборки; n — число наблюдений; p — уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей. 1, 2\* — кровь животных сразу после извлечения из камеры; 3, 4\* — кровь животных через 24 ч после извлечения из камеры; АПТВ — активированное парциальное тромбопластиновое время; РФМК — растворимые фибрин-мономерные комплексы; ВПФМ, г — время полимеризации растворимых фибрин-мономерных комплексов; АТ III — антитромбин III; СТ — время коагуляции; CFT — время образования сгустка; ML — максимальный лизис.



дилатации, приводящей к устремлению холодной крови к внутренним органам и, следовательно, повреждению их морфологической структуры. Вазодилатация также способствует наполнению шоковых органов кровью [12, 13] и, по всей видимости, тромбированию сосудов. В то же время для развития тромботических и ишемических повреждений требуется определенное время. Возможно, поэтому мы регистрировали появление в кровотоке маркеров тромбинемии только по истечении 24 ч.

Таким образом, сразу по завершении гипотермического воздействия обращали на себя внимание возросший уровень фибриногена, а также снижение концентрации антитромбина III и угнетение фибринолитической активности плазмы крови, что подтверждало развитие состояния дистресса. Через 1 сут. (24 ч) после достижения у экспериментальных животных критической температуры ядра в кровотоке увеличивалась концентрация фибриногена и регистрировались маркеры тромбинемии. Таким образом, через 1 сут. после общего переохлаждения сохранялся риск развития состояния тромботической готовности и усиливалось состояние дистресса.

### Литература

#### (п.п. 2, 3, 5—13 см. References)

1. Голохваст К.С. Аспекты механизма влияния низких температур на человека и животных. *Вестник новых медицинских технологий*. 2011; 18 (2): 486-9.
4. Румянцев Г.В. Динамика теплового обмена у крыс при выходе из состояния искусственной глубокой гипотермии. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2007; 93 (11): 1326-31.

### References

1. Golokhvast K.S. Aspects of the mechanism of the effect of low temperatures on humans and animals. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2011; 18(2): 486-9. (In Russian)
2. Bouchama A. Pathogenetic mechanisms of heatstroke and novel therapies. *Cr. Care*. 2012; 16 (Suppl 2): 17-20.
3. Effect of mild hypothermia on the coagulation-fibrinolysis system and physiological anticoagulants after cardiopulmonary resuscitation in a porcine model. *Int. J. Clin. Exp. Med*. 2013; (8): 16-21.
4. Rumyantsev G.V. Dynamics of heat exchange in rats upon exiting from the state of artificial deep hypothermia. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2007; 93(11): 1326-31. (In Russian)
5. Fisher B. Rewarming following hypothermia of two to twelve hours. Some metabolic effects. *Annals of Surgery*. 1958; 148(1): 32-43.
6. Jiang S. Potential role of therapeutic hypothermia in the salvage of traumatic hemorrhagic shock. *Critical Care*. 2013; (17): 318-22.
7. Ledingham I.Mc. A. Treatment of accidental hypothermia: a prospective clinical study. *British Medical Journal*. 1980; (4): 1102-6.
8. Clinical hypothermia temperatures increase complement activation and cell destruction via the classical pathway. *Journal of Translational Medicine*. 2014; (12): 181-7.
9. Foulis A.K. Morphological study of the relation between accidental hypothermia and acute pancreatitis. *I. Clin. Pathol*. 1982; (35): 1244-8.
10. Heart rate and arterial pressure changes during whole-body deep hypothermia (Clinical Stud). *Pediatrics*. 2013; (13): 6-10.
11. Cooke R. The role of the myosin ATP-ase activity in adaptive thermogenesis by skeletal muscle. *Biophys. Rev*. 2011; (3): 33-45.
12. Kiyatkin E.A. Brain temperature homeostasis: physiological fluctuations and pathological shifts. *Front Biosci. Behavioral Neuroscience*. 2014; (15): 73-92.
13. Liu S. Strategies for therapeutic hypometabothermia. *J. Exp. Stroke Transl. Med*. 2012; 5(1): 31-42.

### Сведения об авторах:

Лычева Наталья Александровна, канд. биол. наук, доцент каф. нормальной физиологии, e-mail: Natalia.lycheva@yandex.ru;

Шахматов Игорь Ильич, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. нормальной физиологии;

Макушкина Дарья Александровна, студентка 4 курса лечебного факультета;

Седов Антон Вячеславович, студент 4 курса лечебного факультета.

Шабалин В.В.<sup>1</sup>, Шатохина С.Н.<sup>2</sup>, Кубатиев А.А.<sup>2</sup>, Шабалин В.Н.<sup>2</sup>

## Структурный отклик сыворотки крови человека на воздействие электромагнитных излучений низкой интенсивности

<sup>1</sup> ФГБНУ Санкт-Петербургский НИИ уха горла носа и речи, 190013, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Бронницкая, д. 9

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

**Цель работы:** исследование характера отклика сыворотки крови больных и здоровых людей на внешнее электромагнитное воздействие. **Методика.** Исследована сыворотка крови 130 пациентов с различными видами патологии и 30 здоровых доноров на внешнее электромагнитное излучение (ЭМИ). Применялось ЭМИ крайне высокой частоты (КВЧ), низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), а также сочетанного применения двух источников ЭМИ (НИЛИ и КВЧ) на сыворотку крови. Оценка эффекта ЭМИ осуществлялась по структурам твёрдой фазы (фациям) сыворотки крови, получаемым методом клиновидной дегидратации. Метод состоял в нанесении капли сыворотки крови (контроль, опыт) на поверхность стекла тест-карты, которую помещали в сушильный комплекс для дегидратации в стандартных условиях (температура 25°C, относительная влажность 55—60%, экспозиция 18—24 ч). **Результаты.** Установлено 3 типа отклика структуры фаций сыворотки крови больных на воздействие внешнего источника излучения: нормализация структуры, усиление её дезинтеграции и отсутствие эффекта. Показано, что эффект нормализации (гармонизации) структуры фаций сыворотки крови достигался наиболее часто при применении комбинации источников ЭМИ в последовательности: лазер + ЭМИ КВЧ. Сыворотка крови здоровых доноров в подавляющем большинстве не была чувствительна к данным видам ЭМИ. **Заключение.** Высказано предположение, что метод клиновидной дегидратации сыворотки крови при воздействии на неё ЭМИ можно использовать как детектор чувствительности организма к различным слабым электромагнитным излучениям. Это даёт возможность подбора *in vitro* определённых видов источников ЭМИ для обеспечения оптимального терапевтического эффекта.

**Ключевые слова:** твёрдая фаза сыворотки крови, метод клиновидной дегидратации, электромагнитное излучение.

**Для цитирования:** Шабалин В.В., Шатохина С.Н., Кубатиев А.А., Шабалин В.Н. Структурный отклик сыворотки крови человека на воздействие электромагнитных излучений низкой интенсивности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 98—103.

DOI:

**Для корреспонденции:** Шатохина Светлана Николаевна, доктор мед. наук, зав. лаб. биокристалломики, e-mail: sv\_n@list.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.10.2018

Shabalin V.V.<sup>1</sup>, Shatokhina S.N.<sup>2</sup>, Kubatiev A.A.<sup>2</sup>, Shabalin V.N.<sup>2</sup>

## Structural response of human blood serum to low intensity electromagnetic radiation

<sup>1</sup> St. Petersburg Research Institute of Ear, Throat, Nose and Speech, Bronnitskaya Str. 9, St. Petersburg 190013, Russia

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8. Moscow 125315, Russia

The study of blood serum (BS) response to external electromagnetic radiation (EMR) was performed in 130 patients with different types of pathology and 30 healthy donors. **Aim.** To study the response of BS solid phase structure to external electromagnetic effects in patients and healthy subjects. **Method.** Effects of extremely high frequency (EHF) EMR, low-intensity laser radiation (LILR), and a combination of two EMR sources (LILR and EHF) on BS were studied. EMR effects were evaluated on BS solid phase structures (facies) obtained by the method of cuneiform dehydration. The method consisted of applying a drop of BS (control, experiment) on the surface of a glass test card, which was placed in a dryer for dehydration under the standard conditions (temperature, 25°C; relative humidity, 55—60%; exposure time, 18—24 h). **Results.** Three types of facies structure response to the effect of external radiation were observed in BS patients: normalization of the structure, strengthening of its disintegration, and lack of effect. The effect of BS facies structure normalization (harmonization) was achieved most frequently with a combination of EMR sources in a sequence of LILR + EMR. The vast majority of healthy donors were not sensitive to these types of EMR. **Conclusion.** We suggested that the method of BS cuneiform dehydration under the action of

EMR can be used for detection of body sensitivity to various kinds of weak electromagnetic radiation. This allows to select *in vitro* certain types of EMR sources to ensure an optimal therapeutic effect.

**Keywords:** solid phase of blood serum, method of cuneiform dehydration, electromagnetic radiation.

**For citation:** Shabalina V.V., Shatokhina S.N., Kubatiev A.A., Shabalina V.N. Structural response of human blood serum to the influence of electromagnetic radiation of low intensity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 98—103. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Shatokhina S.N., Dr. med. Sciences, head. lab. biocrystalloid, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russia, e-mail: sv\_n@list.ru

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

**Information about authors:**

Shatokhina S.N., <http://orcid.org/0000-0001-9441-4383>

Shabalina V.N., <http://orcid.org/0000-0001-8002-2362>

**Received** 05.10.2018

## Введение

С момента зарождения жизнь на нашей планете находится под воздействием естественного электромагнитного фона. Однако в течение последних десятилетий человек создал искусственное электромагнитное поле, которое уже существенно превышает уровень природной радиации, и его активность продолжает увеличиваться нарастающими темпами. Вместе с тем вопрос о том, как электромагнитное поле влияет на организм человека, являющегося также источником электромагнитного излучения, во многом остаётся неясным [1 — 3].

Поиски связей между долгосрочным радиочастотным воздействием при использовании мобильных телефонов и опухолями головного мозга не дали никаких убедительных результатов. В ряде работ было изучено влияние электромагнитных полей на электрическую активность мозга, когнитивные функции, сон, сердечный ритм и кровяное давление [4, 5]. Однако на сегодняшний день нет убедительных доказательств неблагоприятного воздействия на здоровье человека неионизирующей радиации. В частности, данные, характеризующие степень канцерогенной опасности электромагнитных излучений нередко противоречивы и не позволяют однозначно ответить на вопрос о возможной роли этого фактора в онкопатологии.

Исследования, проведенные на животных, также не показали повышенного риска развития рака при долгосрочных воздействиях электромагнитных полей. Нужны дальнейшие комплексные исследования, чтобы внести ясность в рассматриваемую проблему [6].

В настоящее время в медицине наиболее часто применяют низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ). Известно, что позитивное, стимулирующее действие НИЛИ проявляется, как правило, в узком интервале доз облучения, а затем исчезает или

даже сменяется угнетающим действием [7, 8]. Становится очевидной необходимость в существенном углублении сведений о действии электромагнитного излучения (ЭМИ) на живые организмы.

Структура неклоточных тканей организма — биологических жидкостей (БЖ) обусловлена слабыми связями и высокочувствительна к внешним воздействиям. Волны внешнего источника, имеющие определенные параметры, оказывают либо синхронизирующее, либо десинхронизирующее влияние на внутримолекулярные и межмолекулярные взаимоотношения компонентов БЖ [9]. Положительный эффект связан с гармонизацией этих взаимоотношений, что обеспечивает успешность применения волновых средств (КВЧ, ультрафиолетовое, лазерное излучение, мягкое рентгеновское излучение, вихревые токи и др.) при физиотерапевтических воздействиях на организм больного.

Терапевтические эффекты различных электромагнитных полей (ЭМП) определяются, прежде всего, их частотой и интенсивностью. Проведенные экспериментальные и теоретические исследования выявили «дielekтрическое насыщение» в растворах белков и других макромолекул под действием непрерывных и импульсных ЭМП высоких и ультравысоких частот (100 МГц). Под действием таких полей все поляризованные боковые цепи макромолекул ориентируются в направлении электрических силовых линий, что может привести к разрыву водородных и других вторичных внутри- и межмолекулярных связей и изменению степени гидратации молекул [10].

Виды воздействия ЭМП на человека и другие биологические объекты могут быть самыми разнообразными: непрерывное и прерывистое, общее и локальное, комбинированное от нескольких источников и пр. На биологическую реакцию влияют также такие

параметры ЭМП, как интенсивность поля, частота излучения, продолжительность облучения, модуляция сигнала, сочетание частот ЭМП, периодичность действия и др. Различные сочетания действующих параметров вызывают специфические изменения в тканях облучаемого биологического объекта [1, 11]. Однако объективная оценка таких воздействий на уровне молекулярных изменений, происходящих в высокоподвижных БЖ — далеко не тривиальная задача и её нельзя считать решенной.

*Цель исследования* — определение характера отклика сыворотки крови (СК) пациентов с различными видами патологии на внешнее электромагнитное воздействие.

### Методика

При исследовании применялось воздействие электромагнитного излучения (ЭМИ): крайне высокой частоты (КВЧ), низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), а также сочетанного применения 2 источников ЭМИ (НИЛИ и КВЧ) на СК. Для этого были использованы российские установки: лазерные медицинские (УЛМ) «Оптика-комплекс» (ФНПЦ «Прибор») и «КВЧ-М-1И-МТА» (ООО «Апмкот», ЗАО «МТА-КВЧ», Москва).

Материалом для исследования являлась СК 130 пациентов с различными заболеваниями. Контролем служила СК 30 здоровых доноров. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена этической комиссией института.

Кровь для исследования брали из локтевой вены в сухую пробирку в количестве 8—10 мл. Сыворотку крови получали после образования сгустка и центрифугирования в течение 10 мин при 1500 g. Полученную СК разливали по 1,0 мл в пробирки Эппендорфа и, в одинаково равных условиях, оказывали на неё воздействие соответствующим ЭМИ. 1-ю пробирку облучали НИЛИ с длиной волны  $\lambda = 0,89$  мкм, частотой  $\gamma = 150$  Гц, мощностью в импульсе  $P_{имп} = 4$  Вт, время экспозиции 10 мин; 2-ю пробирку облучали ЭМИ КВЧ с длиной волны  $\lambda = 5,6$  мм, модуляцией 16 Гц, частотой  $\gamma = 52,58$  ГГц, плотностью тока мощности на выходе —  $8$  мВт/см<sup>2</sup>, время экспозиции 20 мин; 3-ю пробирку последовательно облучали ЭМИ КВЧ, а затем НИЛИ, а 4-ю — в обратном порядке (НИЛИ затем ЭМИ КВЧ) с перерывом между облучениями 10 мин (параметры облучения были теми же, что и для 1-й и 2-й пробирок).

С целью объективной оценки эффекта указанных ЭМИ использован метод клиновидной дегидратации

БЖ [12]. Метод клиновидной дегидратации осуществлялся следующим образом: полуавтоматическим дозатором наносили СК по 0,02 мл в окошки тест-карты (ТК-4) диагностического набора «Литос-система» (Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/02488 от 29.04.2008), тест-карту помещали в сушильный комплекс с заданной температурой (25°C) и относительной влажностью (55—60%) для дегидратации в стандартных условиях. Из каждого образца СК готовили два препарата — до воздействия источника излучения (контроль) и непосредственно после воздействия. В результате дегидратации формировалась сухая плёнка (фация) со структурой, специфичной для каждого образца СК. Через 18—24 ч дегидратации проводили сравнительный анализ структуры фаций СК до и после воздействия ЭМИ с помощью стереомикроскопа MZ12 фирмы «Leica». Все образцы фаций СК фиксировались видеокамерой «EVS color VEC-335» в цифровом варианте в компьютере.

### Результаты и обсуждение

Исследование фаций СК 30 здоровых доноров показало гармоничное строение их структуры, что соответствовало физиологическому состоянию представителей контрольной группы. Структура фаций 130 пациентов основной группы имела различные патологические отклонения. На рис. 1 в качестве образцов показаны две фации СК: здорового донора с гармоничным структуропостроением и фация больного — с нарушенной симметрией расположения структурных элементов, названия которых были заимствованы из общей геологии: трещины, сектора, конкреции (округлые бесцветные образования) [13].

Сравнительный анализ структуры фаций СК до и после облучения показал, что СК больных людей давала три типа отчетливого отклика структур фаций на воздействие внешнего источника излучения (таблица). К первому типу отклика, составившему большинство случаев, отнесли нормализацию (гармонизацию) структуропостроения фации СК, ко второму — усиление дезинтеграции (при патологии) или её появление у здоровых доноров, к третьему типу отклика отнесли отсутствие структурных изменений в фациях СК после облучения.

Данные таблицы показывают частоту определённого типа отклика структур фаций СК на воздействие разных видов ЭМИ. Так, облучение образцов СК НИЛИ и ЭМИ КВЧ в большинстве случаев (около 60%) не вызывали изменений структуры фаций, а в 32,3% и 28,5% (соответственно) приводили к различной степени её нормализации. Сочетанное облучение в последовательности ЭМИ КВЧ +

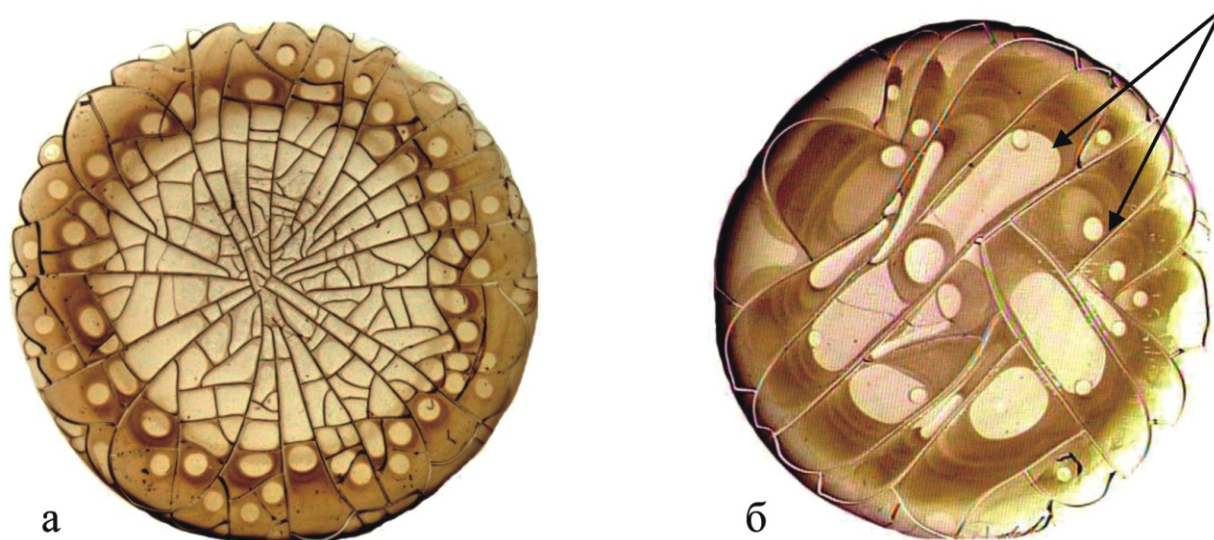


Рис. 1. Фации сыворотки крови: а – здорового человека с гармоничным структуропостроением (радиальная симметрия трещин и секторов, сформированность конкреций); б – больного с нарушенным структуропостроением (утрачена радиальность трещин и секторов, конкреции разного диаметра и формы – стрелки). Ув. 15.

НИЛИ в значительной части образцов СК (26,2%) дало усиление дезинтеграции структуры фаций и только у 16,1% выявлен нормализующий эффект. В то время как сочетанное облучение СК в последовательности НИЛИ + ЭМИ КВЧ приводило структуру 85,3% фаций СК к нормализации, а усиление дезинтеграции наблюдалось лишь в 1,5%.

Для иллюстрации данных таблицы приводим пример динамики структуры фаций СК больной Г. (рис. 2).

По сравнению с исходной фацией СК (рис. 2 а), структура фации после воздействия на СК НИЛИ имела лишь слабую тенденцию к нормализации (рис. 2 б), при воздействии ЭМИ КВЧ структура фации практически не изменялась (рис. 2 в), воздействие в последовательности ЭМИ КВЧ + НИЛИ давало сдвиг структуры фации в сторону усиления дезинтеграции (рис. 2 г), а последовательность НИЛИ + ЭМИ КВЧ вызывала отчётливую нормализацию структуры фации (рис. 2 д).

Мы предполагаем, что применённые волновые параметры НИЛИ определяют его преимущественное действие на внутримолекулярные связи, в то время как ЭМИ КВЧ, главным образом, действует на межмолекулярные взаимодействия. В результате, последовательная коррекция внутримолекулярных структур (действие НИЛИ), а затем межмолекулярных связей (ЭМИ КВЧ) даёт наиболее значимый нормализующий эффект на структуру СК.

Была также показана высокая устойчивость структуры СК здоровых доноров к воздействию испытанных нами видов ЭМИ и их сочетаний: у 90—97% представителей этой группы изменений в структуре фаций после облучения образцов СК не выявлено (таблица).

Результаты исследований показали следующее:

1) метод клиновидной дегидратации может быть использован для оценки эффектов воздействия ЭМИ на биообъекты;

Таблица

Типы отклика структур фаций сыворотки крови на воздействие разных видов ЭМИ

Пациенты	Тип отклика	Вид лучевого воздействия			
		НИЛИ, n (%)	ЭМИ КВЧ, n (%)	ЭМИ КВЧ + НИЛИ, n (%)	НИЛИ + ЭМИ КВЧ, n (%)
Больные (n = 130)	Нормализация (2)	42 ± 5 (32,3%)	37 ± 6 (28,5%)	21 ± 3,3 (16,1%)	111 ± 18,3 (85,3%)
	Усиление дезинтеграции (2)	9 ± 2 (6,9%)	16 ± 2 (12,3%)	34 ± 6,7 (26,2%)	2 ± 0,4 (1,5%)
	Отсутствие эффекта (3)	79 ± 12 (60,8%)	77 ± 13,4 (59,2%)	75 ± 14 (57,7%)	17 ± 3,1 (13,0%)
Здоровые (n = 30)	Дезинтеграция (слабо выраженная) (1)	2 ± 0,3 (6,7%)	1 ± 0,1 (3,3%)	3 ± 0,1 (10,0%)	1 ± 0,4 (3,3%)
	Отсутствие эффекта (3)	28 ± 5 (93,3%)	29 ± 4,5 (96,7%)	27 ± 3,9 (90,0%)	29 ± 6 (96,7%)

Примечание. Относительно НИЛИ + ЭМИ КВЧ: (1) –  $p < 0,05$ ; (2) –  $p < 0,01$ ; (3) –  $p < 0,001$

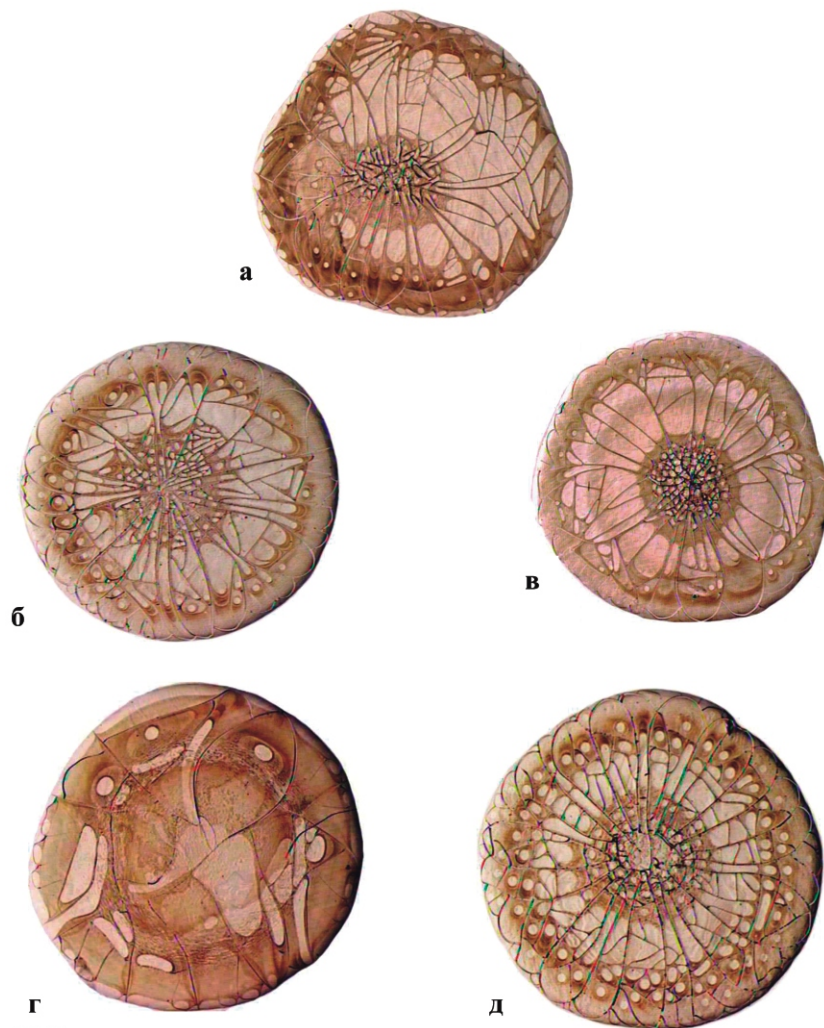


Рис. 2. Фации сыворотки крови больной Г. (65 лет) до и после воздействия на СК различными видами излучения: а — до воздействия, б — после НИЛИ, в — после ЭМИ КВЧ, г — после ЭМИ КВЧ + НИЛИ; д — после НИЛИ + ЭМИ КВЧ. Ув. 15

2) воздействие ЭМИ на СК больных влечет за собой различные изменения в структуропостроении фации, эти изменения зависят как от вида ЭМИ, так и от состояния организма;

3) патологическое состояние организма снижает устойчивость структуры СК к воздействию ЭМИ по сравнению со здоровыми людьми.

По-видимому, внешние волновые низкоинтенсивные энергетические потоки (ЭМИ КВЧ, НИЛИ) действуют на базисные (молекулярного уровня) структуры тканей пациентов с различными видами патологии и вызывают их разнонаправленные изменения: нормализацию или усиление патологических отклонений. Вместе с тем, СК значительной части больных и подавляющего числа здоровых людей остаётся нечувствительной к применённым нами видам ЭМИ.

### Заключение

Представленные данные позволяют прийти к выводу о том, что анализ морфологических структур СК, полученных с помощью метода клиновидной дегидратации, является объективным способом оценки характера действия определённых ЭМИ на биологические ткани. Предположительно, такой способ регистрации структурных изменений СК можно использовать в качестве детектора чувствительности организма к различным воздействиям ЭМИ *in vitro*, что даёт возможность подбора оптимальных программ для обеспечения терапевтического эффекта различными источниками ЭМИ.

### Литература (п.п. 2—5 см. References)

1. Чейда А.А., Каплан М.А., Ефимова Е.Г., Холодов Ю.А. Влияние низкоинтенсивного инфракрасного лазерного излучения на модели биологических систем. Иваново — Обнинск — Москва; 2002.
6. Давыдов Б.И., Зувев В.Г., Обухова С.Б. Электромагнитные поля: возможен ли канцерогенный риск? *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2003; 37 (2): 16-9.
7. Владимиров Ю.А., Осипов А.Н., Клебанов Г.И. Фотобиологические принципы применения лазерного излучения. *Биохимия*. 2004; (1): 81-103.
8. Кожура В.Л., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С. Патофизиологические механизмы лазерной коррекции при критических состояниях. *Общая реаниматология*. 2006; (2): 5-6.
9. Кравченко-Бережная Н.Р., Мороз В.В., Кожура В.Л. Коррекция лазерным излучением нарушений транспортной способности альбумина. *Анестезиология и Реаниматология*. 2002; (6): 22-5.
10. Бузоверя М.Э., Щербак Ю.П., Шилипор И.В. Экспериментальное исследование микроструктур фаций сывороточного альбумина. *Журнал технической физики*. 2012; 82 (9): 87-93.
11. Москвин С.В., Наседкин А.Н., Осин А.Я., Хан М.А. Лазерная терапия в педиатрии. Москва; 2009.
12. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. Москва; 2001.
13. Паффенгольц К. Н. (отв. ред.). Геологический словарь: М.; Недра, 1978. Т. 1: 351

### References

1. Chejda A.A., Kaplan M.A., Efimova E.G., Holodov Yu.A. Effect of low-intensity infrared laser radiation on biological system models. [*Vliyaniye nizkointensivnogo infrakrasnogo lazernogo izlucheniya na modeli biologicheskix sistem*]. Ivanovo — Obninsk — Moscow; 2002. (in Russian)

2. Gandhi O.P. Electromagnetic fields: human safety issues. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2002; 4: 2111.
3. Wang Q., Cao Z. J., Bai X.T. Effect of 900 Mhz electromagnetic fields on energy metabolism in postnatal rat cerebral cortical neurons. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2005; 34(3): 155-8.
4. D'Adrea J.A., Adair E.R., de Lorge J.O. Behavioral and cognitive effects of microwave exposure. *Bioelectromagnetics*. 2003; Suppl. 6: 39-62.
5. Jauchem J.R. The role of autacoids and the autonomic nervous system in cardio vascular responses to radio-frequency energy heating. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2006; 26: 121-40.
6. Davydov B.I., Zuev V.G., Obuhova S.B. Electromagnetic fields: is carcinogenic risk possible? *Aerospace and environmental medicine*. 2003; 37 (2): 16-9. (in Russian)
7. Vladimirov Yu.A., Osipov A.N., Klebanov G.I. Photobiological principles of laser radiation application. *Biokhimiya*. 2004; (1): 81- 103. (in Russian)
8. Kozhura V.L., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S. Pathophysiological mechanisms of laser correction in critical conditions. *Obshchaya reanimatologiya*. 2006; (2): 5-6. (in Russian)
9. Kravchenko-Berezhnaya N.R., Moroz V.V., Kozhura V.L. Correction by laser radiation, disruption of transport capacity of albumin. *Anesteziology i reanimatology*. 2002; (6): 22-5. (in Russian)
10. Buzoverya M.Eh., Shcherbak Yu.P., Shilipor I.V. Experimental study of serum albumin facies microstructures. *Journal of technical physics*. 2012; 82(9): 87-93. (in Russian)
11. Moskvina S.V., Nasedkin A.N., Osin A.YA., Han M.A. Laser therapy in Pediatrics. [*Lazernaya terapiya v pediatrii*]. Moscow; 2009. (in Russian)
12. Shabalin V.N., Shatokhina S.N. Morphology of human biological fluids. [*Morfologiya biologicheskix zhidkostey cheloveka*]. Moscow; 2001. (in Russian)
13. Paffengol'c K.N. Geological dictionary. [*Geologicheskij slovar'*]. Moscow; 1978. (in Russian)

### Сведения об авторах:

*Шабалин Владимир Владимирович*, ст. науч. сотр. отд-ния высокотехнологичных методов лечения ФГБНУ «Санкт-Петербургский НИИ уха горла носа и речи», канд. биол. наук;

*Шатохина Светлана Николаевна*, зав. лаб. биокристалломики ФГБНУ НИИОПП, доктор мед. наук, проф., e-mail: sv\_n@list.ru;

*Кубатиев Аслан Амирханович*, науч. руководитель ФГБНУ НИИОПП, доктор мед. наук, проф., акад. РАН;

*Шабалин Владимир Николаевич*, гл. науч. сотр. лаб. биокристалломики ФГБНУ НИИОПП доктор мед. наук, проф., акад. РАН.

Корсаков И.Н.<sup>1</sup>, Еремин И.И.<sup>1</sup>, Петрикина А.П.<sup>1</sup>, Чаузова Т.С.<sup>1</sup>, Гринаковская О.С.<sup>1</sup>,  
Ясиновский М.И.<sup>1,2</sup>, Устинов К.Д.<sup>1,2</sup>, Паплина О.В.<sup>3</sup>, Сетдикова Г.Р.<sup>3</sup>, Пулин А.А.<sup>1</sup>

## Сравнительный анализ терапевтической эффективности стромальных клеток, выделенных из различных источников

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

<sup>3</sup> ГКБ им. С.П. Боткина, 125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр-д, 5

Сегодня регенеративная медицина обладает значительным арсеналом методов клеточной терапии для лечения различных заболеваний. В многочисленных доклинических и клинических исследованиях продемонстрированы безопасность и эффективность различных клеточных продуктов. Однако выбор источника биологического материала для получения клеточного продукта остается одним из самых актуальных вопросов. **Цель работы:** сравнение терапевтической эффективности клеточных продуктов, содержащих мультипотентные мезенхимальные клетки (ММСК), выделенные из различных источников, на модели экспериментального термического ожога кожи. **Методика.** Моделирование ожога выполняли под общей анестезией путем помещения на кожу металлического цилиндра, предварительно нагретого в кипящей воде. ММСК получали по стандартной методике ферментативной диссоциации предварительно иссеченных образцов альвеолярной десны, жировой ткани и плаценты. ММСК костного мозга были получены из большеберцовых и бедренных костей. Все ММСК были охарактеризованы по экспрессии поверхностных маркеров. **Результаты.** Полученные результаты свидетельствуют о значительных отличиях в пролиферативном потенциале ММСК, выделенных из различных источников, в то время как терапевтическая эффективность для большинства клеточных продуктов сопоставима, независимо от выбранных доз клеток. Статистически значимые отличия в терапевтической эффективности были получены для ММСК, выделенных из плаценты. У всех экспериментальных животных, получивших терапию плацентарными ММСК, время полной эпителизации ожоговой раны было значительно меньше чем в других группах. В то же время клеточные продукты, содержащие ММСК из костного мозга, жира и десны показали сравнимую между собой терапевтическую эффективность и также приводили к ускорению времени заживления по сравнению с контролем. **Заключение.** Таким образом, показано, что ММСК, выделенные из плаценты, обладают большей терапевтической эффективностью по сравнению с ММСК из других источников. Пролиферативный потенциал — параметр, отражающий время, необходимое для получения терапевтической дозы клеток, также отличается в зависимости от источника ММСК. Наиболее перспективными с этой точки зрения являются ММСК десны. Исходя из вышеизложенного, ММСК, получаемые из плаценты и десны, являются наиболее перспективным типом клеток для создания клеточных продуктов.

**Ключевые слова:** клеточная терапия, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), регенеративная медицина.

**Для цитирования:** Корсаков И.Н., Еремин И.И., Петрикина А.П., Чаузова Т.С., Гринаковская О.С., Ясиновский М.И., Устинов К.Д., Паплина О.В., Сетдикова Г.Р., Пулин А.А. Сравнительный анализ терапевтической эффективности стромальных клеток, выделенных из различных источников. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 104—110.

DOI:

**Для корреспонденции:** Пулин Андрей Алексеевич, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития, e-mail: andreyulin@gmail.com

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-75-30066).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.11.2018

Korsakov I.N.<sup>1</sup>, Eremin I.I.<sup>1</sup>, Petrikina A.P.<sup>1</sup>, Chauzova T.S.<sup>1</sup>, Grinakovskaya O.S.<sup>1</sup>,  
Yasinovskiy M.I.<sup>1,2</sup>, Ustinov K.D.<sup>1,2</sup>, Paklina O.V.<sup>3</sup>, Setdikova G.R.<sup>3</sup>, Pulin A.A.<sup>1</sup>

## Comparative analysis of therapeutic efficacy of stromal cells derived from different sources

<sup>1</sup> FSBSI «Institute of general pathology and pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russian Federation, 125315

<sup>2</sup> Sechenov University, 8-2, Trubetskaya st., Moscow, Russian Federation, 119991

<sup>3</sup> S.P. Botkin State Clinical Hospital, 5, 2-nd Botkinsky passage, Moscow, Russian Federation, 125284



Today, regenerative medicine has a significant arsenal of methods of cell therapy for the treatment of various diseases. Numerous preclinical and clinical studies have demonstrated the safety and efficacy of various cell-based products. However, the choice of the source of biological material for obtaining a cell-based product remains one of the most important issue. **The purpose** of this work was to compare the therapeutic efficacy of cell-based products containing multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs), isolated from various sources, on the model of an experimental thermal burn of the skin. **Methods.** Burn modeling was performed under general anesthesia by placing a metal cylinder pre-heated in boiling water on the skin. MMSCs were obtained according to the standard method of enzymatic digestion of pre-excised samples of alveolar gingiva, adipose tissue and placenta. Bone marrow MMSCs were obtained from tibial and femoral bones. All MMSCs were characterized by the expression of surface markers. **Results.** The results indicate significant differences in the proliferative potential of MMSCs isolated from different sources, while the therapeutic efficacy for most cellular products is comparable, regardless of the selected cell doses. Statistically significant differences in therapeutic efficacy were obtained for MMSCs isolated from the placenta. In all experimental animals that received therapy with placental MMSCs, the time of complete epithelialization of the burn wound was significantly lower than in other groups. At the same time, cell-based products containing MMSC from the bone marrow, fat and gingiva showed comparable therapeutic efficacy and also led to an acceleration of the healing time compared to the control. **Conclusion.** Thus, it has been shown that MMSC isolated from the placenta has a greater therapeutic efficacy compared with MMSC from other sources. Proliferative potential — a parameter reflecting the time required to obtain a therapeutic dose of cells, also differs depending on the source of MMSC. The most promising from this point of view are gingiva derived MMSC. Based on the foregoing, MMSCs derived from the placenta and gingiva are the most promising cell types for creating cell-based products.

**Keywords:** regenerative medicine, multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs), cell therapy, regenerative medicine.

**For citation:** Korsakov I.N., Eremin I.I., Petrikina A.P., Chauzova T.S., Grinakovskaya O.S., Yasinovskiy M.I., Ustinov K.D., Paklina O.V., Setdikova G.R., Pulin A.A. Comparative analysis of therapeutic efficacy of stromal cells derived from different sources. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 104—110. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Andrey A. Pulin, MD, PhD, Leading Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: andrey\_pulin@gmail.com

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

**Funding:** The study was funded by Russian Science Foundation (project # 17-75-30066).

**Information about authors:**

Eremin I.I., <https://orcid.org/0000-0002-4336-8986>

Yasinovskiy M.I., <https://orcid.org/0000-0002-3122-8054>

Ustinov K.D., <https://orcid.org/0000-0002-1780-8343>

Paklina O.V., <https://orcid.org/0000-0001-6373-1888>

Setdikova G.R., <https://orcid.org/0000-0002-5262-4953>

Pulin A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9499-4979>

**Received** 08.11.2018

## Введение

Наиболее часто используемым инструментом регенеративной медицины являются клеточные технологии — медицинское применение различных видов клеток (клеточных продуктов) для лечения, профилактики и диагностики ряда заболеваний. Наиболее хорошо изученным и самым распространенным типом клеток в составе терапевтических клеточных продуктов являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК). Эти клетки располагаются преимущественно в периваскулярных нишах и могут быть выделены практически из любой ткани. ММСК представляют собой тип взрослых клеток, способных к дифференцировке в различных направлениях, включая адипо-, остео-, хондро-, нейро-, ми-

огенное и другие [1, 2]. Терапевтический эффект ММСК реализуется за счет паракринной регуляции и прямого воздействия на окружающие клетки [3, 4]. ММСК секретируют большое число цитокинов, хемокинов и молекул адгезии, которые регулируют различные молекулярные сигнальные пути за счет их активации и/или блокирования [1]. В частности, за счет паракринных сигналов ММСК усиливают выживание и пролиферацию эндогенных клеток, ингибируют апоптоз, активируют дифференцировку резидентных прогениторных клеток, что, в конечном итоге, приводит к улучшению функции поврежденной ткани [5—7]. Установлено, что ММСК способны влиять на воспалительные процессы и стимулировать ангиогенез [1, 3, 8]. Большое количество цитокинов, продуцируемых ММСК, блокируют провоспалительные

сигналы при различных заболеваниях, включая аутоиммунные процессы [9, 10]. Также ММСК являются иммуноприлегирированным типом клеток, практически не экспрессирующим на своей поверхности молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса, что позволяет использовать для их получения донорский материал и значительно расширяет перспективы их клинического применения [11].

Следует отметить простоту выделения ММСК из различных доступных источников в организме человека, включающих в себя костный мозг, жировую ткань, слизистую оболочку полости рта, пупочный канатик, сердце, мышцы и другие [12—17]. Известно, что свойства данного типа клеток практически одинаковы независимо от источника получения [1]. Основными и наиболее изученными источниками ММСК у взрослого человека являются костный мозг, жировая ткань, слизистая оболочка полости рта (десна), плацента. При этом, каждый из источников обладает своими преимуществами и недостатками. Сравнительные исследования эффективности применения ММСК, выделенных из различных источников, на одной модели в сопоставимых условиях практически отсутствуют.

*Цель исследования* — сравнительный анализ терапевтической эффективности клеточных продуктов, содержащих ММСК, выделенные из костного мозга (ММСК<sub>км</sub>), жировой ткани (ММСК<sub>жт</sub>), альвеолярной десны (ММСК<sub>д</sub>) и плаценты (ММСК<sub>пл</sub>) крысы, в условиях одной экспериментальной модели.

## Методика

*Дизайн исследования.* Исследование проводилось на крысах-самцах Wistar, массой тела 200—250 г при соблюдении правил гуманного обращения с лабораторными животными. Эксперименты на животных были одобрены локальным этическим комитетом института. Все хирургические манипуляции выполнялись под общим обезболиванием, анестезия обеспечивалась внутримышечным введением препарата «Золетил 100» и 2% раствора ксилазина гидрохлорида. В качестве модельного патологического процесса был использован экспериментальный термический ожог кожи. Под общей анестезией после выстригания шерсти, депиляции кожи на спине и обработки операционного поля на кожу помещали металлический цилиндр диаметром 23 мм массой 100 г, предварительно нагретый в кипящей воде в течение 1 мин. Контакт цилиндра с кожей обеспечивался только массой цилиндра, время экспозиции составляло 20 с.

Животные были разделены на 9 групп по 12 крыс в каждой. Всем животным в 8 экспериментальных группах на 3-и сут. после моделирования ожога одно-

кратно вводили аллогенные ММСК<sub>км</sub>, ММСК<sub>жт</sub>, ММСК<sub>пл</sub>, ММСК<sub>д</sub> в двух дозах  $1 \times 10^6$  клеток (ММСК<sub>км</sub> 1, ММСК<sub>жт</sub> 1, ММСК<sub>пл</sub> 1, ММСК<sub>д</sub> 1) и  $10 \times 10^6$  клеток (ММСК<sub>км</sub> 10, ММСК<sub>жт</sub> 10, ММСК<sub>пл</sub> 10, ММСК<sub>д</sub> 10). Клеточные продукты вводили в 600 мкл физиологического раствора и вводили подкожно через 8 проколов в 24 точки равными порциями. В контрольной группе вводили аналогичный объем физиологического раствора. Визуальную оценку области повреждения проводили на 7-е и 14-е сут. после введения клеточных продуктов, а начиная с 14-х сут. область ожога оценивали ежедневно. Основным критерием эффективности являлось время до полной эпителизации раны (в сутках).

*Забор биоматериалов, выделение и культивирование ММСК.* Предварительно перед экспериментом 10 крысам выполнили биопсию альвеолярной десны, иссечение жировой ткани через разрез в паховой области, а также выделили и иссекли большеберцовые и бедренные кости. Дополнительно 10 самкам на 16—18-х сут. беременности выполнили забор плаценты. Биоптаты помещали в стерильные пробирки (BD Falcon, США) с транспортировочной питательной средой:  $\alpha$ -МЕМ (Sigma, США), 2% FBS (HyClone, США), 200 ед./мл пенициллина, 200 мг/мл стрептомицина, 200 ед./мл амфотерицина (Stem Cell Technologies, США), маркировали и доставляли в течение 2 ч при температуре  $+4^\circ\text{C}$  в лабораторию. В условиях ламинарного шкафа биоптаты альвеолярной десны, жировой ткани и плаценты промывали в питательной среде DMEM (Gibco, США), дополненной антибиотиком (гентамицин, 50 мкг/мл, Sigma, США). Фрагменты переносили в пробирку объемом 15 мл, добавляли 10 мл 0,15%-ного раствора коллагеназы II типа (Sigma, США) и инкубировали, периодически встряхивая, в течение 2 ч при  $t = 37^\circ\text{C}$ . Полученную суспензию клеток пипетировали с последующим центрифугированием при 200g в течение 10 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в питательной среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей гентамицин 20 мкг/мл, 20% FBS (BioInd, Израиль), и высевали с плотностью  $3\text{—}5 \times 10^4$  клеток/ $\text{cm}^2$  в культуральные флаконы (Corning, США) площадью  $12,5 \text{ cm}^2$ . Для получения ММСК<sub>км</sub> бедренные и большеберцовые кости очищали от мышц, аккуратно удаляли эпифизы, промывали в растворе фосфатно-солевого буфера с антибиотиком (гентамицин, 50 мкг/мл). После этого раствором фосфатно-солевого буфера при помощи шприца вымывали костный мозг в стерильные пробирки до полного удаления клеток из канала. Полученные суспензии клеток костного мозга центрифугировали в течение 5 мин при 500 g, а затем высевали в питательной среде в культуральные флаконы, которые помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор на

Экспрессия поверхностных маркеров ММСК, выделенных из различных источников.  
Указана пропорция клеток (в % от общего числа), экспрессирующих маркер

Поверхностные маркеры	ММСК <sub>км</sub>	ММСК <sub>жт</sub>	ММСК <sub>д</sub>	ММСК <sub>пл</sub>
CD34	2 [1-4]	2 [2-3]	2 [2-5]	1 [1-2]
CD45	4 [2-7]	2 [1-4]	3 [1-6]	4 [2-5]
CD73	97 [94-98]	98 [94-99]	94 [92-97]	95 [93-97]
CD90	94 [89-98]	93 [89-98]	94 [91-95]	97 [95-99]
CD105	90 [87-94]	92 [89-96]	85 [73-97]	94 [92-98]

1 сут. После этого флаконы отмывали от неприкрепившихся клеток и производили замену питательной среды на свежую. Культивирование проводили при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, смену среды проводили каждые 3-и—4-е сут., клетки пассировали при достижении 70—80% конфлюэнтности. Визуальный контроль роста и оценку морфологии культуры проводили с помощью фазово-контрастной микроскопии. Для исследований *in vitro* использовали клеточные культуры с 1-го по 3-й пассажи, животным вводили ММСК 2-го пассажа.

**Определение времени удвоения клеточных культур.** ММСК рассеивали в культуральные флаконы с плотностью  $1 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> и культивировали до формирования 90%-ного монослоя. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Время удвоения популяции ( $T_{1/2\rho}$ ) на 1-м, 2-м и 3-м пассажах оценивали по формуле:

$$T_{1/2\rho} = T_k \cdot \ln(2) / \ln(N_k / N_0),$$

где  $T_{1/2\rho}$  — время удвоения клеточной популяции на пассаже  $\rho$ ;  $T_k$  — длительность культивирования пассажа в часах;  $N_0$  — исходное количество клеток;  $N_k$  — число клеток через  $T_k$ . В качестве оценочного параметра использовали среднее арифметическое от полученных на 3 пассажах значение —  $T_{1/2}$ :

$$T_{1/2} = \frac{1}{3} \sum_{\rho=1}^3 T_{1/2\rho}$$

**Имунофенотипический анализ ММСК.** Для цитофлуориметрического анализа суспензию клеток фиксировали 1% раствором параформальдегида на фосфатно-солевом буфере (рН = 7,4). Окраску проводили антителами к CD34PE (United States Biological, США), CD45FITC (BD Biosciences, США), CD73-Alexa488 (Bioss Inc., США), CD90APC (BD Biosciences, США), CD105PE (Bioss Inc., США), в соответствии с рекомендациями производителей. Интенсивность флуоресценции оценивали на цитофлуориметре FACS Canto™ II (BD, США) с программным обеспечением «FACSDiva™» (BD, США).

**Статистический анализ.** Все эксперименты *in vitro* проводили в 3 повторах для каждой из культур

ММСК. Статистическая значимость различий между группами определялась при помощи U-критерия Манна — Уитни для независимых групп при статистической значимости различий  $p < 0,05$ . Данные приведены в виде «медиана» (25 и 75 перцентили). Использовалось программное обеспечение GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

## Результаты и обсуждение

**Характеристика морфологии и иммунофенотипа.** Все исследованные *in vitro* культуры ММСК<sub>км</sub>, ММСК<sub>жт</sub>, ММСК<sub>д</sub>, ММСК<sub>пл</sub>, на всех пассажах имели сходную фибробластоподобную морфологию.

Все клетки, независимо от источника, обладали сходным профилем экспрессии поверхностных маркеров: наличием CD73, CD90, CD105 и отсутствием CD34 и CD45 без статистически значимых отличий (таблица), что соответствует критериям принадлежности исследованных культур к ММСК [18].

**Оценка пролиферативной активности.** При культивировании в одинаковых условиях самым низким пролиферативным потенциалом обладали культуры ММСК, полученные из костного мозга и жировой ткани, пролиферативный потенциал ММСК, выделенных из плаценты и десны, был существенно выше ( $p < 0,05$ ). При этом время удвоения популяции ММСК<sub>д</sub> было

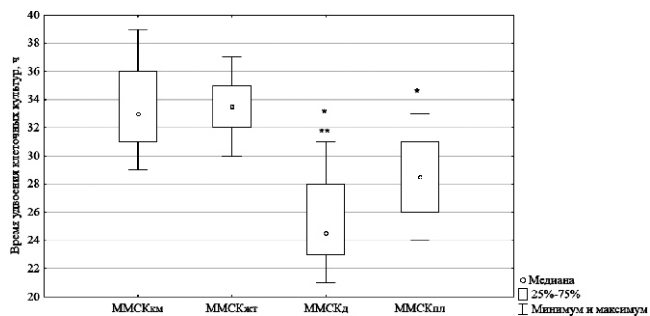


Рис. 1. Время удвоения популяции клеточных культур ММСК, выделенных из разных источников. \* — различия значимы по сравнению с группами ММСК<sub>км</sub> и ММСК<sub>жт</sub> ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна—Уитни для независимых групп), \*\* различия значимы по сравнению с группой ММСК<sub>пл</sub> ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна—Уитни для независимых групп).

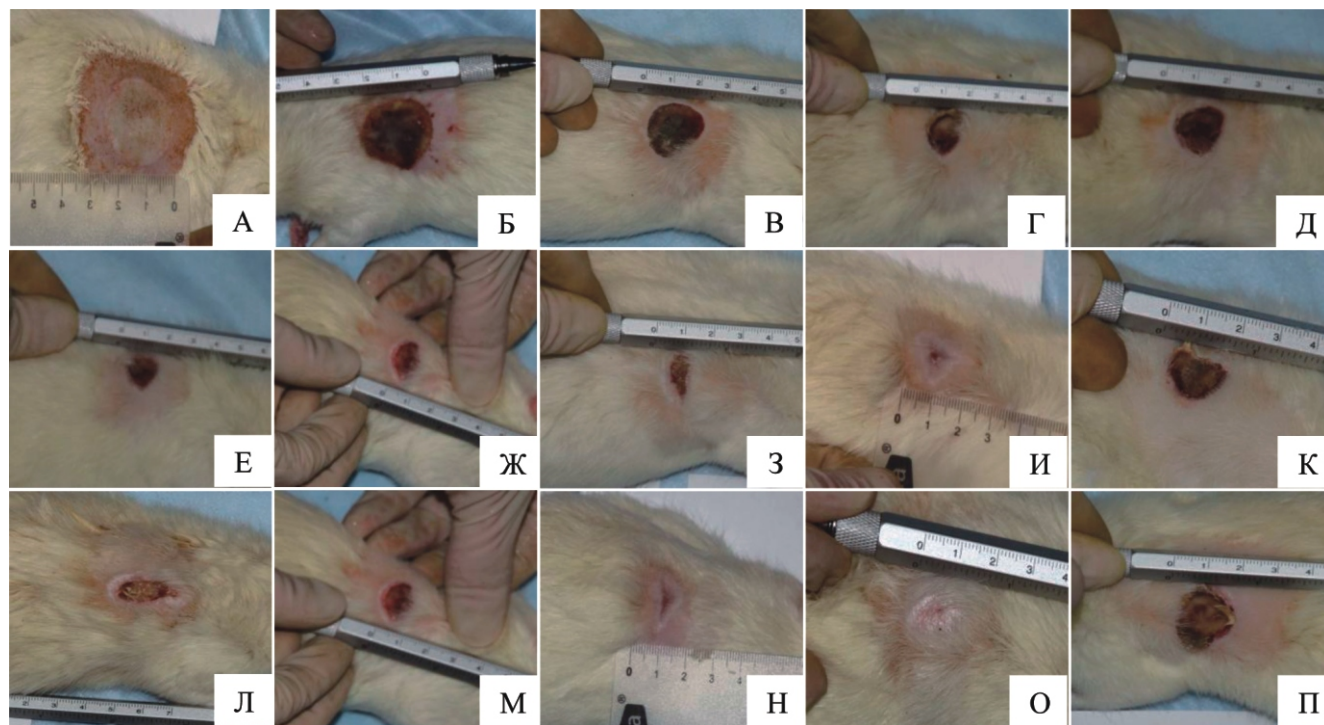
значимо ниже, чем у культуры ММСКпл ( $p < 0,05$ , рис. 1). По-видимому, высокая пролиферативная активность ММСКд и ММСКпл объясняется физиологическими особенностями источников клеток.

**Оценка терапевтической эффективности.** Сразу после ожога у животных в области воздействия наблюдали развитие отека (ожог 3Б) и зоны перифокальной вазодилатации. Через 24 ч отчетливо визуализировали область некроза кожи, окруженную зоной демаркационного воспаления. Сохранялись явления отека. На 3-и сут. (на момент введения клеток) отек уменьшался, некротически измененная кожа уплотнялась, зона демаркации была ярко выражена.

Через 7 сут. после введения клеточных продуктов во всех экспериментальных группах макроскопически в области воздействия наблюдали струп, который по сравнению с контрольной группой был более эластичен. Перифокально визуализировалась широкая зона демаркации, по краям наблюдали начальные признаки эпителизации. В контрольной группе наблюдали плотный струп, зона демаркации бледнела. К 14-м сут. у животных, получивших клеточные продукты, струп становился тоньше, а его периферические части за счет краевой эпителизации отделялись от постдеструктивной поверхности, зона демаркации не визуализирова-

лась. У части животных наблюдали отторжение струпа. Область эпителизации была выражена в большей степени, чем в контроле. Начиная с 14-х сут. наблюдения постдеструктивная поверхность существенно отличалась от таковой в контроле — наблюдалась рубцовая ткань, а периферическая область повреждения была замещена регенератом, сходным по строению с окружающей кожей. К концу 3-й нед наблюдения у некоторых животных, получивших клеточные продукты, наблюдали полную эпителизацию раны и частичное или полное восстановление волосяного покрова. В контрольной группе к 30-м сут. после манипуляции центральная область ожога не была эпителизирована, оставалась по-прежнему покрытой струпом, по периферии большая область была замещена рубцом, на котором наблюдалось частичное восстановление волосяного покрова (рис. 2, 3).

При сравнении скорости эпителизации обнаружено, что все экспериментальные группы статистически значимо отличались от контрольной ( $p < 0,05$ ), в которой полная эпителизация впервые была зарегистрирована на 35-е сут. наблюдения (рис. 3). Между группами с различными клеточными продуктами наиболее быстро полная эпителизация раны отмечена у животных, получивших инъекцию ММСКпл и



**Рис. 2.** Состояние раны в группах животных на различные сроки наблюдения. А — через 1 ч после ожога; Б — через 1 ч после введения клеточного продукта (3-и сут. после ожога); В — 7-е сут., репрезентативная фотография животного из экспериментальной группы; Г — 14-е сут., репрезентативная фотография животного из экспериментальной группы; Д — 14-е сут., контроль; Е — 21-е сут., ММСКкм 1; Ж — 21-е сут., ММСКжт 1; З — 21-е сут., ММСКд 1; И — 21-е сут., ММСКпл 1; К — 21-е сут., контроль; Л — 21-е сут., ММСКкм 10; М — 21-е сут., ММСКжт 10; Н — 21-е сут., ММСКд 10; О — 21-е сут., ММСКпл 10; П — 30-е сут., контроль.

ММСК<sub>д</sub> ( $p < 0,05$ ). При этом скорость эпителизации в группе ММСК<sub>пл</sub> была достоверно выше, чем у ММСК<sub>д</sub> ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что дозировка ММСК статистически значимо не влияла на скорость эпителизации. Вероятно, доза  $1 \times 10^6$  клеток является достаточной для активации процессов регенерации в выбранной модели патологического процесса. Таким образом, наибольшая терапевтическая эффективность была выявлена в группах, получивших инъекции ММСК<sub>пл</sub>.

### Заключение

Полученные результаты подтверждают, что ММСК, выделенные из перинатального источника (плаценты), обладают рядом преимуществ. Нами впервые показано, что эти клетки наряду со сравнительно высоким пролиферативным потенциалом обладают большей терапевтической активностью при прочих равных условиях по сравнению со всеми другими видами ММСК. При этом получение плаценты, в отличие от других источников ММСК, не сопряжено с этическими вопросами, а также исключает возможные риски, связанные с инвазивными процедурами биопсии. Кроме того, объем биоматериала при заборе костного мозга, жировой ткани или десны ограничен. В то время как из одной плаценты можно получить до нескольких сотен доз стандартизованного клеточного продукта. Пролиферативный потенциал — параметр, отражающий время, необходимое для получения терапевтической дозы клеток, также отличается в зависимости от источника ММСК. Наиболее перспективными с этой точки зрения являются ММСК<sub>д</sub>. Исходя из вышеизложенного, ММСК<sub>пл</sub> и ММСК<sub>д</sub> являются наиболее перспективными типами клеток для создания клеточных продуктов.

### Литература

(п.п. 1, 2, 5—18 см. References)

3. Котенко К.В., Мороз Б.Б., Надежина Н.М. с соавт. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при лечении лучевых поражений кожи. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2011; 1: 2-7.
4. Еремин И.И., Зорин В.Л., Поляков А.В. с соавт. Клеточные технологии в терапии ожогов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2011; 4: 74-80.

### References

1. Pandey A.C., Semon J.A., Kaushal D. et al. MicroRNA profiling reveals age-dependent differential expression of nuclear factor  $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinase in adipose and bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2011; 2(6): 49.
2. Prockop D.J. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Molecular Therapy*. 2009; 17(6): 939-46.

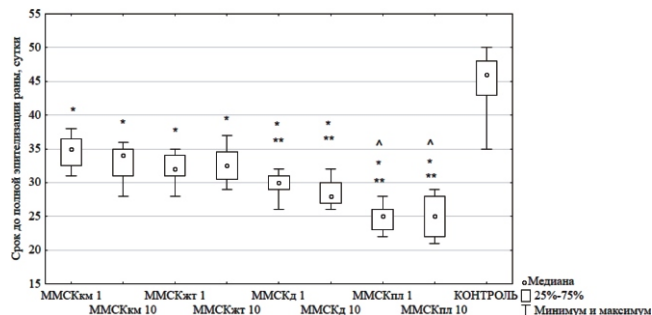


Рис. 3. Влияние подкожного введения ММСК, выделенных из разных источников, на скорость эпителизации ожоговой раны. \* — различия значимы по сравнению с контролем, \*\* — различия значимы по сравнению с группами ММСК<sub>кжт</sub> и ММСК<sub>кпл</sub>, ^ — различия значимы по сравнению с группой ММСК<sub>д</sub> ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни для независимых групп).

3. Kotenko K.V., Moroz B.B., Nadezina N.M. Mesenchymal stem cells transplantation in the treatment of radiation skin lesions. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2011; 1: 2-7. (In Russian).

4. Eremyn I.I., Zorin V.L., Polyakov A.V. et al. Stem cells technologies in the treatment of burns. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2011; 4: 74-80. (In Russian).

5. Biehl J.K., Russell B. Introduction to stem cell therapy. *The Journal of Cardiovascular Nursing*. 2009; 24(2): 98-103.

6. Prockop D.J. «Stemness» does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2007; 82(3): 241-3.

7. Shyu K.G., Wang B.W., Hung H.F. et al. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. *Journal of Biomedical Science*. 2006; 13(1): 47-58.

8. Da Silva J.S., Hare J.M. Cell-based therapies for myocardial repair: emerging role for bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) in the treatment of the chronically injured heart. *Methods in Molecular Biology*. 2013; 1037: 145-63.

9. Bujak M., Frangogiannis N.G. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)*. 2009; 57(3): 165-76.

10. Van Tassel B.W., Arena R.A., Toldo S. et al. Enhanced interleukin-1 activity contributes to exercise intolerance in patients with systolic heart failure. *PLoS One*. 2012; 7(3): e33438.

11. De Miguel M.P., Fuentes-Julian S., Blazquez-Martinez A. et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Current Molecular Medicine*. 2012; 12(5): 574-91.

12. De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and Rheumatism*. 2001; 44(8): 1928-42.

13. Erices A., Conget P., Minguell J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*. 2000; 109(1): 235-42.

14. Hoogduijn M.J., Crop M.J., Peeters A.M. et al. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells and Development*. 2007; 16(4): 597-604.

15. 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; 102(4): 1548-9.

16. Zorin V.L., Pulin A.A., Eremin I.I., et al. Myogenic potential of human alveolar mucosa derived cells. *Cell Cycle*. 2017; 16(6): 545-55.

17. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2002; 13(12): 4279-95.

18. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.

### Сведения об авторах:

*Корсаков Иван Николаевич*, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

*Еремин Илья Игоревич*, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

*Петрикина Анастасия Петровна*, науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

*Чаузова Татьяна Сергеевна*, науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

*Гринаковская Ольга Сергеевна*, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

*Ясиновский Матвей Ильич*, лаборант, лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; студент медико-профилактического факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

*Устинов Кирилл Дмитриевич*, лаборант, лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; студент медико-профилактического факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

*Паклина Оксана Владимировна*, доктор мед. наук, заведующий отделением-врач-патологоанатом, патологоанатомическое отделение ГКБ им. С.П. Боткина

*Сетдикова Галия Равилевна*, канд. мед. наук врач-патологоанатом, патологоанатомическое отделение ГКБ им. С.П. Боткина

*Пуллин Андрей Алексеевич*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Сабурина И.Н.<sup>1,2</sup>, Кошелева Н.В.<sup>1,2,3</sup>, Зурина И.М.<sup>1,2,4</sup>, Горкун А.А.<sup>1,2,4</sup>,  
Пулин А.А.<sup>1,2,5</sup>, Еремин И.И.<sup>1,5</sup>, Зорин В.Л.<sup>1,6</sup>, Копнин П.Б.<sup>1,7</sup>

## Динамика изменения миогенного потенциала стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки рта в 2D и 3D культуре

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, Балтийская ул., д. 8

<sup>2</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 123995, г. Москва, Россия, Баррикадная ул., д. 2/1, стр. 1

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

<sup>4</sup> Институт регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первого МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

<sup>5</sup> АО «ГЕНЕРИУМ», 123112, г. Москва, Россия, ул. Тестовская, д. 10, подъезд 2

<sup>6</sup> ПАО Институт стволовых клеток человека, 119333, г. Москва, Россия, ул. Губкина, д. 3, стр. 2

<sup>7</sup> ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 23

Одной из ключевых проблем клеточной заместительной терапии дисфункций опорно-двигательного аппарата и миодистрофий остается доступность аутологичных источников клеточного материала, способного дифференцироваться в миогенном направлении. Уникальное онтогенетическое происхождение и способность к репарации без фиброобразования большинства ран ротовой полости делает клетки альвеолярной слизистой оболочки рта одним из перспективных источников аутологичного клеточного материала. Цель исследования — сравнение миогенного потенциала стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки рта в 2D и 3D условиях культивирования. При стандартном монослойном 2D культивировании в дифференцировочной среде — DMEM low glucose + 2% Horse Serum и спонтанно в 40% культур стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта на 3-м — 4-м пассаже происходила миогенная дифференцировка, формировались многоядерные миотубы, наблюдался синтез одного из ключевых регуляторов дифференцировки прогениторных клеток в миотубы и маркера начальных стадий миогенеза — MyoD. В условиях 3D культивирования из стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта формировались компактные сфероиды. Через 7 сут. в сфероидах отмечалась спонтанная дифференцировка клеток в миогенном направлении с формированием уже не единичных миотуб, а более дифференцированных структур с характерным расположением ядер по периферии и поперечной исчерченностью, выявляемой в реакции с антителами к белку саркомеров  $\alpha$ -актину. Таким образом, при культивировании в 3D условиях стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта показана возможность эффективной спонтанной миогенной дифференцировки со слиянием мышечных трубочек, что характерно для организованной мышечной ткани.

**Ключевые слова:** слизистая оболочка рта, 2D культура, 3D культура, клеточные сфероиды, стромальные клетки, миогенез, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки.

**Для цитирования:** Сабурина И.Н., Кошелева Н.В., Зурина И.М., Горкун А.А., Пулин А.А., Еремин И.И., Зорин В.Л., Копнин П.Б. Динамика изменения миогенного потенциала стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки рта в 2D и 3D культуре. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 111—119.

**DOI:**

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-30066).

**Благодарность.** Часть работ с применением методов конфокальной микроскопии была выполнена на базе биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (комплект оборудования для ткане-инженерных технологий, визуализации и микрохирургии; ID: 9351669).

**Для корреспонденции:** Сабурина Ирина Николаевна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития; e-mail: saburinain@gmail.com

**Поступила** 05.12.2017

Saburina I.N.<sup>1,2</sup>, Kosheleva N.V.<sup>1,2,3</sup>, Zurina I.M.<sup>1,2,4</sup>, Gorkun A.A.<sup>1,2,4</sup>,  
Pulin A.A.<sup>1,2,5</sup>, Eremin I.I.<sup>1,5</sup>, Zorin V.L.<sup>1,6</sup>, Kopnin P.B.<sup>1,7</sup>

## The dynamics of changes in myogenic potential of stromal cells from alveolar oral mucosa in 2D and 3D culture

<sup>1</sup> FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, Batiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> FSBSI Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russian Federation

<sup>3</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1, Bldg. 12, Moscow 119234, Russian Federation

<sup>4</sup> Institute for Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bldg 2, Moscow 119991, Russian Federation

<sup>5</sup> JSC Generium, Testovskaya Str. 10, Moscow 123112, Russian Federation

<sup>6</sup> PJSC Institute of Human Stem Cells, Gubkina Str. 3, Bldg 2, Moscow 119333, Russian Federation

<sup>7</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, Kashirskoe Shosse 23, Moscow 115478, Russian Federation

The availability of autologous cell sources that would be able to differentiate towards the myogenic direction still remains one of the key issues of substitutive cell therapy for musculoskeletal system dysfunctions and muscular dystrophies. Cells obtained from alveolar oral mucosa are one of the most promising autologous cell sources due to their ontogenetic origin and the ability to repair most injuries of the oral cavity without scar formation. The aim of the present research was to compare the myogenic potential of alveolar oral mucosa stromal cells in 2D and 3D cell culture. Under the standard conditions of monolayer 2D culture, myogenic differentiation occurred in a differentiation medium (DMEM low glucose + 2% Horse serum) and spontaneously in 40% of cultures in a growth medium; we observed the formation of myotubes as well as the expression of MyoD, a key regulator of initial myogenesis and differentiation of myogenic progenitor cells. In a 3D culture, stromal cells from alveolar oral mucosa formed compact spheroid structures. In 7 days, we observed spontaneous differentiation of cells in spheroids towards the myogenic direction and emergence of not single myotubes but more differentiated structures — myofibrils with characteristic nuclei arrangement and cross-striation determined by staining with sarcomeric  $\alpha$ -actinin antibodies. Therefore, we showed that the 3D culture conditions stimulated effective, spontaneous myogenic differentiation of stromal cells from alveolar oral mucosa with the formation of myofibrils, which is characteristic of well-organized muscular tissue.

**Keywords:** oral mucosa, 2D culture, 3D culture, cell spheroids, stromal cells, myogenesis, multipotent mesenchymal stromal cells.

**For citation:** Saburina I.N., Kosheleva N.V., Zurina I.M., Gorkun A.A., Pulin A.A., Eremin I.I., Zorin V.L., Kopnin P.B. The dynamics in changes of myogenic potential of stromal cells from alveolar oral mucosa in 2D and 3D culture. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 111—119. (in Russian).  
**DOI:**

**For correspondence:** Irina N. Saburina, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher Fellow Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russian Federation, e-mail: saburinain@gmail.com

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

**Funding.** The study was financially supported by Russian Science Foundation (grant № 17-75-30066).

**Acknowledgments.** Part of the work using the methods of confocal microscopy was performed at the Faculty of Biology of the Lomonosov Moscow State University (Equipment complex for tissue-engineering technologies, visualization, and microsurgery; ID: 9351669).

### Information about authors:

Saburina I.N., <http://orcid.org/0000-0003-2014-2535>

Kosheleva N.V., <http://orcid.org/0000-0002-2665-4972>

Zurina I.M., <http://orcid.org/0000-0002-3275-0215>

Gorkun A.A., <http://orcid.org/0000-0001-5859-812X>

Pulin A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9499-4979>

Eremin I.I., <https://orcid.org/0000-0002-4336-8986>

Kopnin P.B., <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>

Received 05.12.2017



## Введение

Тканевая инженерия скелетных мышц является одним из новых перспективных методов восстановления дефектов мышечной ткани, возникших в результате травмы, обширных оперативных вмешательств или патологических заболеваний, приводящих к потере мышечной массы. Поскольку тканевая инженерия основана на использовании клеточных технологий в сочетании с современными биоматериалами, важным этапом разработки любого биоэквивалента является подбор оптимального аутологичного источника клеток.

На сегодняшний день во всех областях медицины, в том числе и в стоматологии, стволовые и прогениторные клетки, в особенности мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) из различных источников, представляют потенциальный интерес как для фундаментальных исследований, так и для клинического применения в регенеративной медицине, что открывает новые возможности восстановления поврежденных органов и тканей или регуляции их функциональной активности. ММСК выделяют из большого количества тканей и органов (костный мозг, подкожная жировая ткань, плацента, Вартонов студень пупочного канатика и др.), они обладают способностью дифференцироваться в производные мезодермы — клетки жировой, костной и хрящевой тканей, а также в миогенном направлении [1]. Стромальные клетки, выделенные из ротовой полости обладают ещё большим дифференцировочным потенциалом, поскольку в формировании ротовой полости принимают участие онтогенетически различные закладки — эктодерма, головная мезенхима и клетки нервного гребня [2]. ММСК и производные нервного гребня выделяют из пульпы зуба, периодонтальной связки зуба, собственной пластинки слизистой ротовой полости [3] и десны [4]. Интерес к этим клеткам связан как с широким дифференцировочным потенциалом производных нервного гребня, так и с тем, что заживление большинства ран ротовой полости происходит без образования рубцов [5]. Кроме того, биоптаты слизистой оболочки ротовой полости и десны легко получить неинвазивным методом под местной анестезией.

Ранее мы показали, что существуют различия в миогенном потенциале стромальных клеток, выделенных из различных анатомических областей десны — стромальные клетки альвеолярной слизистой, в отличие от стромальных клеток слизистой оболочки прикрепленной десны, способны дифференцироваться в миогенном направлении при культивировании в дифференцировочной среде, содержащей 2% лошадиной сыворотки [6]. Также, известно, что при культивировании в 3D условиях миогенная дифференцировка клеток проходит быстрее и эффективнее [7]. Соматические клетки при помещении в неадгезивные

условия с течением времени, за счет тенденции клеток к самоорганизации, формируют трехмерные многоклеточные структуры — сфероиды [8], которые по своему строению за счет формирования межклеточных контактов и вновь синтезированного внеклеточного матрикса ближе к нативным тканям, чем монослойные культуры [9, 10]. В частности, формирование адгезивных E-кадгериновых контактов обеспечивает клеткам в 3D условиях остановку активной пролиферации и защиту от апоптоза [11]. Кроме того, 3D культивирование клеток позволяет поддерживать их тканеспецифичные свойства — в сфероидах по сравнению с монослойными культурами активнее экспрессируются функциональные гены [8, 12, 13]. В случае 3D культур ММСК формирование сфероидов способствует повышению секреции противовоспалительных и проангиогенных факторов, что усиливает регенеративный потенциал клеток [14].

*Цель исследования* — сравнение миогенного потенциала стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки рта в 2D и 3D условиях культивирования.

## Методика

*Обработка материала и выделение стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта*

Для получения первичных культур стромальных клеток использовали биоптаты альвеолярной слизистой оболочки полости рта. После подписания здоровыми донорами добровольного информированного согласия, в условиях хирургического стоматологического кабинета с соблюдением правил асептики под местным обезболиванием раствором Ультракаина (1,7 мл, 40 мг/мл) выполнялась биопсия слизистой оболочки полости рта в ретромолярной области.

Биоптаты альвеолярной слизистой оболочки полости рта поступали в лабораторию в 15-миллилитровых пробирках в транспортной среде, состоявшей из смеси сред DMEM/F12 с L-глутамином (0,3 мг/мл) и гентамицином (40 мг/мл).

Биоптаты переносили в 50-миллиметровую пробирку с свежеприготовленным раствором Хенкса с антибиотиками (гентамицин и пенициллин/стрептомицин) и антимикотиком Дифлюканом, инкубировали при 25°C 5 мин. Процедуру повторяли 3 раза. Отмытый биоптат переносили в чашку Петри диаметром 35 мм и механически измельчали глазными ножницами.

*Эксплантационные культуры.* Часть измельченной ткани сразу переносили на 35 мм чашки Петри и покрывали минимальным количеством ростовой среды, для обеспечения быстрой адгезии эксплантатов к культуральному пластику. Через 24 ч неприкрепленные фрагменты ткани переносили на новые

чашки Петри, в чашки с прикрепившимися эксплантатами добавляли 2 мл ростовой среды.

**Ферментативная обработка.** Переносили измельченные фрагменты в 15-миллилитровую пробирку и заливали 2—4 мл рабочего раствора коллагеназы II типа 200 Ед/мл (Sigma). Инкубировали на шейкере в инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 2 ч. После инкубации действие фермента инактивировали добавлением равного объема полной ростовой среды и центрифугировали (7 мин, 100g). Осадок ресуспендировали в полной ростовой среде и помещали на чашки Петри диаметром 35 мм (SPL, Корея). Полная ростовая среда состояла из смеси DMEM/F12 (1:1) с L-глутамином (0,3 мг/мл) с добавлением 60 мкг/мл гентамицина и 20% FBS (HyClone, США).

**Культивирование клеток в монослойной культуре.** Культивирование проводили в стандартных условиях — 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% H<sub>2</sub>O. Смену среды и визуальный контроль состояния культур проводили раз в 2—3 сут. при помощи инвертированного микроскопа с фазовым контрастом СКХ41 (Olympus, Япония). При достижении 70—80% конfluентности культуры пассировали. Для этого чашки промывали в 3 сменах раствора версена (БиоЛот, Санкт-Петербург), и обрабатывали 0,25%-ным раствором трипсина (3 мин, 37°C) переносили полученную суспензию на новые чашки Петри с двухкратным увеличением посевной площади и заливали полной ростовой средой. На следующие сутки после пассирования в чашках меняли полную ростовую среду.

**Криоконсервация клеток.** Для создания криобанка используемых в работе культур клеток, на разных пассажах осуществляли их криоконсервацию. Для этого получали суспензию клеток по методике, описанной для пассирования культур, и центрифугировали ее (7 мин, 100g). Полученный осадок ресуспендировали в FBS из расчета 1 мл сыворотки на 10 × 10<sup>6</sup> клеток. Клеточную суспензию в сыворотке переносили в пробирки для криоконсервации и добавляли диметилсульфоксид (ДМСО) — 10% от объема сыворотки. Пробирки в специальном боксе переносили в низкотемпературный холодильник (до -80°C), чтобы температура раствора снижалась постепенно со скоростью 1°C в мин. Через 1 сут. полностью охлажденные пробирки переносили в сосуды Дьюара с жидким азотом.

**Дифференцировка клеток в миогенном направлении:**

**Индукцированная дифференцировка.** Получали суспензию клеток по методике, описанной для пассирования культур и помещали на чашки Петри с покровным стеклом (SPL, Корея) для последующего анализа с применением лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Для индукции миогенной дифференцировки применяли дифференцировочную

среду — DMEM low glucose + 2% Horse Serum (BioInd).

**Спонтанная дифференцировка.** При достижении культурами клеток плотности выше 20 000 клеток на 1 см<sup>2</sup> происходила спонтанная дифференцировка клеток в миогенном направлении с образованием миотуб в стандартной полной ростовой среде.

**Культивирование клеток в 3D условиях — получение сфероидов.** Монослойные культуры клеток подвергали обработке, аналогичной при пассировании культур, полученные суспензии центрифугировали (7 мин, 100 g). Полученный осадок ресуспендировали в полной ростовой среде или в дифференцировочной среде до концентрации 3,3 × 10<sup>6</sup> кл/мл и получали сфероиды по отработанным в лаборатории технологиям [8]. Культивировали сфероиды в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в инкубаторе или в специальной термостатируемой камере прибора Cell-IQ (CM Technologies, Финляндия) для прижизненной цитраферной микроскопии. Смену полной ростовой среды осуществляли раз в 2—3 сут.

**Прижизненная цитраферная (time-lapse) микроскопия.** Прижизненную цитраферную микроскопию 2D и 3D культур осуществляли с использованием прибора Cell-IQ (CM Technologies, Финляндия). В программном обеспечении Cell-IQ Imagen настраивали параметры съемки: количество полей съемки в каждой лунке планшета, глубину съемки (Z-stack) для получения четкого изображения, время экспозиции и интервал фоторегистрации. Последующий анализ полученных библиотек изображений осуществляли с помощью программного обеспечения Cell-IQ Analyser.

**Иммуноцитохимический анализ.** Для проведения иммуноцитохимического анализа 2D культуры на покровных стеклах и сфероиды фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (20 мин, 4°C), после этого отмывали от фиксатора в растворе фосфатного-солевого буфера (рН 7,4; 3 смены по 5 мин) и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами к белкам MyoD, α-гладкомышечному актину и саркомерному α-актину (Abscam). Тщательно отмывали пробы в растворе фосфатного-солевого буфера (рН 7,4) и инкубировали (60 мин, 25°C) в темноте со вторичными козьими антителами к мыши, конъюгированными с DyLight 488, и козьими антителами к кролику, конъюгированными с DyLight 594. Ядра на препаратах докрашивали красителем бис-бензид (Hoechst 33258, Serva). Из окрашенных образцов делали постоянные препараты с использованием заливочной среды Vitro-Gel (Biovitrum, Москва) и анализировали в видимом и ультрафиолетовом световых диапазонах в лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus Fluoview FV10I (Olympus, Япония).

## Результаты и обсуждение

Монослойное культивирование стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта. При применении метода эксплантационного культивирования клетки начинали мигрировать из эксплантатов только на 14-е — 20-е сут. после выделения, полученные культуры были гетерогенны и содержали как стромальные, так и эпителиальные клетки альвеолярной слизистой оболочки ротовой полости (рис. 1, А). Поэтому после анализа 10 образцов биоптатов от пациентов разного пола и возраста для быстрого получения, последующего анализа и банкирования культур стромальных клеток был выбран метод ферментативного выделения клеток. Культуры стро-

мальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта формировали колонии через 5—7 сут. после ферментативной обработки биоптатов (рис. 1). В 40% выделенных культур стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта наблюдали спонтанную миогенную дифференцировку клеток (рис. 2, А, Б).

Индукция миогенной дифференцировки с помощью специальной среды в монослойных культурах также приводила к формированию миотуб (рис. 2, В), В культурах стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта при спонтанной и индуцированной миогенной дифференцировке наблюдали экспрессию в клетках маркера миогенных прогени-

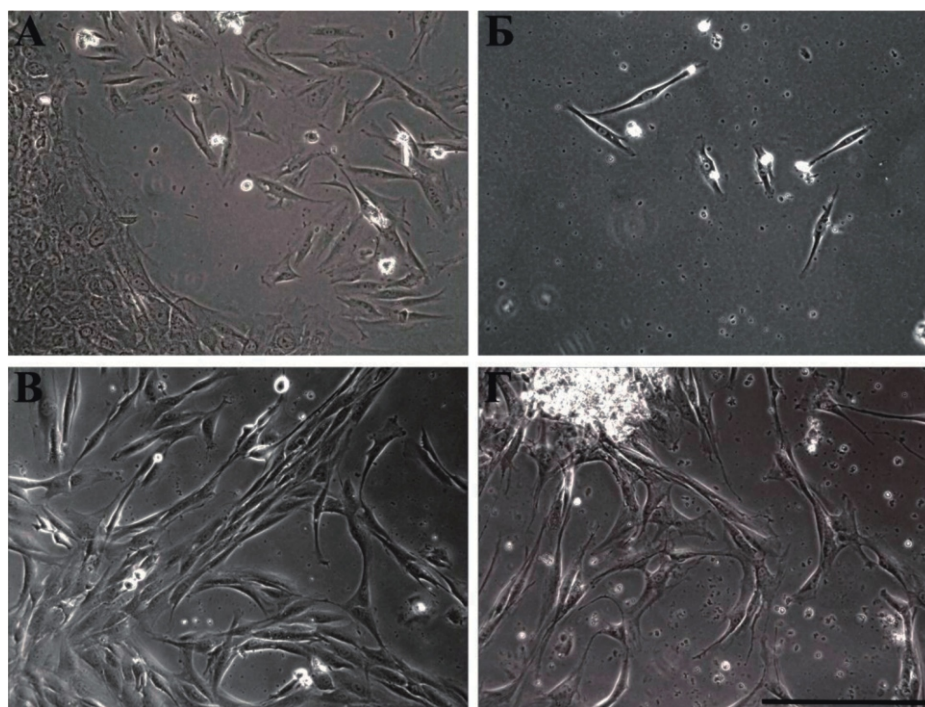


Рис. 1. Получение стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта. А — эксплантационная культура, из эксплантатов выселились как стромальные клетки, так и клетки эпителия слизистой (слева), Б — 3-е сут., В — 5-е сут., Г — 7-е сут. после ферментативной обработки биоптата. Световая микроскопия с фазовым контрастом, масштабный отрезок 50 мкм.

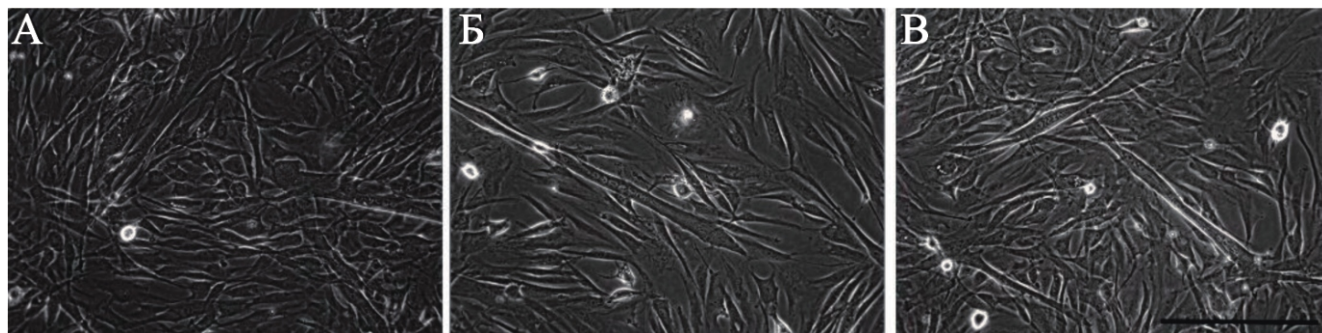


Рис. 2. Формирование миотуб с центральнорасположенными ядрами при спонтанной (А, Б) и индуцированной (В) дифференцировке стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта в миогенном направлении. Световая микроскопия с фазовым контрастом, масштабный отрезок 50 мкм.

торных клеток — транскрипционного фактора MyoD (рис. 3). Синтез саркомерного  $\alpha$ -актина, характерного для дифференцированных мышечных клеток поперечно-полосатой и сердечной мышечной ткани, практически отсутствовал, незначительное количество белка было равномерно распределено по цитоплазме индуцированных в миогенном направлении стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта (рис. 4). Также отсутствовал синтез одного из ключевых факторов миграционной активности и маркера миофибробластов —  $\alpha$ -гладкомышечного актина.

Таким образом, в монослойной культуре индукционное воздействие или спонтанная дифференцировка стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта приводит к появлению прогениторных мышечных клеток.

*Миогенная дифференцировка стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта в 3D культуре.* В соответствии с отработанными ранее протоколами получения сфероидов из соматических клеток человека [8, 15] были подобраны условия и сроки культивирования для получения сфероидов из стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта. Оптимальный срок для формирования сфероидов составил 7 сут.

Стромальные клетки альвеолярной слизистой оболочки полости рта за 7 сут. культивирования в 3D условиях спонтанно дифференцировались в миогенном направлении. При этом в дифференцированных сфероидах не наблюдали признаков ранних прогениторных клеток — в ядрах не синтезировался маркер начальных стадий миогенеза MyoD, транскрипционный фактор, регулирующий дифференцировку проге-

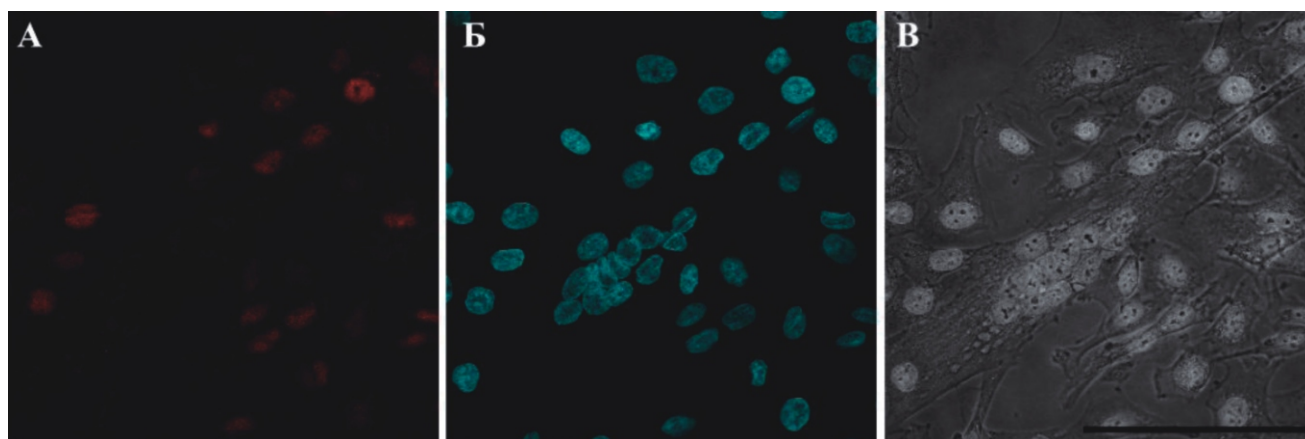


Рис. 3. Экспрессия MyoD (А) в ядрах миогенных предшественников из стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта, индуцированных в миогенном направлении, ядра докрашены красителем бис-бензимидаз (Б). Видимый свет — Б'. В сформированной миотубе синтез MyoD, раннего маркера миогенеза, отсутствовал. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм.

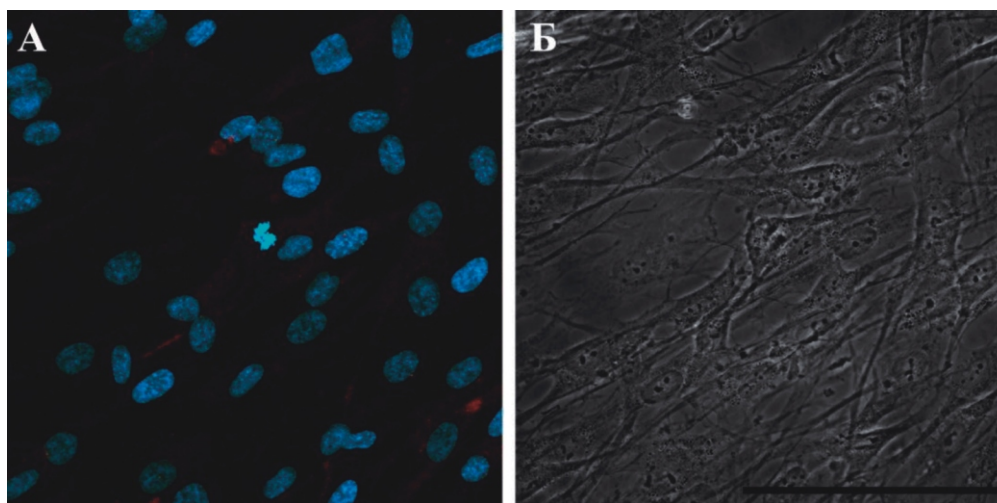


Рис. 4. Диффузное распределение саркомерного  $\alpha$ -актина (А, красный) в цитоплазме стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта, спонтанно дифференцированных в миогенном направлении, ядра докрашены красителем бис-бензимидаз (А, синий), Б — видимый свет. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм.

ниторных клеток в миотубы. В отличие от монослойных культур, в сфероидах образовывались не миотубы, а более дифференцированные хорошо сформированные миофибриллы с характерным расположением ядер по периферии и поперечной исчерченностью, выявленной при окрашивании сфероидов антителами к белку саркомерному  $\alpha$ -актину (рис. 5).

Культивирование соматических клеток в виде сфероидов обладает рядом преимуществ по сравнению с монослойными культурами, особенно в случае низкокодифференцированных клеток, так как микроокружение играет ключевую роль в определении свойств стволовых клеток. В 3D культуре можно выделить 3 типа факторов микроокружения:

- 1) химический и биохимический состав;
- 2) пространственное и временное измерения;
- 3) жесткость и физические свойства субстрата.

При этом в физиологических условиях трехмерной культуры клетки постепенно сами синтезируют необходимые для поддержания своего микроокружения компоненты внеклеточного матрикса и цитокины [15].

Известно, что в сфероидах из ММСК, выделенных из различных источников, в сравнении с монослойными культурами повышен уровень экспрессии 3 ключевых факторов плюрипотентности: Oct4, Sox2 и Nanog [16—18]. Культивирование соматических клеток в 3D условиях приводит к снижению уровня метилирования транскрипционных факторов Oct4, Nanog и Sox2, клетки становятся транскрипционно активными. В сфероидах, по сравнению с монослойной культурой, может развиваться гипоксия, что дополнительно способствует поддержанию недифференцированного статуса клеток. Кроме того, происходит активный синтез внеклеточного матрикса и снижается

скорость диффузии растворимых факторов, что создает градиент сигнальных факторов и механических стимулов [19]. В то же время уже показано, что эктопическая экспрессия транскрипционного фактора Nanog способствует восстановлению пролиферативного и миогенного потенциала ММСК, выделенных из костного мозга пожилых пациентов [20]. Вероятно, в нашем исследовании сходные механизмы стимулировали более эффективную миогенную дифференцировку стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки рта при культивировании в 3D условиях.

Функционально в состав мышечных тканей входят 2 типа обособляющихся в эмбриогенезе клеток: неделящиеся миобласты, впоследствии формирующие симпласты, и способные делиться митозом миосателлиты, участвующие в физиологической и репаративной регенерации мышц [2, 21]. Предполагаемый гистогенетический ряд поперечнополосатой мускулатуры включает в себя компартмент стволовых клеток, пролиферирующие клетки-предшественники, созревающие миогенные структуры — сливающиеся и созревающие миотубы, в которых сохраняется экспрессия MyoD, и зрелые не экспрессирующие MyoD структуры с характерным периферическим расположением ядер [22]. Процесс самоподдержания пула миосателлитов и сохранения их свойств как стволовых клеток все еще недостаточно изучен. Условия 3D культивирования способствуют поддержанию как низкокодифференцированных камбиальных предшественников, так и сформированных миофибрилл, что позволяет рассматривать сфероиды как универсальные репаративные модули для восстановления поврежденной мышечной ткани *in vivo* и для изучения механизмов миогенеза *in vitro*.

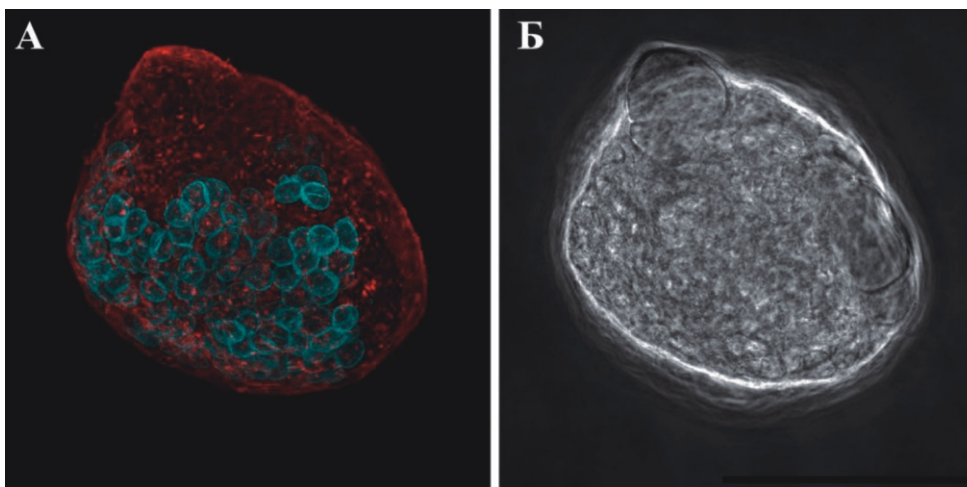


Рис. 5. Миофибриллы в сфероидах из стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта. Характерное распределение саркомерного  $\alpha$ -актина (А, красный), ядра докрашены красителем бис-бензимида (А, синий), Б — видимый свет. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм.

### Заключение

Таким образом, мы показали, что индуцированная и спонтанная миогенная дифференцировка стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта в монослойной культуре проходит лишь начальные стадии — в культуре появляются миогенные предшественники, экспрессирующие ранний маркер миогенеза MyoD, и многоядерные миотубы, признаки перехода клеток в миофибробласты отсутствовали. При дифференцировке клеток альвеолярной слизистой оболочки рта в 3D условиях культивирования в составе сфероидов появлялись более зрелые структуры — миофибриллы с характерной поперечной исчерченностью.

### Литература

(п.п. 1—15; 17—21 см. References)

16. Кошелева Н.В., Сабурина И.Н., Зурина И.М., Горкун А.А., Борзенко С.А., Никишин Д.А. и др. Технология создания мультипотентных сфероидов из мезенхимных стромальных клеток лимба для репарации поврежденных тканей глаза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2016; 60(4): 160-7.  
 22. Шевелева О.Н., Паюшина О.В. Старостин В.И. Клеточные и молекулярные основы миогенеза. *Известия РАН. Серия биологическая* 2012; (6): 579-88.

### References

1. Ullah I., Subbarao R.B., Rho G.J. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. *Bioscience reports*. 2015; 35(2): e00191.  
 2. Gilbert S.F., Barresi M.J.F. *Developmental Biology*. 11<sup>th</sup> ed. Sunderland (Mass.): Sinauer Associates, Inc., Publishers; 2016.  
 3. Ballini A., De Frenza G., Cantore S. Papa F., Grano M., Mastrangelo F. et al. In vitro stem cell cultures from human dental pulp and periodontal ligament: new prospects in dentistry. *International journal of immunopathology and pharmacology* 2007; 20: 9-16.  
 4. Jin S.H., Lee J.E., Yun J.H., Kim I., Ko Y., Park J.B. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells from gingival connective tissue. *Journal of periodontal research* 2015; 50(4): 461-7.  
 5. Isaac J., Nassif A., Asselin A., Taihi I., Fohrer-Ting H., Klein C. et al. Involvement of neural crest and paraxial mesoderm in oral mucosal development and healing. *Biomaterials* 2018; 172: 41-53.  
 6. Zorin V.L., Pulin A.A., Eremin I.I., Korsakov I.N., Zorina A.I., Khomova N.V. et al. Myogenic potential of human alveolar mucosa derived cells. *Cell Cycle*. 2017; 16(6): 545-55.  
 7. Rao L., Qian Y., Khodabukus A., Ribar T., Bursac N. Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue. *Nature communications*. 2018; 9(1): 126.

8. Repin V., Saburina I., Kosheleva N., Gorkun A., Zurina I., Kubatiev A. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation *in vitro*. *Bulleten of experimental biology and medicine*. 2014; 158(1): 137-44.  
 9. Cui X., Hartanto Y., Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of The Royal Society Interface*. 2017; 14(127): 20160877.  
 10. Lin R.Z., Chang H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology* 2008; 3(9-10): 1172-84.  
 11. Stockinger A., Eger A., Wolf J., Beug H., Foisner R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent  $\beta$ -catenin transcriptional activity. *The Journal of cell biology* 2001; 154(6): 1185-96.  
 12. Gorkun A.A., Shpichka A.I., Zurina I.M., Koroleva A.V., Kosheleva N.V., Nikishin D.A., Butnaru D.V., Timashev P.S., Repin V.S., Saburina I.N. Angiogenic potential of spheroids from umbilical cord and adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells within fibrin gel. *Biomedical Materials*. 2018; 13(4): 044108.  
 13. Chang T.T., Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Engineering Part A*. 2008; 15(3): 559-67.  
 14. Sart S., Tsai A. C., Li Y., Ma T. Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2013; 20(5): 365-80.  
 15. Asthana A., Kisaalita W.S. Is time an extra dimension in 3D cell culture? *Drug discovery today*. 2016; 21(3): 395-9.  
 16. Kosheleva N.V., Saburina I.N., Zurina I.M., Gorkun A.A., Borzenok S.A., Nikishin D.A. et al. The technology of obtaining multipotent spheroids from limbal mesenchymal stromal cells for reparation of injured eye tissues. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(4): 160-7. (In Russian)  
 17. Saburina I., Zurina I., Kosheleva N., Gorkun A., Koloktsova T., Repin V. Studying epithelial-mesenchymal plasticity of human somatic cells in 3D culture. *FEBS Journal* 2014; 281: 35.  
 18. Cheng N.C., Wang S., Young T.H. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials*. 2012; 33(6): 1748-58.  
 19. Brown A.P., Fiore V.F., Sulchek V.A., Barker V.H. Physical and chemical microenvironmental cues orthogonally control the degree and duration of fibrosis-associated epithelial-to-mesenchymal transitions. *The Journal of pathology*. 2013; 229(1): 25-35.  
 20. Han J., Mistriotis P., Lei P., Wang D., Liu S., Andreadis S.T. Nanog reverses the effects of organismal aging on mesenchymal stem cell proliferation and myogenic differentiation potential. *Stem Cells*. 2012; 30(12): 2746-59.  
 21. Relaix F., Zammit P.S. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* 2012; 139(16): 2845-56.  
 22. Sheveleva O.N., Payushina O.V., Starostin V.I. Cellular and molecular basis of skeletal muscle histogenesis. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya*. 2012; (6): 579-88. (In Russian)

**Сведения об авторах:**

*Сабурова Ирина Николаевна*, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИ ОПП; проф. группы регенеративной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

*Кошелева Настасья Владимировна*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИ ОПП; ст. науч. сотр. группы регенеративной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; доцент каф. эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: n\_kosheleva@mail.ru;

*Зурина Ирина Михайловна*, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИ ОПП; науч. сотр. группы регенеративной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; науч. сотр. Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первого МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России;

*Горкун Анастасия Алексеевна*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИ ОПП, ассистент каф. биохимии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; ст. науч. сотр. Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первого МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России;

*Пулин Андрей Алексеевич*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИ ОПП; ст. науч. сотр. группы регенеративной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; ст. эксперт лаб. доклинических исследований Управления регенеративной медицины АО «ГЕНЕРИУМ»;

*Еремин Илья Игоревич*, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИ ОПП; начальник Управления регенеративной медицины АО «ГЕНЕРИУМ»;

*Зорин Вадим Леонидович*, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИ ОПП; руководитель отдела регенеративной медицины ПАО Институт стволовых клеток человека;

*Копнин Павел Борисович*, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИ ОПП, зав. лаб. цитогенетики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Труш В.В.<sup>1</sup>, Соболев В.И.<sup>2</sup>, Попов М.Н.<sup>2</sup>

## Оценка эффективности аргинина в компенсации стероидной миопатии у белых крыс, индуцированной длительным введением дексаметазона

<sup>1</sup> ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», 83050, ул. Щорса, 46, г. Донецк, Украина

<sup>2</sup> Институт педагогики, психологии и инклюзивного образования Гуманитарно-педагогической академии (филиал)

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», 298650, Ялта, Россия, ул. Стахановская, д. 11

**Цель** — изучение эффективности аргинина (Арг) в компенсации негативного влияния длительно вводимого дексаметазона (Д) на скелетную мышцу смешанного типа с преобладанием быстрых волокон (переднюю большеберцовую). **Методика.** Эксперименты проводились на половозрелых крысах-самках (190—210 г), разделенных на 4 группы: контрольную (n = 10, К-группа), I опытную (n = 10, на протяжении 30 сут. получали дексаметазон, Д-группа), II опытную (n = 10, на протяжении 30 сут. получали дексаметазон в комплексе с аргинином, Д + Арг-группа) и III опытную (n = 10, на протяжении 30 сут. получали аргинин, Арг-группа). Дексаметазон («КРКА», Словения) вводили 1 раз в 2 сут., внутривенно в дозе, адекватной терапевтической для человека, — 0,25 мг/кг. Аргинин («Кардиоаргинин», «Здоровье», Украина) вводили ежедневно, подкожно в дозе 100 мг/кг. На наркотизированных животных (тиопентал натрия, 100 мг/кг) с помощью методов электромиографии и миографии изучали некоторые параметры функционального состояния передней большеберцовой мышцы при ее сокращении, индуцированном раздражением малоберцового нерва сверхпороговым электрическим током. **Результаты.** Развитие ятрогенного гиперкортицизма сопровождалось ухудшением функционального состояния мышцы. Так, после 30 сут. введения Д отмечалось ухудшение электрофизиологических параметров мышцы: удлинение латентного периода М-ответа (на 19%) и уменьшение его амплитуды (на 37%) на фоне неизменной длительности, увеличение частоты полифазных потенциалов (до 40%), снижение надежности синаптической передачи (у 70% особей), патологически значимое ее облегчение (у 50% особей) и депрессия (у 20% особей) при оптимальной частоте (30 имп/с) стимуляции малоберцового нерва. Длительное введение Д обуславливало уменьшение количества активируемых двигательных единиц мышцы (на 43%) и ее массы (на 10%), а также ухудшение амплитудных и временных параметров одиночного сокращения: выраженное снижение амплитуды одиночного сокращения (на 53%), удлинение его латентного периода (на 48%) и фазы укорочения (на 46%). Применение Арг в комплексе с Д ослабляло негативное влияние синтетического глюкокортикоида на функциональное состояние мышцы. В частности, Арг предотвращал удлинение латентного периода и уменьшение амплитуды М-ответов, количества активируемых двигательных единиц мышцы и несколько уменьшал частоту встречаемости сниженной надежности синаптической передачи (у 40% особей против 70% в Д-группе), но не предотвращал полностью ее появления. Арг не предотвращал увеличения частоты полифазных М-ответов, но компенсировал снижение их амплитуды. Арг, вводимый в комплексе с Д, предотвращал уменьшение мышечной массы и ухудшение амплитудных и временных параметров одиночного сокращения мышцы, типичных для животных Д-группы. **Заключение.** Полученные в модельных экспериментах на животных в условиях *in situ* данные свидетельствуют о способности Арг компенсировать ряд негативных изменений, развивающихся в скелетной мышце при длительном введении Д.

**Ключевые слова:** скелетная мышца; дексаметазон; ятрогенный гиперкортицизм; стероидная миопатия; аргинин.

**Для цитирования:** Труш В.В., Соболев В.И., Попов М.Н. Оценка эффективности аргинина в компенсации стероидной миопатии у белых крыс, индуцированной длительным введением дексаметазона. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 120—129.

DOI:

**Для корреспонденции:** Труш Вера Владимировна, зав. каф. физиологии человека и животных ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», доцент, канд. мед. наук, e-mail: ver.trush@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.09.2017



Trush V.V.<sup>1</sup>, Sobolev V.I.<sup>2</sup>, Popov M.N.<sup>2</sup>

## Evaluation of arginine efficacy in control of steroid myopathy induced by long-term dexamethasone treatment in white rats

<sup>1</sup> Donetsk National University, Shchorsa Str. 46, Donetsk 83050, Ukraine

<sup>2</sup> V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Stakhanovskaya Str. 11, Yalta 298650, Russia

**Aim.** To study the efficacy of arginine (Arg) in control of adverse effects of long-term dexamethasone (D) treatment on the mixed-type skeletal muscle with prevalence of fast fibers (*m. tibial anterior*). **Method.** Experiments were performed on sexually mature female rats (190—210 g) divided into 4 groups: control (n = 10, C group), experimental group 1 (n = 10, dexamethasone treatment for 30 days, D group), experimental group 2 (n = 10, administration of dexamethasone in combination with arginine for 30 days, D + Arg group), and experimental group 3 (n = 10, arginine administration for 30 days, Arg group). Dexamethasone (KRKA, Slovenia) was injected at a dose equivalent to the human therapeutic dose (0.25 mg/kg, i.p.) every second day. Arginine (Kardioarginine, Zdorovje, Ukraine) was injected at a dose of 100 mg/kg, s.c., daily. The function of anterior tibial muscle was studied on anesthetized animals (sodium thiopental, 100 mg/kg) using electromyography and myography. Muscle contractions were induced by stimulation of the fibular nerve with suprathreshold electric current. **Results.** Development of iatrogenic hypercorticism was associated with deterioration of the muscle function. Thus, after 30 days of the D treatment, impairment of muscle electrophysiology was observed, including prolongation of the M response latency (19%) and a decrease in its amplitude (37%) with unchanged duration; increased frequency of polyphase potentials (up to 40%); reduced reliability (70% of animals) and pathologically significant facilitation of synaptic transmission (50% of animals) or its depression (20% of animals) at an optimum frequency (30 imp/s) of fibular nerve stimulation. The long-term D treatment resulted in decreases in the number of activated motor units (43%) and muscle weight (10%) and impairment of the amplitude and temporal parameters of a single contraction, including profound decreases in the single contraction amplitude (53%), latent period (48%), and shortening phase (46%). The Arg+D treatment attenuated the D adverse effects on the muscle function. Thus, Arg prevented the prolongation of M response latent period and decreases in its amplitude and number of activated muscle motor units, and somewhat decreased the incidence of reduced synaptic transmission reliability (40% of animals vs. 70% in the D group) but did not completely prevent it. Arg did not prevent the increase in polyphase M-response frequency, but controlled the decrease in its amplitude. Arg+D prevented the decrease in muscle weight and the impairment of single contraction amplitude and temporal parameters typical for animals of D groups. **Conclusion.** The study performed on an *in situ* animal model confirm the ability of Arg to effectively control some adverse changes developing in the skeletal muscle during long-term D administration.

**Keywords:** skeletal muscle; dexamethasone; iatrogenic hypercorticism; steroid myopathy; arginine.

**For citation:** Trush V.V., Sobolev V.I., Popov M.N. Arginine efficiency evaluation in compensation of the steroid myopathy induced by long dexamethasone administration at white rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 120—129. (in Russian).

**For correspondence:** Vera V. Trush, Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Physiology of Human and Animals of State Educational Institution of Higher Education «Donetsk national university», 46 Shchorsa St., Donetsk 83050, Ukraine, e-mail: ver.trush@yandex.ru

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

**Funding.** The study had no sponsorship.

### Information about authors:

Trush V.V., [http:// orcid.org/0000-0001-8514-8431](http://orcid.org/0000-0001-8514-8431)

Sobolev V.I., [http:// orcid.org/0000-0001-9318-5224](http://orcid.org/0000-0001-9318-5224)

Popov M.N., [http:// orcid.org/0000-0003-4957-8703](http://orcid.org/0000-0003-4957-8703)

Received 11.09.2017

## Введение

Естественные и синтетические глюкокортикоиды (ГК), широко используемые в клинической практике для лечения аллергических, аутоиммунных и гематологических заболеваний, в фармакологических дозах оказывают выраженное негативное влияние на лимфоидные органы, кожу, хрящевую и костную ткани, скелетную мускулатуру [1]. Изменения в опорно-двигательном аппарате при ятрогенном гиперкортицизме носят

дистрофический характер, сопровождаются развитием остеопороза и стероидной миопатии, влекущих за собой осса- и миалгии, нарушение двигательной активности больных и ухудшение качества жизни [2]. Несмотря на достаточно хорошую изученность клиники миопатических заболеваний эндокринного характера, вопросы, касающиеся эффективности различных средств для нивелирования негативных эффектов ГК на скелетную мускулатуру, остаются открытыми.

Выбор аргинина (Арг) для возможной компенсации стероидной миопатии был обусловлен следующими установленными его эффектами. Арг в умеренных дозах (до 800 мкмоль/л в плазме крови) стимулирует синтез белков во многих тканях [3] и продукцию анаболических гормонов — гормона роста, инсулиноподобного фактора роста I, инсулина [4, 5] — и повышает чувствительность периферических тканей к инсулину [5]. В связи с тем, что фармакологические дозы ГК способны подавлять продукцию гормона роста и инсулина, понижать чувствительность периферических тканей к этим гормонам и оказывать катаболическое действие на костную, хрящевую, мышечную и лимфоидные ткани [1], отмеченные эффекты Арг могут оказаться весьма полезными при гиперкортицизме.

Кроме того, установлена способность Арг и его метаболита — оксида азота (NO) — оказывать позитивное влияние на скелетную мускулатуру: повышать мышечный кровоток [6] и толерантность к физической нагрузке [7], стимулировать ангиогенез в ишемизированных скелетных мышцах [8], усиливать энергетический обмен в мышечных волокнах, регулировать содержание глюкозы в крови во время выполнения мышечных нагрузок и уменьшать молочнокислый ацидоз [9], ослаблять окислительную модификацию мышечных белков [10], понижать активность лизосомальных ферментов и стабилизировать мембраны лизосом в мышечных волокнах [11], понижать активность кальцийзависимых протеаз кальпаинов и тем самым защищать скелетные мышечные волокна от дистрофических изменений [12], замедлять атрофию скелетных мышц в условиях ее разгрузки вследствие предотвращения ослабления экспрессии миозина I типа [13]. Все перечисленные эффекты Арг на фоне относительной безопасности его применения [14—16] предопределили необходимость изучения его эффективности для ослабления выраженности стероидной миопатии в модельных экспериментах на животных.

*Цель работы* — изучение эффективности аргинина для сглаживания негативного влияния длительного применения дексаметазона на скелетную мышцу смешанного типа с преобладанием быстрых волокон (переднюю большеберцовую).

### Методика

Все эксперименты выполнены в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [17].

Работа одобрена этической комиссией университета. Исследования проводились на 40 половозрелых крысах-самках 4—5-месячного возраста с исходной массой тела 190—210 г. Животные были случайным образом разделены на 4 группы: контрольную — ин-

тактная, животные не подвергались никаким воздействиям (К-группа,  $n = 10$ ); 1-ю опытную — крысы на протяжении 30 сут. получали дексаметазон (Д-группа,  $n = 10$ ); 2-ю опытную — животные получали дексаметазон (Д) в комплексе с аргинином на протяжении 30 сут. (Д + Арг группа,  $n = 10$ ) и 3-ю опытную, получавшую только аргинин на протяжении 30 сут. (Арг-группа,  $n = 10$ ). Дексаметазон («KRKA», Словения) вводили внутривентриально, 1 раз в 2 сут., в дозе, адекватной терапевтической для человека, — 0,25 мг/кг. Аргинин (торговая марка «Кардиоаргинин», «Здоровье», Украина) вводили ежедневно в дозе 100 мг/кг, подкожно.

Выбор в качестве объекта исследований самок крыс связан с большей их чувствительностью, в сравнении с самцами, к катаболическому действию ГК. Выбор передней большеберцовой мышцы был предопределен тем, что эта мышца относится к смешанному типу с существенным преобладанием быстрых мышечных волокон [18], характеризующихся, в сравнении с медленными, более высокой чувствительностью к ГК [19]. Выбор Д для инициации стероидной миопатии был обусловлен тем, что данный препарат широко используется в клинической практике в связи с гораздо более выраженным (в 30 раз) и длительным (в 4—7 раз) противовоспалительным эффектом, в сравнении с естественными ГК [20].

По окончании месячного периода введения препаратов на наркотизированных животных (тиопентал натрия, 100 мг/кг, внутривентриально) проводили острый опыт, в ходе которого изучали электрофизиологические и эргометрические параметры передней большеберцовой мышцы с помощью экспериментальной установки, включающей 3 канала: *канал электростимулятора* (использовался для электрического раздражения малоберцового нерва), *электромиографический* (предназначался для регистрации М-ответов мышцы) и *эргометрический* (служил для измерения высоты, на которую поднимается груз во время сокращения мышцы с грузом). *Канал электростимулятора* представлен собственно электростимулятором (построен на основе функционального генератора ICL8038CCDP), оптронной гальванической развязкой и биполярными игольчатыми стальными электродами с межэлектродным расстоянием 1 мм. *Электромиографический канал* представлен отводящими биполярными игольчатыми стальными электродами (с межэлектродным расстоянием 1 мм) и электромиографическим биоусилителем (построен на основе измерительного усилителя INA118). *Эргометрический канал* включал потенциометрический датчик ПТП-1 с усилителем. Все каналы были связаны с регистрирующим устройством — запоминающим цифровым осциллографом Tektronix (TDS2004C).

*Протокол эксперимента:*

1. У наркотизированного животного в области бедра препарировали малоберцовый нерв и на расстоянии 1 см проксимальнее коленного сустава подводили под него раздражающие электроды. Стопу задней лапки животного крепили зажимом, на уровне большого пальца затягивали лигатуру, соединенную с потенциометрическим датчиком, и в среднюю часть передней большеберцовой мышцы (*m. tibialis anterior*) вводили отводящие игольчатые электроды.

2. Регистрировали одиночный М-ответ мышцы, индуцированный раздражением малоберцового нерва одиночными сверхпороговыми электрическими импульсами (длительность — 150 мкс каждый, частота — 0,2 имп/с, сила тока — 500 мкА). На основании записей одиночных М-ответов мышцы определяли их латентный период, амплитуду и длительность, а также оценивали форму (двух-, трехфазные, поли- и псевдополифазные).

3. Путем плавного (в течение 4 с) увеличения силы электрического раздражения от подпороговой до сверхпороговой (от 0,01 до 2 В) при частоте 10 имп/с записывали серию из сорока М-ответов мышцы. На основании процентного изменения амплитуды максимального М-ответа относительно амплитуды минимального определяли приблизительное количество активируемых двигательных единиц мышцы (методика Galea V. [21]).

4. После этого, раздражая малоберцовый нерв с частотой 4 имп/с сверхпороговыми электрическими импульсами (длительность — 150 мкс каждый, сила тока — 500 мкА), регистрировали в течение 5 с серию М-ответов и соответствующих им одиночных сокращений мышцы с внешней нагрузкой 20 г. На основании полученных записей оценивали изменение амплитуды 5-го или 10-го М-ответа относительно 1-го, принятого за 100%, а также определяли некоторые параметры одиночного сокращения мышцы: амплитуду, латентный период, длительность фаз укорочения и расслабления.

5. Далее в течение 5 с регистрировали серию М-ответов мышцы при частоте раздражения малоберцового нерва 30 имп/с. При этом длительность и сила электрических импульсов оставались прежними — 150 мкс и 500 мкА. На основании записи серии М-ответов мышцы определяли изменение их амплитуды относительно 1-го М-ответа, амплитуда которого принималась за 100%. Увеличение амплитуды М-ответов мышцы более чем на 30% относительно 1-го, характеризующегося сниженной амплитудой, указывало на патологическое облегчение синаптической передачи, тогда как уменьшение амплитуды М-ответов более чем на 25% относительно амплиту-

ды 1-го — на патологически значимую депрессию нервно-мышечной передачи [22].

По окончании острого опыта в условиях глубокого наркоза проводили эвтаназию животных путем введения летальной дозы (300 мг/кг) тиопентала натрия.

*Статистическая обработка.* Полученные экспериментальные данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, предварительно убедившись в том, что распределение значений в исследуемых вариационных рядах близко к нормальному (W-тест Шапиро—Уилка, Statistica, 7.0), и F-статистики на основании проверки нулевой и альтернативной гипотез. Значения  $p < 0,05$  рассматривали как статистически значимые.

## Результаты и обсуждение

*Влияние дексаметазона, применяемого изолированно и в комплексе с аргинином, на параметры М-ответа и устойчивость его генерации мышцей с частотой 4 имп/с.* Через 30 сут. введения Д отмечалось ухудшение параметров М-ответов: значимое удлинение (на 19%) относительно контроля латентного периода, уменьшение амплитуды (на 37%) на фоне неизменной длительности (табл. 1). Кроме того, у 40% крыс Д-группы регистрировались полифазные и псевдополифазные М-ответы уменьшенной амплитуды. Все эти изменения указывают в пользу возможного замедления нервно-мышечной передачи, снижения возбудимости мышечных волокон и десинхронизации их возбуждения вследствие повышения гетерогенности, а также частичного выключения патологически измененных волокон из возбуждения. Кроме того, снижение амплитуды М-ответов на фоне неизменной длительности может быть следствием снижения мембранного потенциала мышечных волокон и дистрофических их изменений, сопровождающихся уменьшением их диаметра [22].

В целом, наблюдаемое нами уменьшение амплитуды М-ответов при отсутствии их удлинения, а также появление низкоамплитудных полифазных М-ответов у животных Д-группы указывают в пользу развития стероидной миопатии [22].

Длительное изолированное введение Арг (табл. 1) обусловило существенное увеличение амплитуды исходных М-ответов (на 54% относительно контроля) на фоне нормальной их длительности, что может быть связано как с повышением возбудимости и степени синхронизации возбуждения в мышце, так и с увеличением диаметра мышечных волокон вследствие более выраженных анаболических процессов в них и ускоренного роста под влиянием Арг по сравнению с контролем.

Арг, вводимый в комплексе с Д, модулировал некоторые негативные эффекты синтетического ГК на электрофизиологические параметры мышцы. Так, у крыс Д + Арг-группы не наблюдалось удлинения латентного периода и уменьшения амплитуды М-ответов относительно контроля, типичных для Д-группы (табл. 1). Вместе с тем, у крыс Д + Арг-группы регистрировались полифазные потенциалы примерно с такой же частотой, как и у крыс Д-группы (табл. 1). В то же время в отличие от Д-группы у животных Д + Арг-группы полифазные потенциалы имели нормальную амплитуду, тогда как у крыс Д-группы они характеризовались сниженной амплитудой. Все отмеченные факты указывают в пользу способности Арг уменьшать выраженность патологических изменений параметров М-ответа, вызванных длительным введением Д.

Длительное изолированное введение Д сопровождалось снижением надежности нервно-мышечной передачи у 70% особей, в пользу чего свидетельствует наличие декремента амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го, превышающего 10%, при низкой частоте стимуляции малоберцового нерва (4 имп/с) [22]. Кроме того, средний по Д-группе декремент амплитуды М-ответов был значимо выше контрольного уровня (табл. 1).

Уменьшение надежности нервно-мышечной передачи при длительном введении дексаметазона наблюдалось и в более ранних наших исследованиях [23]. В основе этого патологического изменения могут лежать различные механизмы: в частности, уменьшение амплитуды потенциалов концевой пластинки [24] и блокада каналов холинорецепторов [25] при длительном введении ГК.

Изолированное введение Арг не повлияло на надежность нервно-мышечной передачи ни до, ни после выполнения утомляющей работы (табл. 1). Арг, вводимый в комплексе с Д, предотвращал уменьшение

исходной амплитуды М-ответов мышцы и несколько уменьшал частоту встречаемости сниженной надежности синаптической передачи (до 40% в Д + Арг-группе вместо 70% в Д-группе). Вместе с тем, средний по Д + Арг-группе декремент амплитуды М-ответов превышал контрольный уровень (табл. 1).

Таким образом, Арг несколько уменьшал частоту встречаемости сниженной надежности синаптической передачи у крыс Д + Арг-группы, но не предотвращал полностью ее появления, что свидетельствует в пользу возможных синаптических нарушений у крыс Д + Арг-группы.

*Влияние дексаметазона, применяемого изолированно и в комплексе с аргинином, на степень облегчения и депрессии синаптической передачи при стимуляции нервно-мышечного аппарата с частотой 30 имп/с.* С целью выявления возможных синаптических нарушений у животных Д- и Д + Арг-групп был оценен характер изменения амплитуды М-ответов при оптимальной частоте стимуляции нервно-мышечного аппарата — 30 имп/с. Слишком сильное облегчение на фоне сниженной исходной амплитуды М-ответа или выраженная депрессия синаптической передачи при оптимальной частоте стимуляции нерва позволяет выявить заблокированность синапсов, обусловленную пресинаптическими нарушениями, или возможную постсинаптическую патологию [22].

Анализ характера изменения амплитуды М-ответов в процессе их генерации с частотой 30 имп/с у животных всех групп показал следующее. У крыс К-группы патологически значимое облегчение или депрессия синаптической передачи вообще отсутствовала (табл. 2), хотя определенные физиологические колебания амплитуды М-ответов относительно таковой 1-го при ритмической стимуляции малоберцового нерва с оптимальной частотой (30 имп/с) имели мес-

Таблица 1

Средние значения ( $\bar{X} \pm m$ ) некоторых параметров М-ответа передней большеберцовой мышцы у крыс контрольной и опытных групп

Группа животных	Параметры М-ответа мышцы					
	Латентный период, мс	Амплитуда, мВ	Длительность, мс	% полифазных потенциалов	Декремент амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го, %	% особей в группе с декрементом амплитуды М-ответов более 10%
К-группа	1,2 ± 0,05	2,9 ± 0,33	5,9 ± 0,41	0	2,4 ± 1,14	0
Д-группа	1,5 ± 0,06 [+19*]	1,8 ± 0,20 [-37*]	5,7 ± 0,65	40	-19,5 ± 4,02 #	70
Д + Арг-группа	1,3 ± 0,04	3,5 ± 0,38	6,9 ± 0,68	50	-13,7 ± 6,38 #	40
Арг-группа	1,3 ± 0,07	4,4 ± 0,34 [+54*]	7,1 ± 0,54	0	10,7 ± 4,12	0

Примечание. Количество животных в каждой группе равно 10; \* — в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно контрольной группы (%; p<0,05); # — разница декремента амплитуды М-ответа относительно такового контроля статистически значима (p<0,05).

то. При этом средние по группе степени облегчения и депрессии синаптической передачи у контрольных животных не достигали 30 и 25% соответственно. Данные факты указывают в пользу нормального состояния синаптических структур у особей К-группы.

Длительное изолированное введение Д сопровождалось появлением случаев как патологически значимого облегчения, так и депрессии синаптической передачи. Так, у животных Д-группы наблюдалось не только уменьшение амплитуды исходных М-ответов мышцы, но и патологически значимое облегчение синаптической передачи у 50% особей (табл. 2). Кроме того, средняя по Д-группе степень облегчения синаптической передачи превышала 30% и оказалась значимо выше уровня контроля (табл. 2).

Патологически значимая депрессия синаптической передачи у животных Д-группы встречалась реже облегчения: у 30% особей, и средняя по группе степень депрессии синаптической передачи не достигала 25%, но значимо превосходила контрольный уровень (табл. 2).

Патологически значимое облегчение синаптической передачи на фоне высокой вариабельности амплитуды М-ответов при низкой исходной их амплитуде в условиях стимуляции нервно-мышечного аппарата электрическими стимулами нарастающей частоты было обнаружено и в более ранних наших исследованиях при длительном введении гидрокортизона [26]. Выраженное облегчение синаптической передачи на фоне уменьшенной относительно контроля амплитуды 1-го М-ответа у животных Д-группы отражает исходную заблокированность синапсов, тогда как выраженная депрессия синаптической передачи, встречавшаяся несколько реже патологического облегчения, является следствием постсинаптических расстройств [22].

Введение Арг в комплексе с Д не предотвращало полностью появления признаков патологически зна-

чимого облегчения и депрессии синаптической передачи, но существенно уменьшило частоту их встречаемости (табл. 2). Учитывая тот факт, что патологически значимые облегчение и депрессия синаптической передачи у крыс Д + Арг-группы имели место на фоне нормальной амплитуды 1-го М-ответа, они, скорее всего, не связаны с истинно патологическими изменениями в синапсах и являются следствием более выраженной, чем в контроле, потенциации постсинаптических потенциалов при следовании импульсов через синапс с частотой 30 имп/с. Одной из причин этой более выраженной потенциации постсинаптических потенциалов у животных Д + Арг-группы может служить способность метаболита аргинина — NO, активируя гуанилатциклазу и повышая уровень цГМФ в пресинаптическом полюсе, облегчать и потенцировать кальцийзависимый экзоцитоз медиатора [27].

В целом, доказательством непатологической природы выраженного облегчения и депрессии синаптической передачи у животных Д + Арг-группы являются следующие факты:

1) нормальная исходная амплитуда М-ответов у крыс Д + Арг-группы, тогда как у крыс Д-группы она была снижена;

2) примерно одинаковая частота встречаемости случаев выраженного облегчения и депрессии синаптической передачи у крыс Д + Арг-группы и обнаружение этих признаков зачастую у одной и той же особи;

3) признаки выраженной депрессии и облегчения синаптической передачи встречались и в Арг-группе (у 30% особей) на фоне повышенной амплитуды исходных М-ответов. При этом средние по группе степени облегчения и депрессии синаптической передачи в Арг-группе значимо не отличались от контроля (табл. 2).

Таблица 2

Изменение (%) амплитуды М-ответов относительно 1-го при стимуляции нервно-мышечного аппарата с частотой 30 имп/с

Параметр М-ответа мышцы	Группа животных			
	К-группа	Д-группа	Д + Арг-группа	Арг-группа
Степень облегчения синаптической передачи (повышение амплитуды М-ответов в % относительно 1-го М-ответа)	11,1 ± 2,86	37,8 ± 8,91 *	26,3 ± 9,03	17,9 ± 5,89
Процентное количество особей в группе с облегчением синаптической передачи более 30%	0	50	20	30
Степень депрессии синаптической передачи (снижение амплитуды М-ответов в % относительно 1-го)	-2,9 ± 2,28	-19,5 ± 5,34 *	-2,57 ± 1,77	-20,8 ± 8,44
Процентное количество особей в группе с депрессией синаптической передачи более 25%	0	20	10	30
Примечание. Количество животных в каждой группе равно 10; * — разница степени облегчения или депрессии синаптической передачи статистически значима (p<0,05) относительно контроля.				

Учитывая выявленные нами нарушения со стороны электрофизиологических параметров мышцы у животных Д-группы и гораздо меньшую их выраженность при комплексном применении Д + Арг, на следующем этапе наших исследований представляло интерес оценить степень изменения сократительных параметров мышцы у животных, получавших Д изолированно и в комплексе с Арг.

*Влияние дексаметазона, применяемого изолированно и в комплексе с аргинином, на параметры одиночного сокращения мышцы.* Нарушение электрофизиологических параметров мышцы у животных Д-группы сопровождалось и определенными изменениями сократительных параметров. Так, у крыс Д-группы отмечалось существенное уменьшение относительно контроля амплитуды одиночного сокращения (на 53%), удлинение фазы укорочения и латентного периода сокращения на 46 и 48% соответственно (табл. 3). Отмеченные изменения амплитудных и временных параметров одиночного сокращения мышцы служат подтверждением развития миопатических изменений в ней и могут быть связаны с нарушением под действием фармакологических доз ГК степени синхронизации возбуждения и сокращения в мышце, энергетического обеспечения сократительного акта, дистрофическими изменениями части мышечных волокон, особенно быстрого (гликолитического) типа, и даже частичным выключением патологически измененных волокон из сокращения. Учитывая способность длительно вводимых ГК и их синтетических аналогов вызывать дистрофические изменения в мышечных волокнах [28], особенно гликолитического типа [19], протеолиз миофибриллярных белков [29], ослаблять транспорт глюкозы в мышечные волокна [30], нарушать энергообмен в них [31, 32], а также наблюдаемое нами удлинение латентного периода и уменьшение амплитуды М-ответов у крыс Д-группы, свидетельствующие в пользу десинхронизации

возбуждения в мышце, все перечисленные выше механизмы снижения амплитуды одиночного сокращения у животных, длительно получавших Д, могли реализоваться.

С целью выявления возможных причин ухудшения сократительных параметров мышцы крыс Д-группы нами проанализированы характер изменения ее массы и количества активируемых при электрическом раздражении малоберцового нерва двигательных единиц. Оказалось, что у животных Д-группы масса мышцы и среднее количество активируемых двигательных единиц были существенно ниже контрольного уровня на 10 и 43%, соответственно (табл. 3). Таким образом, наряду с нарушением сократительных и временных параметров одиночного сокращения мышцы у животных Д-группы наблюдалось и частичное выключение мышечных волокон из возбуждения и сокращения, в пользу чего указывает снижение как амплитуды М-ответов, так и среднего количества активируемых двигательных единиц.

Изолированное применение Арг в целом положительно сказывалось на сократительных и временных параметрах одиночного сокращения мышцы. Так, у животных Арг-группы наблюдалось значимое (на 13%), увеличение относительно контроля массы мышцы, амплитуды одиночного сокращения на 25% и существенное укорочение (на 16%) его латентного периода (табл. 3).

Все эти факты указывают в пользу возможного увеличения степени синхронизации возбуждения и сокращения мышечных волокон, а также скорости и эффективности электромеханического сопряжения в них под влиянием Арг. В основе наблюдаемого нами укорочения латентного периода и повышения амплитуды одиночного сокращения мышцы крыс Арг-группы может лежать способность NO, образующегося из Арг, облегчать циклические перемещения кальция в мышечных волокнах [33], что обуславлива-

Таблица 3

Средние значения ( $\bar{X} \pm m$ ) массы передней большеберцовой мышцы, количества активируемых ее двигательных единиц и параметров одиночного сокращения (с внешней нагрузкой 20 г) контрольных и опытных животных

Исследуемый параметр	Группа животных			
	К-группа	Д-группа	Д + Арг-группа	Арг-группа
Масса мышцы, мг	402,8 ± 9,34	363,9 ± 8,50 [-10*]	398,0 ± 9,32	454,3 ± 7,79 [+13*]
Количество активируемых двигательных единиц мышцы	14 ± 1,0	8 ± 1,0 [-43*]	12 ± 1,3	16 ± 1,2
Амплитуда укорочения, мм	3,0 ± 0,19	1,4 ± 0,32 [-53*]	3,4 ± 0,20	3,8 ± 0,26 [+25*]
Латентный период сокращения, мс	11,2 ± 0,57	16,5 ± 0,50 [+48*]	11,1 ± 0,52	9,4 ± 0,37 [-16*]
Фаза укорочения, мс	30,1 ± 1,22	43,9 ± 1,92 [+46*]	33,9 ± 1,62	33,4 ± 1,99
Фаза расслабления, мс	55,1 ± 3,08	58,5 ± 5,50	60,3 ± 5,78	60,0 ± 2,31

Примечание. Количество животных в каждой группе равно 10; \* — в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно контрольной группы (% ,  $p < 0,05$ ).

ет облегчение сопряжения между возбуждением и сокращением и повышение сократимости мышечных волокон. Кроме того, известно [34], что система «Арг — NO» вызывает активацию гуанилатциклазы и связанное с этим повышение уровня цГМФ в мышечных волокнах, что обуславливает цГМФзависимое фосфорилирование ряда белков и связанное с этим повышение активности ферментов гликолиза и скорости сокращения скелетных мышц.

Вместе с тем, положительный эффект Арг и его посредника NO на сократительные способности скелетных мышц носит дискуссионный характер [35, 36], что, вероятно всего, связано с принципиально разными эффектами низких и высоких доз Арг и соответственно NO. По всей видимости, применяемая нами доза Арг (100 мг/кг) является умеренной фармакологической и в целом вызывает позитивные изменения в передней большеберцовой мышце крыс при длительном введении.

Арг, вводимый в комплексе с Д, модулировал негативные эффекты синтетического ГК на амплитудные и временные параметры одиночного сокращения мышцы. Так, у животных Д + Арг-группы не наблюдалось уменьшения исходной амплитуды одиночного сокращения мышцы, удлинения его латентного периода и фазы укорочения, а также уменьшения мышечной массы и количества активируемых двигательных единиц (табл. 3), типичных для крыс Д-группы.

Таким образом, Арг предотвращал снижение массы исследуемой мышцы, уменьшение количества активируемых двигательных ее единиц, ухудшение амплитудных и временных параметров одиночного сокращения, имеющих место при изолированном введении Д.

Все эти факты указывают в пользу способности умеренных доз Арг не только оказывать позитивное влияние на скелетную мышцу смешанного типа, но и предотвращать ухудшение ее функциональных параметров под действием длительно вводимых ГК, что может быть обусловлено не только улучшением кровоснабжения и энергообеспечения мышечных волокон под действием Арг или его посредника NO [6—9], но и предотвращением дистрофических изменений мышечных волокон [10—12, 37]. И, действительно, некоторые авторы отмечают способность Арг замедлять атрофию камбаловидной мышцы крыс в условиях ее разгрузки вследствие предотвращения ослабления экспрессии миозина I типа [13], а также компенсировать различные дистрофические процессы при миопатиях, и, в частности, при синдроме MELAS [38].

Кроме того, сравнительно недавними исследованиями установлена способность NO активировать гуанилатциклазу и таким образом повышать уровень цГМФ в различных клетках [39]. Циклический ГМФ, наряду с активацией цГМФзависимых проте-

инкиназ и вызванного ими фосфорилирования белков, а также регуляции состояния ионных каналов, выступает в роли антагониста цАМФ, участвующего в генезе стероидной миопатии [40].

Таким образом, длительное изолированное введение дексаметазона приводит к ухудшению амплитудных и временных параметров одиночного сокращения мышцы. Аргинин, вводимый в комплексе с дексаметазоном, предотвращает ухудшение этих параметров, что указывает в пользу способности аргинина предотвращать развитие миопатических изменений в мышце.

## Литература

(п.п. 1; 4—6; 9; 18; 19; 21; 24; 25; 27—31; 33—37 см. References)

2. Полунина А.Г., Исаев Ф.В., Демьянова М.А. Стероидная миопатия. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2012; 112(10-2): 60-4.
3. Осипенко А. Роль системы оксида азота в процессах адаптации организма к физическим нагрузкам. *Наука в олимпийском спорте*. 2014; 1: 27-35.
7. Смуглов Е.П., Кузнецов Н.С., Шадчнева Н.А., Салхатиев А.Д. Клинические аспекты использования L-аргинина в комплексной терапии стабильной ИБС. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2015; 5(2): 60-4.
8. Маль Г.С., Артюшкова Е.Б., Полянский Д.В. Влияние L-аргинина на неоангиогенез при экспериментальной ишемии конечности. *Научный альманах*. 2015; 12(10-3): 341-3.
10. Арапова А.И., Фомина М.А. Окислительная модификация белков сердечной и скелетной мускулатуры крыс под влиянием субстрата синтеза оксида азота. *Вестник Пермского университета*. 2016; 1: 71-9.
11. Ильичева А.С., Фомина М.А., Исаков С.А. Оценка корректирующего воздействия аргинина и карнитина на активность и распределение катепсина L, H скелетной и гладкой мышц при выраженной гипергомощестемии. *Пермский медицинский журнал*. 2016; 33(2): 82-9.
12. Ломоносова Ю.Н., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Сигнальные эффекты субстратной стимуляции nNOS в скелетной мышце крысы после эксцентрической нагрузки. *Доклады Академии Наук*. 2013; 452(6): 685-9.
13. Ломоносова Ю.Н., Каламаров Г.Р., Бугрова А.Е., Шевченко Т.Ф., Карташкина Н.Л., Лысенко Е.А., Швец В.И., Немировская Т.Л. Защитное действие L-аргинина на белки *m. soleus* при функциональной разгрузке мышцы. *Биохимия*. 2011; 76(5): 701-12.
14. Валеев В.В., А.П., Коваленко А.Л., Петров А.Ю., Васильев А.Г. Новый вазодилататор натрия-L-аргинина сукцинат в профилактике и лечении доксорубин-индуцированной кардиотоксичности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(4): 52-7.
15. Дзукоев С.Г., Можяева И.В., Отиев М.А., Маргиева О.И., Дзукоева Ф.С. Влияние L-карнитина, афобазола и их комбинации с L-аргинином на биохимические и гистологические показатели дисфункции эндотелия при кобальтовой интоксикации у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 59(2): 70-5.

16. Ремизова М.И., Гербут К.А., Гришина Г.В., Нагорная К.Н. Действие доноров оксида азота на микроциркуляцию при инфузионной терапии геморрагического шока в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 4: 91-5.

17. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунатян, ред. Москва: Минздрав РФ, ЗАО «Гриф и К»; 2012.

20. Борисова Е.О. Клиническая фармакология парентеральных форм глюкокортикоидов. *Лечебное дело*. 2007; 3: 17-24.

22. Гехт Б.М. *Теоретическая и клиническая электромиография*. Л.: Наука, Ленинградское отделение; 1990.

23. Труш В.В., Соболев В.И. Амплитудно-частотная зависимость М-ответа скелетной мышцы крыс с экспериментальным гиперкортицизмом. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2015; 101(7): 829-42.

26. Соболев В.И., Труш В.В. Влияние тироксина на проявление эффектов дексаметазона на параметры М-ответа скелетной мышцы белых крыс. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2013; 99(9): 1067-76.

32. Труш В.В., Соболев В.И. Влияние ятрогенного гиперкортицизма, индуцируемого длительным введением дексаметазона, на энергетику мышечного сокращения у белых крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(4): 39-46.

38. Харламов Д.А., Крапивкин А.И., Сухоруков В.С., Куфтина Л.А., Грознова О.С. Неврологические нарушения при митохондриальной энцефаломиопатии — лактатацидозе с инсультоподобными эпизодами (синдроме MELAS). *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2012; 4(2): 44-50.

39. Литвяков А.М., Сергиевич А.В. Аргинин-зависимые механизмы в патогенезе атеросклероза. *Известия Национальной академии наук Беларуси*. 2013; 1: 103-12.

40. Бадалян Л.О., Фаустов В.С., Темин П.А. Изменение содержания циклической АМФ в мышце при экспериментальной дексаметазоновой миопатии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1980; 12: 669-70.

## References

1. Gardner D., Shoback D. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*. 9<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2011.

2. Polunina A.G., Isaev F.V., Dem'ianova M.A. Steroid myopathy. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2012; 112(10-2): 60-4. (In Russian)

3. Osipenko A. Role of nitrogen oxide system in processes of adaptation of an organism to physical activities. *Nauka v olimpiyskom sporte*. 2014; 1: 27-35. (In Russian)

4. Newsholme P. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clinical Science (London)*. 2005; 108(3): 185-94.

5. Lucotti P. Oral L-arginine supplementation improves endothelial function and ameliorates insulin sensitivity and inflammation in cardiopathic nondiabetic patients after an aortocoronary bypass. *Metabolism*. 2009; 58(9): 1270-6.

6. Bode-Boger S.M. Effect of L-arginine supplementation on NO production in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2006; 62(Suppl. 13): 91-9.

7. Smuglov E.P., Kuznetsov N.S., Shadchneva N.A., Sakhaltuyev A.D. Clinical aspects of L-arginine use in complex management of stable coronary artery disease. *Krymskiy*

*zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny*. 2015; 5(2): 60-4. (In Russian)

8. Mal' G.S., Artyushkova E.B., Polyansky D.V. Effect of L-arginine on the angiogenesis in the experimental limb ischemia. *Nauchnyy Almanakh*. 2015; 10-3(12): 341-3. (In Russian) DOI: 10.17117/na.2015.10.03.341.

9. Boger R.H., Bode-Boger S.M. The clinical pharmacology of L-Arginine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2001; 41: 79-99.

10. Arapova A.I., Fomina M.A. Oxidative modification of proteins in cardiac and skeletal muscles of rats under the influence of the substrate of nitric oxide synthesis. *Vestnik Permskogo Universiteta*. 2016; 1: 71-9. (In Russian)

11. Ilyicheva A.S., Fomina M.A., Isakov S.A. Assessment of correcting arginine and carnitine effects on activity and distribution of skeletal and smooth muscle L, H cathepsins in marked hyperhomocysteinemia. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2016; 33(2): 82-9. (In Russian)

12. Lomonosova Yu.N., Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. Signal effects of substrate stimulation of nNOS in rat skeletal muscle after eccentric loading. *Doklady Akademii Nauk*. 2013; 452(6): 685-9. (In Russian)

13. Lomonosova Yu.N., Kalamkarov G.R., Bugrova A.E., Shevchenko T.F., Kartashkina N.L., Lysenko E.A., Shvec V.I., Nemirovskaya T.L. Protective action of L-arginine on proteins of m. soleus at functional unloading of a muscle. *Biokhimiya*. 2011; 76(5): 701-12. (In Russian)

14. Valeev V.V., Trashkov A.P., Kovalenko A.L., Petrov A.U., Vasiliev A.G. Sodium-L-arginine succinate — a new vasodilating medicine for the treatment and prophylaxis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(4): 52-7. (In Russian)

15. Dzugkoev S.G., Mozhaeva I.V., Otiev M.A., Margieva O.I., Dzugkoeva F.S. Effect of L-carnitine, afobazole and their combination with L-arginine on biochemical and histological indices of endothelial dysfunction in cobalt intoxication in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59(2): 70-5. (In Russian)

16. Remizova M.I., Gerbout K.A., Grishina G.V., Nagornaya K.N. Influence of the nitric oxide donors on the microcirculation in infusion therapy of the experimental hemorrhagic shock. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2014; 58(4): 91-5. (In Russian)

17. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Mironova, N.D. Bunatyan, ed. Moscow: Ministry of health, JSC «Grif and K»; [*Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv*]. Moscow: Minzdrav RF, ЗАО «Гриф и К»; 2012. (In Russian)

18. Gauthier G.F. Skeletal muscle fiber types. In: Engel A.G., Banker B.Q., eds. *Myology. Basic and clinical*. New York, NY: McGraw-Hill; 1986: 255-283.

19. Savary I., Debras E., Dardevet D. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. *British Journal of Nutrition*. 1998; 3: 297-304.

20. Borisova E.O. Clinical pharmacology of parenteral forms of glucocorticoids. *Лечебное дело*. 2007; 3: 17-24. (In Russian)

21. Galea V., De Bruin H., Cavasin R., McComas A.J. The number and relative size of motor units estimated by computer. *Muscle and Nerve*. 1991; 14: 1123-30.

22. Geht B.M. *Theoretical and clinical electromyography. [Teoreticheskaya i klinicheskaya elektromiografiya]*. Leningrad; Nauka; 1990. (In Russian)

23. Trush V.V., Soboлев V.I. Amplitude-frequency's dependence of M-response of the skeletal muscle of rats with experi-



mental hypercorticoidizm. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2015; 101(7): 829-42. (In Russian)

24. Braun S., Sarkozi E., McFerrin J. Hydrocortisone influences voltage-dependent L-type calcium channels in cultured human skeletal muscle. *Journal of Neuroscience Research*. 1995; 6: 727-33.

25. Bouzat C., Barrantes F.J. Assigning function to residues in the acetylcholine receptor channel region. *Molecular Membrane Biology*. 1997; 14: 167-77.

26. Sobolev V.I., Trush V.V. Influence of Thyroxine on Display of Dexamethasone's Effects on M-response's Parameters of Skeletal Muscle of White Rats. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2013; 99 (9): 1067-76. (In Russian)

27. Charbit M., Blazy I., Gogusev J. Nitric oxide and the renin angiotensin system: contributions to blood pressure in the young rat. *Pediatric Nephrology*. 1997; 11(5): 617-22.

28. Riso E.M., Ahtikoski A., Alev K., Kaasik P., Pehme A., Seene T. Relationship between extracellular matrix, contractile apparatus, muscle mass and strength in case of glucocorticoid myopathy. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2008; 108: 117-20.

29. Bowes S.B., Jackson N.C., Papachristodoulou D. Effect of corticosterone on protein degradation in isolated rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *Journal Of Endocrinology*. 1996; 3: 501-7.

30. Weinstein S.P., Paquin T., Pritsker A. Dexamethasone inhibits the activation of glucose transport in rat skeletal muscle by both insulin and non-insulin-related stimuli. *Diabetes*. 1995; 4: 441-5.

31. Martens M.E., Peterson P.L., Lee C.P. In vitro effects of glucocorticoid on mitochondrial energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991; 2: 152-60.

32. Trush V.V., Sobolev V.I. Influence of iatrogenic hypercorticoidism induced by long-term application of dexa-

methasone on power of muscular contraction of white rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60 (4): 39-46. (In Russian)

33. Parakhonskii A.P. The role of neuronal NO synthase in heart diseases. *Modern high technologies*. 2010; 9: 208.

34. McAllister R.M., Newcomer Sean C., Laughlin M.H. Vascular nitric oxide: effects of exercise training in animals. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2008; 33 (1): 173-8. doi: 10.1139/H07-146.

35. Bescos R., Gonzalez-Haro C., Pujol P. Effects of dietary L-arginine intake on cardiorespiratory and metabolic adaptation in athletes. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2009; 19(4): 355-65.

36. Evangelista A.M., Rao A.M., Evangelista V.S., Filo A.R. Direct regulation of striated muscle myosins by nitric oxide and endogenous nitrosothiols. *PLoS One*. 2010; 18 (5(6)): e11209. doi: 10.1371/journal.pone.0011209.

37. Bryan N.S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Frontiers in Bioscience*. 2009; 14: 1-18.

38. Kharlamov D.A., Krapivkin A.I., Sukhorukov V.S., Kuftina L.A., Groznova O.S. Neurological disorders system lesion in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS syndrome). *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii*. 2012; 4(2): 44-50. (In Russian)

39. Litvyakov A.M., Sergievich A.V. Arginine-dependent mechanisms in the atherosclerosis pathogenesis. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi*. 2013; 1: 103-12. (In Russian)

40. Badalyan L.O., Faustov V.S., Temin P.A. Change of contents of cyclic AMP in a muscle at an experimental dexamethasone myopathy. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1980; 12: 669-70. (in Russian)

### Сведения об авторах:

Труш Вера Владимировна, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. физиологии человека и животных Донецкого национального университета (г. Донецк), e-mail: ver.trush@yandex.ru;

Соболев Валерий Иванович, доктор биол. наук, проф., каф. здоровья и реабилитации Института педагогики, психологии и инклюзивного образования Гуманитарно-педагогической академии Крымского федерального университета (г. Ялта), Россия, e-mail: v.sobolev@mail.ru;

Попов Максим Николаевич, канд. педагогич. наук, доцент, зав. каф. здоровья и реабилитации Института педагогики, психологии и инклюзивного образования Гуманитарно-педагогической академии Крымского федерального университета (г. Ялта), Россия, e-mail: maks.porov@mail.ru

Кашутин С.Л., Вилова К.Г., Шагров Л.Л., Шерстенникова А.К.,  
Неклюдова В.С., Теддер Е.И., Утюгова В.Н.

## Морфофункциональная характеристика моноцитов, мигрировавших в кожу

ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет», 163000, г. Архангельск, Россия, пр. Троицкий, д. 51

Моноциты по своей функциональной активности дифференцируются в «провоспалительные», макрофаги заживающих ран и регуляторные макрофаги. Различия в функциональной активности макрофагов опосредуются действием активационного сигнала. Естественно полагать, что изменения рецепторного аппарата макрофагов, влечет изменения и в морфологическом плане, как со стороны ядра, так и цитоплазмы. **Цель исследования** — изучение морфофункциональной характеристики моноцитов, мигрировавших из микроциркуляции. **Методика.** Морфофункциональную характеристику моноцитов, мигрировавших из микроциркуляции, изучали на модели угревой болезни. Использовано содержимое пустул 68 пациентов с папуло-пустулезной формой угревой болезни. Взятие материала осуществляли петлей Унна и наносили его на предметное стекло. Препарат фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Микроскопию проводили под увеличением  $\times 1000$ . **Результаты.** Показано, что к месту воспаления мигрируют в основном собственно моноциты с азурофильной зернистостью и признаками вакуолизации цитоплазмы и ядра. Наибольшую фагоцитарную активность проявляли промоноциты. **Заключение.** На модели угревой болезни показана неоднородность популяции и различия морфофункциональных характеристик моноцитов, мигрировавших в очаг воспаления.

**Ключевые слова:** моноциты, макрофаги, азурофильная зернистость, вакуолизация цитоплазмы, фагоцитарная активность.

**Для цитирования:** Кашутин С.Л., Вилова К.Г., Шагров Л.Л., Шерстенникова А.К., Неклюдова В.С., Теддер Е.И., Утюгова В.Н. Морфофункциональная характеристика моноцитов, мигрировавших в кожу. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 130—135.

DOI:

**Для корреспонденции:** Шагров Леонид Леонидович, мл. науч. сотр. ЦНИЛ ГБОУ ВО СГМУ, e-mail: leonidshagrov@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.01.2017

Kashutin S.L., Vilova K.G., Shagrov L.L., Sherstennikova A.K.,  
Neklyudova V.S., Tedder E.I., Utyugova V.N.

## Morphofunctional characteristics of monocytes migration into the skin

Northern State Medical University, Troitskiy Pr. 51, 163000, Arkhangelsk, Russia

Macrophages are known to either stimulate or reduce inflammation and participate in either destruction or reparative regeneration of tissues. Therefore, based on the monocyte functional activity, they can be grouped into three categories — «proinflammatory», wound-healing, and regulatory macrophages. Differences in the macrophage functional activity are determined by the activation signal. Presumably, changes in the macrophage receptor apparatus are associated with morphological changes in the nucleus and the cytoplasm. Therefore, **the aim** of the study was to assess morphofunctional characteristics of monocytes after their migration from microvasculature into the tissue. **Methods.** Morphofunctional characteristics of monocytes were studied on an acne model after the monocyte migration from microvasculature into the skin. The content of pustule collected from 68 patients with papulopustular acne was examined. The material was collected with the Unna's loop, fixed on a glass slide, stained according to Romanovsky-Giemsa, and examined under a microscope at  $\times 1,000$  magnification. **Results.** Most of the recruited dermal monocytes migrating to the site of tissue inflammation were genuine monocytes with typical azurophilic granules and vacuolation of the cytoplasm followed by nuclear vacuolation. The greatest phagocytic activity was observed in promonocytes.

**Keywords:** monocytes, macrophages, azurophilic granules, cytoplasmic vacuolation, phagocytic activity.

**For citation:** Kashutin S.L., Vilova K.G., Shagrov L.L., Sherstennikova A.K., Neklyudova V.S., Tedder E.I., Utyugova V.N. Morphofunctional characteristics of monocytes migration into the skin. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 130—135. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Shagrov L.L., junior research assistant, CSRL of NSMU, e-mail leonidshagrov@mail.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Shagrov L.L., <http://orcid.org/0000-0003-2655-9649>

**Received** 30.01.2017

## Введение

Общеизвестно, что система мононуклеарных фагоцитов включает в себя кроветворные клетки-предшественники моноцитов-макрофагов костного мозга, монобласты и промоноциты, а также зрелые клетки — моноциты и макрофаги [1—3, 5].

Макрофаги либо стимулируют, либо подавляют воспаление, участвуют в разрушении ткани либо в репаративной регенерации. В связи с этим моноциты по своей функциональной активности дифференцируют на «провоспалительные», макрофаги заживающих ран, и регуляторные макрофаги [6, 7]. Различия в функциональной активности макрофагов является результатом действия активационного сигнала. Так, основными индукторами образования «провоспалительных» макрофагов являются IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , стимулирующие микробицидную и противоопухолевую активность макрофагов, а также секрецию ими высоких уровней провоспалительных цитокинов и медиаторов, супероксид-анионов, радикалов кислорода и азота [6, 8—10]. Основным индуктором макрофагов заживающих ран является IL-4, стимулирующий в макрофагах активность аргиназы, тем самым запускается конвертация аргинина в орнитин — предшественник полиаминов и коллагена, составляющих собственно соединительную ткань [7, 11]. В ответ на иммунные комплексы, простагландины, глюкокортикоиды, апоптотические клетки и IL-10 формируются регуляторные макрофаги, основная функция которых состоит в ослаблении иммунного ответа и ограничении воспалительного процесса [4, 12].

Естественно полагать, что изменение рецепторного аппарата макрофагов влечет изменения и в морфологическом плане со стороны как ядра, так и цитоплазмы. Предложен чрезвычайно простой способ дифференцировки моноцитов по характеру ядра [13]. В соответствии с данной классификацией промоноцит имеет округлое ядро, собственно моноцит — бобовидное, макрофаг — многолопастную, полигональную форму (рис. 1). Если в периферической крови сведения относительно концентрации промоноцитов,

моноцитов и макрофагов имеются, то после миграции в ткани этих данных практически нет [14]. Нет данных и в отношении частоты регистрации моноцитов с изменениями ядра и цитоплазмы, в частности, наличия вакуолизации ядра и цитоплазмы, азурофильной зернистости (рис. 1), а также проявление ими фагоцитарной активности. *Цель исследования* — изучение морфофункциональной характеристики моноцитов, мигрировавших из микроциркуляции в кожу.

## Методика

Морфофункциональную характеристику моноцитов, мигрировавших из микроциркуляции в кожу, изучали при угревой болезни. Выбор данной модели обусловлен наличием в экссудате пустул не только нейтрофилов, но и моноцитов, базофилов и лимфоцитов, что является отличительной особенностью от острых пиодермий, при которых в пустулах в 95—98% случаев наблюдаются только нейтрофилы.

Для изучения морфофункциональных характеристик моноцитов, мигрировавших в кожу, использовали содержимое пустул 68 пациентов с папуло-пустулезной формой угревой болезни. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена этической комиссией университета.

Взятие материала и нанесение на предметное стекло проводили посредством петли Унна, препарат фиксировали, окрашивали по Романовскому-Гимзе, микроскопию проводили под увеличением  $\times 1000$ .

Морфологическая оценка моноцитов включала определение удельного веса промоноцитов, собственно моноцитов и полиморфноядерных моноцитов в соответствии с методикой, предложенной О.П. Григоровой [13]. Изучение изменений в ядре моноцитов включало определение вакуолизации, в цитоплазме — вакуолизации и зернистости (рис. 1) [15].

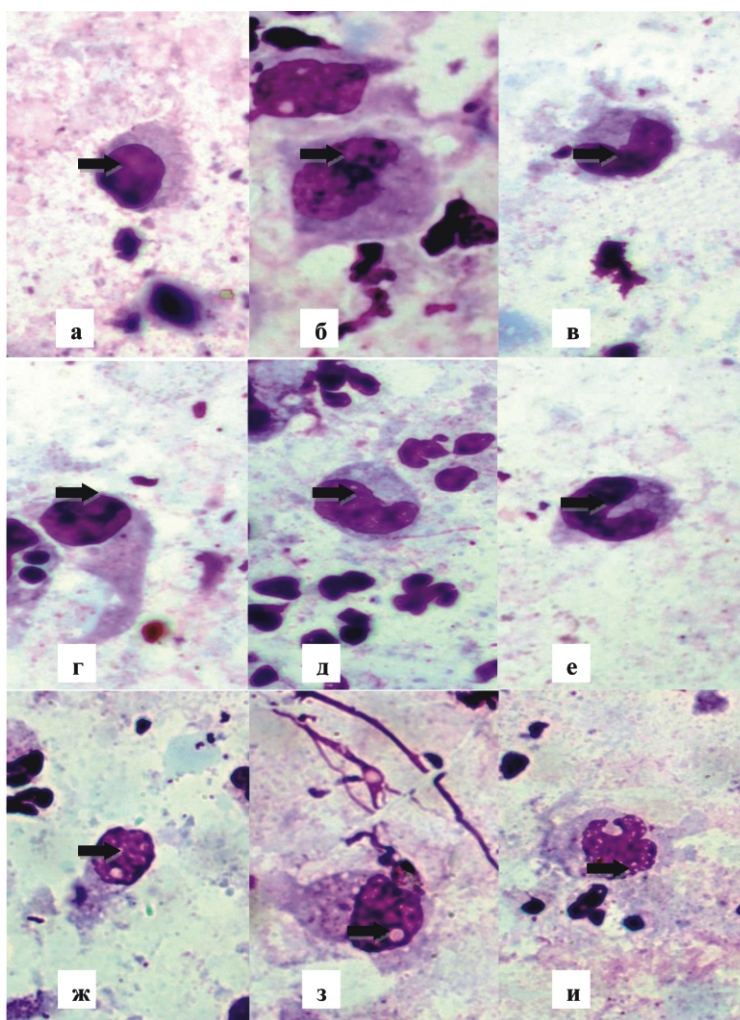
Для оценки фагоцитарной активности моноцитов использовали монодисперсный латекс диаметром 1,3—1,5 мкм. В пробирку с 0,5 мл физиологического раствора вносили содержимое пустилы, инкубировали в термостате при температуре 37,0—37,2°С в присутствии частиц латекса в течение 30 мин, затем взвесь наносили на предметное стекло, высушивали, фиксировали и окрашивали гематоксилин-эозином. Подсчет активных мононуклеарных фагоцитов (в %) и фагоцитарного показателя проводили под увеличением  $\times 1000$  с учетом дифференцировки моноцитов, предложенной О.П. Григоровой [13].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью сертифицированного пакета статистических программ SPSS 13.0 for Windows. Распреде-

ние параметров не было нормальным, в связи с чем описание выборок проводили с помощью подсчета медианы (Me) и межквартильного интервала Q1;Q3 (25;75 перцентиль). Вероятность различий оценивали непараметрическим критерием Вилкоксона.

### Результаты и обсуждение

Структура моноцитогаммы после миграции моноцитов в кожу характеризовалась преобладанием собственно моноцитов (56,0% [51,0; 59,7]), тогда как количество промоноцитов и полиморфноядерных моноцитов было значительно меньше: 25,0% [16,0; 34,7];  $W = -6,94$ ;  $p = 0,001$  и 16,0% [10,0; 28,0];  $W = -7,16$ ;  $p = 0,001$  соответственно (таблица).



**Рис. 1.** Морфологические изменения ядра и цитоплазмы (стрелка). а — промоноцит без изменений; б — собственно моноцит без изменений; в — полиморфноядерный моноцит без изменений; г — моноцит с зернистостью цитоплазмы; д — собственно моноцит с вакуолизацией и зернистостью цитоплазмы; е — полиморфноядерный моноцит с вакуолизацией и зернистостью цитоплазмы; ж — промоноцит с вакуолизацией ядра, вакуолизацией и зернистостью цитоплазмы; з — собственно моноцит с вакуолизацией ядра, вакуолизацией и зернистостью цитоплазмы; и — полиморфноядерный моноцит с вакуолизацией ядра, вакуолизацией и зернистостью цитоплазмы. об.90, ок.10.

У 11,0% [7,0; 16,0] моноцитов изменения в ядре и в цитоплазме отсутствовали. Среди них изменения в ядре и цитоплазме отсутствовали у 5,0% [3,0; 8,0] собственно моноцитов, тогда как среди полиморфноядерных моноцитов лишь 1,0% [0; 3,0]; против;  $W = -6,87$ ;  $p = 0,001$ ).

Вакуолизация только ядра, или только цитоплазмы наблюдалась в среднем у 41,5% [34,0; 48,0] моноцитов, причем чаще всего регистрировалась вакуолизация цитоплазмы (30,0% [22,0; 42,5] против 8,0% [4,0; 13,0];  $W = -6,47$ ;  $p = 0,0001$ ), которая в основном наблюдалась среди собственно моноцитов — 16,5% [11,0; 24,75] и значительно реже среди промоноцитов (против 9,0% [5,25; 15,0];  $W = -4,82$ ;  $p = 0,001$ ) и, особенно, у полиморфноядерных моноцитов (против 4,0% [2,0; 7,0];  $W = -7,17$ ;  $p = 0,001$ ). Вакуолизацию ядра регистрировали у 4,0% [2,0; 7,0] собственно моноцитов и реже среди промоноцитов 2,0% [1,0; 4,0];  $W = -4,8$ ;  $p = 0,001$  и полиморфноядерных моноцитов 1,0% [0; 4,0];  $W = -4,85$ ;  $p = 0,001$ .

Сочетанные изменения в ядре и в цитоплазме выявлены у 48,5% [39,25; 55,5] моноцитов, причем чаще всего вакуолизация ядра сопровождалась вакуолизацией цитоплазмы в сочетании с азурофильной зернистостью (34,5% [26,25; 40,0], тогда как вакуолизация ядра

с вакуолизацией цитоплазмы без азурофильной зернистости была отмечена только у 10,0% [6,0; 19,0];  $W = -6,81$ ;  $p = 0,0001$ ). Указанные изменения в основном регистрировались среди собственно моноцитов.

Способность к фагоцитарной активности моноцитов, мигрировавших в кожу, наблюдалась у 74,0% [66,75; 82,5], причем в большей степени у промоноцитов — 37,5% [34,0; 53,75], чем у собственно моноцитов — 29,0% [20,75; 32,25];  $W = -2,98$ ;  $p = 0,003$  и полиморфноядерных моноцитов — 14,5% [10,75; 23,0];  $W = -3,05$ ;  $p = 0,002$ . Более высокая фагоцитарная активность у промоноцитов сопровождалась сравнительно высоким фагоцитарным показателем — 4,74 [4,05; 6,11], по сравнению с моноцитами — 3,87 [3,22; 5,82];  $W = -1,59$ ;  $p = 0,11$  и полиморфноядерными моноцитами — 3,42 [2,87; 4,66];  $W = -2,63$ ;  $p = 0,008$ . Не проявляли фагоцитарную активность 11,0% [8,0; 14,0];  $W = -3,92$ ;  $p = 0,0001$  (рис. 2).

Итак, к месту воспаления мигрируют в основном собственно моноциты — 56%, реже промоноциты — 25,0% и полиморфноядерные моноциты — 16,5%. После миграции в кожу только 11,0% моноцитов не имели изменений в ядре и цитоплазме, причем в основном это собственно моноциты.

Таблица

Содержание промоноцитов, собственно моноцитов и полиморфноядерных моноцитов, мигрировавших в кожу, в зависимости от изменений ядра и цитоплазмы (Me (%) (Q25Q75))

Признаки	Средние данные	Промоноциты	Собственно моноциты	Полиморфноядерные моноциты	Вероятность
Средние данные		25,0 (16,0;34,75)	56,0 (51,0;59,75)	16,5 (10,0;28,0)	3-4 $W = -6,94$ ; $p = 0,001$ 3-5 $W = -2,68$ ; $p = 0,007$ 4-5 $W = -7,16$ ; $p = 0,001$
Без изменений в ядре и цитоплазме	11,0 (7,0;16,0)	4,0 (2,0;6,5)	5,0 (3,0;8,0)	1,0 (0;3,0)	3-4 $W = -2,79$ ; $p = 0,005$ 3-5 $W = -5,93$ ; $p = 0,001$ 4-5 $W = -6,87$ ; $p = 0,001$
<b>Вакуолизация в ядре или в цитоплазме</b>	<b>41,5 (34,0;48,0)</b>	<b>10,5 (7,0;17,0)</b>	<b>22,0 (18,0;28,0)</b>	<b>5,0 (3,0;10,0)</b>	<b>3-4 <math>W = -6,46</math>; <math>p = 0,001</math></b> <b>3-5 <math>W = -0,17</math>; <math>p = 0,86</math></b> <b>4-5 <math>W = -6,36</math>; <math>p = 0,001</math></b>
в т.ч. вакуолизация ядра	8,0 (4,0;13,0)	2,0 (1,0;4,0)	4,0 (2,0;7,0)	1,0 (0;4,0)	3-4 $W = -4,81$ ; $p = 0,001$ 3-5 $W = -0,87$ ; $p = 0,38$ 4-5 $W = -4,85$ ; $p = 0,001$
в т.ч. вакуолизация цитоплазмы	30,0 (22,0;42,5)	9,0 (5,25;15,0)	16,5 (11,0;24,75)	4,0 (2,0;7,0)	3-4 $W = -4,82$ ; $p = 0,001$ 3-5 $W = -4,10$ ; $p = 0,001$ 4-5 $W = -7,17$ ; $p = 0,001$
<b>Сочетанные изменения в ядре и в цитоплазме</b>	<b>48,5 (39,25;55,5)</b>	<b>9,0 (5,0;13,0)</b>	<b>28,0 (21,0;33,0)</b>	<b>8,0 (4,25;13,0)</b>	<b>3-4 <math>W = -7,07</math>; <math>p = 0,001</math></b> <b>3-5 <math>W = -0,08</math>; <math>p = 0,93</math></b> <b>4-5 <math>W = -7,00</math>; <math>p = 0,001</math></b>
в т.ч. вакуолизация ядра и цитоплазмы	10,0 (6,0;19,0)	2,0 (0,0;4,0)	7,0 (3,0;11,0)	2,0 (1,0;4,0)	3-4 $W = -6,39$ ; $p = 0,001$ 3-5 $W = -0,17$ ; $p = 0,86$ 4-5 $W = -6,29$ ; $p = 0,001$
в т.ч. вакуолизация ядра и вакуолизация и зернистость цитоплазмы	34,5 (26,25;40,0)	6,0 (3,0;10,0)	20,0 (15,0;25,0)	6,0 (3,0;9,0)	3-4 $W = -6,93$ ; $p = 0,001$ 3-5 $W = -0,14$ ; $p = 0,88$ 4-5 $W = -6,90$ ; $p = 0,001$

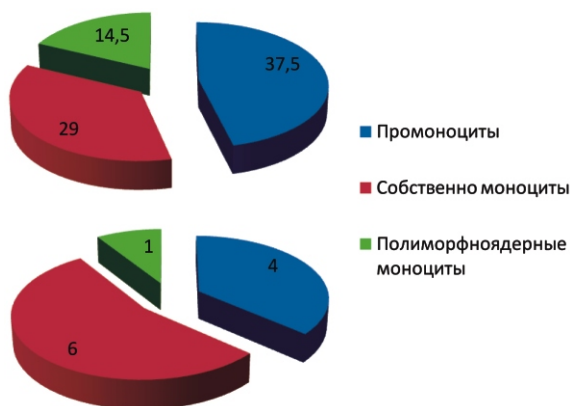


Рис. 2. Моноциты экссудата пустулы без признаков фагоцитарной активности и после поглощения гранул латекса (%).

Известно, что вакуолизация цитоплазмы свидетельствует об активации гидролитических ферментов лизосом необходимых для эффективного киллинга возбудителей в анаэробных условиях в отсутствии респираторного взрыва, а вакуолизация ядра — является одним из этапов гибели клетки [12]. В соответствии с полученными результатами можно предполагать, что 30% моноцитов участвует в киллинге, 10% моноцитов элиминируются, участвуя в киллинге, и 8% моноцитов элиминируются из очага воспаления, не участвуя в киллинге.

В очаге воспаления выявляется 34,5% моноцитов, которые наряду с вакуолизацией ядра и цитоплазмы имеют азурофильную зернистость. Известно, что в составе азурофильных гранул имеются лизоцим, миелопероксидаза, эластаза, катепсины, что позволяет участвовать моноцитам в повреждении клеточной стенки бактерий, респираторном взрыве, гидролизе эластина, протеогликанов и коллагена [15, 16]. В свою очередь, активированный моноцит утрачивает свои гранулы путем слияния мембран гранул с мембраной вакуолей или наружной мембраной клетки. В этом случае содержимое гранул выливается либо в вакуоль, либо в окооклеточное пространство. Учитывая, что у данных 34,5% моноцитов указанные изменения в цитоплазме сопровождаются вакуолизацией ядра, создается впечатление, что эти активированные моноциты также могут элиминироваться из очага воспаления.

Особенностью промоноцитов, в отличие от собственно моноцитов и полиморфноядерных моноцитов, является способность к пролиферации [17]. В соответствии с полученными результатами, 25% промоноцитов мигрируют в очаг воспаления, при этом из них 9% участвует в киллинге, 2% могут элиминироваться, участвуя в киллинге, и еще 2% могут элиминироваться из очага воспаления, в киллинге не участвуя. Концентрация промоноцитов, содержащих азурофильные гранулы, дости-

гала всего 6%. Именно промоноциты обладали наибольшей фагоцитарной активностью в отличие от собственно моноцитов и полиморфноядерных моноцитов.

Собственно моноциты наиболее активно мигрируют в очаг воспаления, поскольку их удельный вес максимален и составил 56,0%. Учитывая полученные данные, можно считать, что при этом из них 16,5% участвует в киллинге, 7% могут элиминироваться, участвуя в киллинге и еще 4% элиминируются из очага воспаления в киллинге не участвуя. Концентрация собственно моноцитов, содержащих азурофильные гранулы достигала 20%.

Полиморфноядерные моноциты, идентифицируемые как макрофаги, в меньшей степени представлены в очаге воспаления — в 16,5%. Они гораздо реже имеют вакуолизацию цитоплазмы и ядра, а также азурофильные гранулы.

Таким образом, к месту воспаления мигрируют в основном собственно моноциты с изменениями в цитоплазме в виде вакуолизации и азурофильной зернистости, а также вакуолизацией ядра. Наибольшую фагоцитарную активность проявляют промоноциты.

### Литература

(п.п. 6—11; 15—17 см. References)

1. Маянский Д.Н. *Клетка Купфера и система мононуклеарных фагоцитов*. Новосибирск; Наука; 1981.
2. Осипенко А.В., Черешнев В.А. *Имунобиологические механизмы регенерации тканей*. Екатеринбург; УрО-РАН; 1997.
3. Годоров Й.Т. *Клинические лабораторные исследования в педиатрии*. София; 1968.
4. Матвеева В.Г., Григорьев Е.В. Проблемы и перспективы изучения субпопуляций моноцитов крови в патогенезе заболеваний, связанных с воспалением. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 4: 154-9.
5. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. *Клетки иммунной системы*. СПб.; Наука; 2001: 202-308.
6. Фаллер Дж.М. *Молекулярная биология клетки*. М.; БИНОМ; 2003.
7. Григорова О.П. Лимфоцитарная реакция как показатель реактивности организма в динамике инфекционного процесса. *Вопросы охраны материнства и детства*, 1963; 10: 39-41.
8. Кассирский Н.А. *Клиническая гематология*. М.; Медицина; 1970.

### References

1. Mayanskiy D.N. *Kupffer cell and the mononuclear phagocytic system*. [Kletka Kupfera i sistema mononuklearykh fagotsitov]. Novosibirsk; Nauka, 1981. (in Russian)
2. Osipenko A.V., Chereshev V.A. *Immunological mechanisms of tissue regeneration*. [Immunobiologicheskie mekhanizmy regeneratsii tkaney]. Ekaterinburg; UrORAN; 1997. (in Russian)

3. Todorov J.T. *Clinical laboratory studies in pediatric patients. [Klinicheskie laboratornye issledovaniya v pediatrii]*. Sofia; 1968. (in Russian)
4. Matveeva V.G., Grigor'ev E.V. Problems and the prospects of studying of subpopulations of monocytes of blood in pathogenesis of the diseases connected with an inflammation. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; 4: 154-9. (in Russian)
5. Freydlin I.S., Totolyan A.A. *Immune system cells. [Kletki immunnoy sistemy]*. Saint Petersburg; Nauka, 2001; 202-308. (in Russian)
6. O'Shea J.J. *Cytokine signaling modules in inflammatory responses*. *Immunity*, 2011; 28(4): 477-87.
7. Stein M., Keshav S., Harris N., S. *Gordon Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. *J. Exp. Med.*, 1992; 176(1): 287-92.
8. Dale D.C. *The phagocytes: neutrophils and monocytes* *Blood*, 2008; 112(4): 935-45.
9. Loke P. *Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection*. *J. Immunol.* 2007; 179(6): 3926-36.
10. Sternberg E.M. *Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens*. *Nature Rev. Immunol.* 2006; 6(4): 318-28.
11. Streetz K.L., Luedde T., Manns M.P.C. *Trautwein Interleukin 6 and liver regeneration*. *Gut*, 2000; 47(2): 309-12.
12. Faller Dzh.M. *Molecular biology of the cell. [Molekulyarnaya biologiya kletki]*. Moscow; BINOM; 2003. (in Russian)
13. Grigorova O.P. *Lymphocytic reaction as a reactivity indicator of organism in dynamics of infectious process*. *Vo-prosy okhrany materinstva i detstva* 1963; 10: 39-41. (in Russian)
14. Kassirskiy N.A. *Clinical Hematology. [Klinicheskaya gematologiya]*. Moscow; Meditsina; 1970. (in Russian)
15. Fink M.E., Finch S.C. *Serum muramidase and granulocyte turnover*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968; 127(2): 365-7.
16. Klebanoff S.J. *Myeloperoxidase: Friend and foe*. *J. Leuc. Biol.* 2005; 77: 598-62.
17. Meuret G., Bammert J., Hoffmann G. *Kinetics of Human Monocytopoiesis*. *Blood*, 1974; 44(6): 801-16.

#### Сведения об авторах:

Кашутин Сергей Леонидович, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. кожных и венерических болезней Северного государственного медицинского университета (Архангельск), e-mail: sergeycash@yandex.ru;

Вилова Ксения Геннадьевна, ассистент каф. кожных, венерических болезней и фтизиопульмонологии Северного государственного медицинского университета (Архангельск);

Шагров Леонид Леонидович, мл. науч. сотр. ЦНИЛ Северного государственного медицинского университета (Архангельск), e-mail: leonidshagrov@mail.ru;

Шерстенникова Александра Константиновна, канд. мед. наук, доцент каф. нормальной физиологии Северного государственного медицинского университета (Архангельск);

Неклюдова Виктория Сергеевна, ассистент каф. кожных, венерических болезней и фтизиопульмонологии Северного государственного медицинского университета (Архангельск);

Теддер Елена Игоревна, ассистент каф. кожных, венерических болезней и фтизиопульмонологии Северного государственного медицинского университета (Архангельск);

Утюгова Вера Николаевна, канд. мед. наук, доцент каф. семейной медицины и внутренних болезней Северного государственного медицинского университета (Архангельск).

Каграманова Ж.А.<sup>1</sup>, Ланцакова П.Е.<sup>1</sup>, Малиновская В.В.<sup>2</sup>, Свистунов А.А.<sup>1</sup>, Выжлова Е.Н.<sup>2</sup>

## Влияние факторов риска на патогенез анэмбрионии в раннем сроке беременности

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

<sup>2</sup> ФГБУ «НИЦ ЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва, Россия, ул. Гамалеи, д. 18

**Цель.** Изучить влияние различных факторов риска на звенья патогенеза неразвивающейся беременности по типу анэмбрионии I типа на ранних сроках. **Методика.** Обследовано и пролечено 85 беременных женщин в возрасте от 18 до 40 лет с диагнозом *неразвивающаяся беременность* (НБ) малого срока. Диагноз НБ по типу анэмбрионии (АНЭ) был установлен на основании ультразвукового исследования органов малого таза трансвагинальным датчиком частотой 4—5 мГц, с измерением размеров матки, яичников, желтого тела, среднего внутреннего диаметра плодного яйца и отсутствия визуализации эмбриона. Анализировали данные анамнеза, распределение беременных по возрасту, проводили стандартное клинико-лабораторное обследование, включая анализ крови на  $\beta$ -ХГЧ, группу и резус-фактор крови. Для выявления анеуплоидий проводили молекулярно-генетическое исследование хориальной ткани у 42 женщин с НБ. Проведена статистическая обработка данных (фильтрация, определение частоты встречаемости, сортировка, построение зависимостей (гистограмм) путем скользящего усреднения, вычисление коэффициентов корреляции и т.д.). Обработку регистрируемых в базе данных показателей проводили с использованием программы Excel MS Office. **Результаты.** Установлено, что распределение доли пациенток с АНЭ, в зависимости от возраста, имеет 2 пика. Первый максимум выявления АНЭ приходится на возраст 24—25 лет у первобеременных женщин, второй — на возраст 30—31 год, как у первобеременных, так и у повторнобеременных. Доля первобеременных и пациенток с привычным невынашиванием при АНЭ меньше, чем при НБ в целом. По результатам УЗИ выявлены различные сроки развития плодного яйца (ПЯ). При этом «условно» размер ПЯ по среднему внутреннему диаметру (СВД) на момент установления диагноза АНЭ составил в среднем 18,3 мм (при норме около 31,5 мм). Срок развития плодного яйца при АНЭ меньше, чем при НБ в целом, у основной доли пациенток срок был в пределах от 21 до 35 сут. Средний уровень  $\beta$ -ХГЧ на 8-й—9-й нед. беременности при АНЭ был в 5—6 раз ниже нормы. При статистической обработке данных пациенток с АНЭ не было выявлено корреляционных связей между уровнем  $\beta$ -ХГЧ и размерами ПЯ, сроком остановки развития ПЯ и длительностью его нахождения в полости матки до установления диагноза НБ. При абсолютно низком уровне  $\beta$ -ХГЧ, длительность нахождения ПЯ в полости матки после замирания составляла 4 нед., при умеренно низкой секреции  $\beta$ -ХГЧ, задержка ПЯ в полости матки было больше и  $\beta$ -ХГЧ продолжал титроваться в крови по сравнению с пациентками без приема прогестерона. Период нахождения ПЯ в полости матки после замирания был в пределах от 1 до 14 сут., максимальная длительность — от 3 до 4 нед. у пациенток в возрасте до 25 лет и старше 35 лет. Наряду с хромосомными нарушениями (40%) значимыми факторами риска в патогенезе АНЭ являются перенесенные гинекологические (63%) и вирусные заболевания (40%). Статистический анализ свидетельствует о сложности корреляционных связей: корреляционная связь между размерами ПЯ по СВД и длиной матки обнаруживалась как у пациенток, принимавших, так и не принимавших прогестерон, однако эта связь была сильнее у пациенток его принимавших. Сроки развития ПЯ по СВД, период нахождения в полости матки после замирания, размеры матки и уровни  $\beta$ -ХГЧ были различны при разных сроках беременности до начала проявления признаков АНЭ. Результаты свидетельствуют о сложности корреляционных связей указанных показателей у пациенток при наличии кровянистых выделений и при их отсутствии. **Заключение.** Раннее ультразвуковое исследование (8 нед.) беременности позволяет своевременно выявить АНЭ, ускорить начало лечения и повысить его качество. Эффективность развития беременности на фоне приема прогестерона при формировании АНЭ отсутствует.

**Ключевые слова:** неразвивающаяся беременность, анэмбриония, патогенез, факторы риска, репродуктивно-значимые инфекции,  $\beta$ -ХГЧ.

**Для цитирования:** Каграманова Ж.А., Ланцакова П.Е., Малиновская В.В., Свистунов А.А., Выжлова Е.Н. Влияние факторов риска на патогенез анэмбрионии на раннем сроке беременности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 136—149.

DOI:

**Для корреспонденции:** Каграманова Жанна Арутюновна, доктор мед. наук, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: zhannakagramanova@rambler.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность д.физ.-мат. наук, проф. Е.И. Пальцеву.

**Поступила** 10.04.2018



Kagramanova Zh.A.<sup>1</sup>, Lanshchakova P.E.<sup>1</sup>, Malinovskaya V.V.<sup>2</sup>, Svistunov A.A.<sup>1</sup>, Vjzhlova E.N.<sup>2</sup>

## Effect of risk factors on pathogenesis of anembryonia in early pregnancy loss

<sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8/2, Moscow 119991, Russia<sup>2</sup> N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Gamaleyi Str. 18, Moscow 123098, Russia

**Aim.** To study effects of different risk factors on pathogenesis of non-developing pregnancy (NP) of type I anembryonic gestation (empty sac, ES) during early pregnancy loss (EPL). **Methods.** 83 women with early NP aged 18—40 were evaluated. NP of type I anembryonic gestation was diagnosed based on measurements of the uterus, ovaries, mean internal diameter of the gestational sac (GS), and the absence of embryo visualization using transvaginal ultrasound at 4—5 MHz. Historical data and age distribution of pregnant women were analyzed; standard clinical laboratory examination was performed, including blood tests for  $\beta$ -human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -HCG), blood group, and Rh-factor. Aneuploidy was identified by molecular genetic study of choroidal tissue in 42 women with NP. Statistical treatment included filtration, determination of incidence, sorting, construction of relationships (histograms) by moving averaging, computing correlation coefficients, etc. The values registered in the database of indexes were treated using the Excel MS Office software. **Results.** The distribution of women with ES in relation to the age had two peaks. The first peak of ES detection occurred at the age of 24—25 in primigravids and the second peak occurred at the age of 30—31 both with first and repeated pregnancies. Ultrasound examination identified different periods of GS development. The proportion of primigravids and patients with recurrent miscarriage with ES was lower than with EPL in general. A «conventional» mean internal diameter (MID) of GS at the time of ES diagnosis was 18.3 mm (vs. normal size of approximately 31.5 mm). The period of GS development was shorter in ES than in NP in general; in the majority of patients, it lasted 21 to 35 days. The distribution of gestation duration, similar to the duration of gestational sac development, has two peaks of frequency. The mean level of  $\beta$ -HCG was 80—85% below the normal level. In ES, there was no correlation between  $\beta$ -HCG level, GS size, the gestational age when the GS development stopped, and the duration of the dead GS stay in the uterus prior to NP detection. At the lowest  $\beta$ -HCG level, the duration of GS stay in the uterus after embryo death was up to 4 weeks; when the  $\beta$ -HCG secretion was moderately low, the GS delay in the uterus was shorter (not more than 14 days). When progesterone was administered the duration of dead GS stay in the uterus was longer, and the blood level of  $\beta$ -HCG was still detectable compared to patients not receiving progesterone. The duration of GS stay in the uterus after the embryo death was 1 to 14 days; the maximum duration was 3—4 weeks for patients younger than 25 and older than 35. Along with chromosomal disorders (40%), significant risk factors in the ES pathogenesis was a history of gynecological (63%) and viral (40%) infections. The statistical analysis indicated a complexity of correlations; correlations of GS MID with the uterus length were observed both in patients treated and not treated with progesterone; however, this correlation was stronger for progesterone-treated patients. The time of ES growth (by MID), duration of ES stay in the uterine cavity after ES death, and  $\beta$ -HCG levels were different with different duration of gestation before the appearance of ES first signs. Correlations of these indexes were complicated for patients with and without blood spotting. **Conclusion.** Early ultrasound examination at week 8 of pregnancy allows identifying ES in time to expedite therapy and improve its quality. The progesterone treatment did not improve the pregnancy development in ES.

**Keywords:** early pregnancy loss, empty sac, pathogenesis, risk factors, infections significant for reproduction,  $\beta$ -HCG.

**For citation:** Kagramanova Zh.A., Lanshchakova P.E., Malinovskaya V.V., Svistunov A.A., Vjzhlova E.N. Risk factors impact on pathogenesis of empty sac in early pregnancy loss. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2018; 62(4): 136—149.

**DOI:**

**For correspondence:** Zhanna Kagramanova, MD, leading researcher of the Department of Science Research Center of the I.M. Sechenov First MSMU (Sechenov University) Address: 8/2 Trubetskaya Str., Moscow, 119991, e-mail: zhannakagramanova@rambler.ru

**Conflicts of interest.** The authors have no conflicts of interest relevant to this paper.

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Acknowledgment.** The authors would like to thank prof. Mr. E.I. Paltsev.

### Information about authors:

Kagramanova J.A., <http://orcid.org./0000-0003-3701-1144>

Lanshchakova P.E., <http://orcid.org./0000-0001-5485-1167>

Malinovskaya V.V., <http://orcid.org./0000-0003-1856-8924>

Svistunov A.A., <http://orcid.org./0000-0003-1592-5703>

Vjzhlova E.N., <http://orcid.org./0000-0001-3054-8694>

**Received** 10.04.2018

## Введение

Нарушения развития беременности на ранних сроках, в период формирования фетоплацентарной системы, закладки органов и тканей, экстраэмбриональных структур и провизорных органов, определяет течение и исход беременности [1]. Особое внимание исследователей привлекает изучение эмбрионального периода, который длится 8 нед. после зачатия. Первый триместр беременности, является одним из самых ответственных периодов развития плодного яйца, в то же время он характеризуется развитием высокой частоты осложнений [2]. Наиболее частым видом патологии первого триместра беременности является неразвивающаяся беременность (НБ) [3]. На долю НБ приходится 45—80% ранних репродуктивных потерь [4]. Общеизвестные этиологические факторы, которые могут привести к НБ, делят на 2 категории. Первая группа факторов — это изменения в среде, в которой созревает эмбрион, включают инфекционные, гормональные, анатомические, эндокринные, генетические, иммунологические нарушения в организме матери [5, 6]. Вторая группа — это эмбриональные дефекты, такие, как хромосомные аномалии, которые приводят к гибели зародыша [7].

Однако даже при тщательном обследовании у 42,6% пар так и не удается установить причины НБ и невынашивания беременности [8]. Отмечено, что при НБ до 70—74% выявляется различная хромосомная патология, представленная анеуплоидиями и полиплоидиями.

Патологические факторы могут повлиять на тонкие механизмы периода дробления зиготы, формирование морулы, образование ранней бластоцисты, фиксации и проникновения ее в маточный эпителий, инвазия вглубь эндометрия, после чего она называется зародышем, который окружен хориальным мешком. Дальнейшее развитие зародыша характеризуется быстрым ростом хориального мешка, первичных ворсин, возникновение вторичных ворсин, развитием желточного мешка и зародышевого диска. Принципиально важным моментом является развитие ветвистого хориона, с дальнейшим ангиогенезом. Факторы, приводящие к нарушению зародышевого периода (до 21 сут. после оплодотворения), приводят к АНН [9, 10].

Следует учитывать, что развитие эмбриона человека даже *in vitro* является труднореализуемым процессом — 50—70% эмбрионов обычно не достигают стадии бластоцисты [11]. Отмечено, что в естественных условиях до 50% оплодотворенных яйцеклеток терпят неудачу. Высокий процент неудач обуславливает низкую скорость репродуктивности человека относительно многих других видов животного мира, что в значительной степени является результатом потери эмбриона в предимплантационной стадии и после им-

плантации [11]. Однако причиной неудач может также оказаться и расстройство внутриутробного естественного отбора, который при нормальном физиологическом течении, слаженности функционирования иммунорегуляторных механизмов сам устраняет патологическое плодное яйцо [11].

По данным литературы [12—14], при среднем внутреннем диаметре (СВД) плодного яйца более 14 мм при ультразвуковом исследовании должен быть визуализирован эмбрион с сердцебиением (при нормальном менструальном цикле матери).

Согласно классификации европейского общества репродукции человека «ESHRE» (Kolte A.M., и соавт., 2015), при АНН (Empty sac) наблюдается отсутствие эмбриона и желточного мешка при внутреннем диаметре плодного яйца больше или равном 25 мм [14].

Имплантация в организме человека происходит примерно на 7-е сут. развития беременности и зависит от уровня стероидных гормонов, таких, как эстрадиол-17 $\beta$  и прогестерон, изменяющих экспрессию цитокинов и факторов роста, которые, в свою очередь, способствуют маточной восприимчивости к бластоцисте [12]. Успешная имплантация эмбриона в эндометрий является результатом идеальной синхронности между бластоцистой, воспринимающего эндометрия и соответствующей связи между ними. Начиная с этого периода развиваются процессы, которые при расстройстве регуляторных систем гестации или распознавания недоброкачественного плодного яйца, приводят к его задержке в полости матки, продлевая срок по существу закончившейся беременности. При расстройстве синхронизации развития экстраэмбриональных структур и наличии структурной несостоятельности эндометрия во время окна имплантации или в течение первых недель гестации при дефиците прогестерона или его рецепторов, резкое снижение эндометриальных белков, гликоделина — мощного иммуносупрессора, необходимого для развития эмбриона возникают нарушения в развитии хориального мешка, недостаточность цитотрофобластической инвазии и анембриония [2, 12, 13].

При гистологическом исследовании можно только заподозрить наличие аномального кариотипа, особенно если по данным УЗИ была диагностирована анембриония. Морфологически стенка хориального мешка содержит ворсины без признаков ангиогенеза в строме.

Тем не менее, для врача клинициста важна оценка результатов морфологического исследования патологического ПЯ и децидуальной ткани для дальнейшего лечения и реабилитации после перенесенной НБ.

Первый случай НБ может быть спорадическим, как полагают некоторые врачи, и поэтому поздно начинают более тщательное обследование и лечение супружеской пары [15—18].

В данной статье приводятся результаты патогенетических особенностей АНІ с учетом влияния различных факторов риска.

**Цель исследования** — оценить влияние факторов риска на звенья патогенеза при анэмбрионии у женщин и определить временные характеристики плодного яйца от зачатия до замирания и длительность нахождения его в полости матки до установления диагноза НБ.

### Методика

**Пациенты и методы.** Было обследовано и пролечено 85 беременных женщин, в возрасте от 18 до 40 лет, которые поступили в гинекологическое отделение УКБ № 4 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) с диагнозом неразвивающаяся беременность малого срока (до 12 нед.). Исследование проводили после получения информированного согласия от пациенток, которые были госпитализированы в стационар на сроках 7—8 и 9—10 нед. Диагноз НБ по типу (АНІ) был установлен на основании ультразвукового исследования органов малого таза трансвагинальным датчиком частотой 4—5 МГц, с измерением размеров матки, яичников, желтого тела, СВД плодного яйца, отсутствия визуализации эмбриона. Регистрировали срок беременности на момент постановки диагноза от 1-го дня последней менструации (LMP), а также рассчитывали условный день начала гестационного периода. Нами были изучены временные характеристики развития ПЯ, от зачатия до замирания и задержки патологического ПЯ в полости матки до выявления НБ. Анализировали данные анамнеза, распределение пациенток по возрасту, проводили стандартное клиничко-лабораторное обследование, включая анализ крови на  $\beta$ -ХГЧ, группу и резус-фактор крови. Молекулярно-генетическое исследование хориальной ткани у 42 женщин с неразвивающейся беременностью, проводили для выявления анеуплоидий по хромосомам: X, Y, 13, 14, 16, 18, 21, 22. Метод исследования: мультилокусная количественная флуоресцентная ПЦР (Amel, DXS6809, DXS6803, DXS8377, SBMA, D13S258, D13S634, D13S742, D18S535, D18S386, D18S391, D21S11, D21S1411, IFNAR, D14S122, D14S127, D14S128, D16S534, D16S476, D16S690, D22S683, D22S691, D22S873) с последующим фрагментным анализом на генетическом анализаторе ABI 3100 [16]. Проведена статистическая обработка (фильтрация, определение частоты встречаемости, сортировка, построение зависимостей (гистограмм) путем скользящего усреднения, вычисление коэффициентов корреляции). Обработку регистрируемых

в базе данных показателей проводили с использованием программы Excel MS Office. Все пациентки были распределены по срокам беременности в днях: 35—41, 42—48, до 77—84. Затем для указанных (отфильтрованных) групп вычисляли средние величины: сроков развития ПЯ, время нахождения ПЯ после замирания в сутках и уровень  $\beta$ -ХГЧ [17]. При анализе данных УЗИ использовали метод разделения промежутков между сроком развития плодного яйца и временем нахождения в полости матки после замирания по сравнению с нормальным течением беременности. На этапе хирургического лечения НБ использовали методику мануальной вакуум-аспирации под контролем видеогистероскопии. Диагноз НБ был подтвержден морфологически.

### Результаты и обсуждение

Распределение пациенток с различными типами неразвивающейся беременности в зависимости от возраста, кратности беременности и причин НБ (АНІ, гибель эмбриона). Полученные результаты представлены на рис. 1. Из 85 пациенток с НБ 24% составили женщины от 18 до 26 лет, 76% — от 27 до 40 лет. Доля пациенток с АНІ составила 45% (38 человек от общего числа женщин с НБ. Как видно на рис. 1, а, кривая распределения пациенток по возрасту имеет двугорбый характер, распределение по возрасту пациенток с АНІ практически повторяет распределение, характерное для НБ в целом. Для возрастной группы 24—25 лет преобладает НБ по типу гибели эмбриона, в то время как у пациенток 30—31 года значительно чаще наблюдалась АНІ (рис. 1, б). Распределение по возрасту существенно отличается по своей структуре в зависимости от того, были ли пациентки первобеременными или повторнобеременными: первый максимум приходится на возраст 24—25 лет, второй — на 30—31 год (рис. 1, в).

Далее анализируются результаты обследования только пациенток с анэмбрионией 1 типа.

Гинекологические заболевания в анамнезе пациенток с АНІ и частота встречаемости хромосомных аномалий при АНІ. Неразвивающаяся беременность по типу АНІ (Empty sac) имела место у 38 пациенток (45%) от общего числа обследованных женщин. Скудные кровянистые выделения и тянущие боли внизу живота были отмечены у 29 (76%), у 9 (24%) женщин жалобы отсутствовали. Пятая часть (18%) женщин принимали прогестерон для пролонгации беременности, остальные 82% прогестерон не принимали [17]. У пациенток с АНІ при первой беременности кистозные образования желтого тела встречались в 2 раза чаще, чем при второй беременности. Размер их в исследуемой группе был в пределах от 14

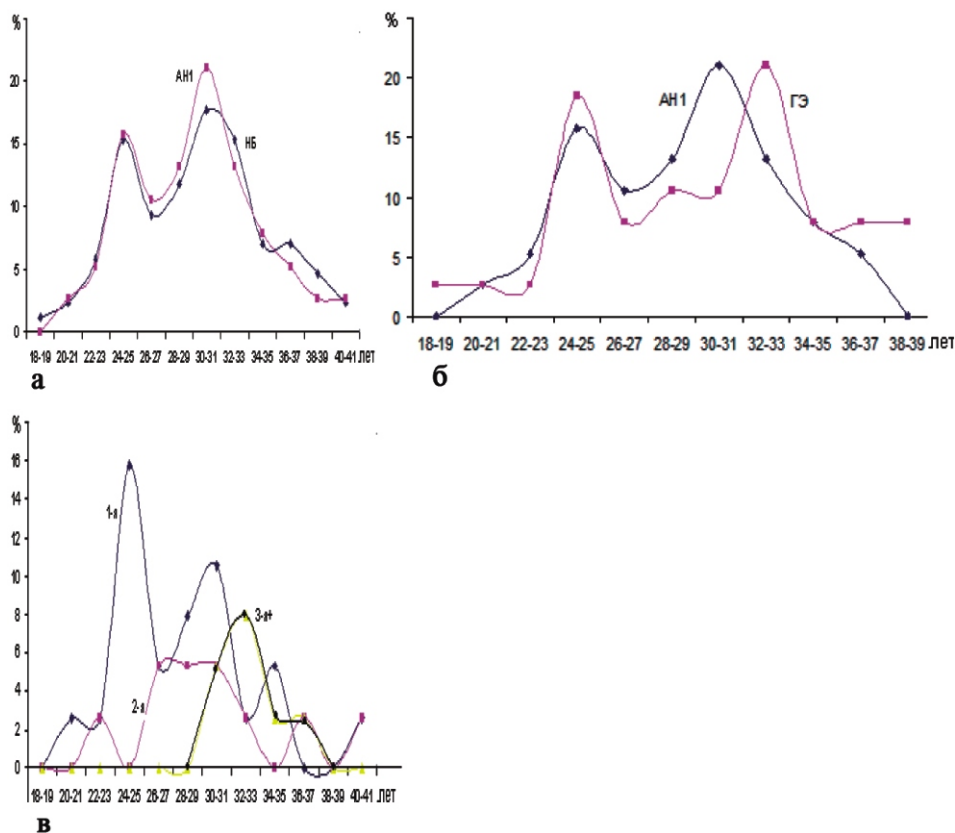
до 20 мм. Кисты желтого тела встречались у трети пациенток группы (32%). Частота их встречаемости не зависела от возраста, то есть отношение числа кист, встречавшихся в возрастном промежутке от 21 до 26 лет и в промежутке от 27 до 40 лет, к числу пациенток в этих возрастных промежутках было одинаковым. Структура миометрия в подавляющем большинстве случаев была однородной, отмечены единичные гематомы, миомы и неоднородности структуры миометрия.

Гинекологические заболевания в анамнезе имели 24 (63%) пациенток, из них у 4 (11%) были только инфекции передающиеся половым путем (ИППП), 9 (23%) — только гинекологические заболевания, у 11 (29%) инфекции сочетались с гинекологическими заболеваниями (рис. 2), а 14 (37%) не имели ни гинекологических заболеваний, ни ИППП. Основными факторами риска у пациенток с АНІ были гормональные нарушения (синдром поликистозных яичников, гиперпролактинемия, субклинический гипотиреоз) — 12%; сочетанные формы наследственных

тромбофилий, гипергомоцистеинемия, антифосфолипидный синдром — 13%.

Проведенное молекулярно-генетическое исследование тканей эмбриона у 42 женщин с АНІ по хромосомам X, Y, 13, 14, 16, 18, 21 и 22 позволило выявить численные хромосомные нарушения в 17 (40%) наблюдениях. Из них по структуре выявленной патологии: триплоидии выявлены в 6 случаях (14,2%), трисомии 16, 21, 22 — по 2 (4,7%) наблюдения соответственно, а трисомии 13, 14, 18, моносомия X, моносомия 21 — по 1 (2,3%) наблюдению соответственно.

Доля пациенток, не имевших в анамнезе ни гинекологических заболеваний, ни ИППП, не имела заметного увеличения с возрастом (рис. 2, а). Доля пациенток с гинекологическими заболеваниями при АНІ заметно возрастала в определенные возрастные периоды (рис. 2, б). Из рис. 2, б также следует, что при АНІ на возраст 30—31 лет приходится максимум как гинекологических, так и ИППП, с небольшим увеличением доли инфекций в возрасте 23—24 года.



**Рис. 1.** Распределение пациенток с различными типами неразвивающейся беременности в зависимости от возраста, кратности беременности и причин НБ (АНІ, гибель эмбриона). а — распределение по возрасту пациенток с НБ в целом и при АНІ; б — распределение по возрасту пациенток с АНІ и при гибели эмбриона (ГЭ); в — распределение по возрасту пациенток в зависимости от кратности беременности: первобеременные (1-я), повторнобеременные (2-я), пациентки, с третьей беременностью (3-я).

Полученные результаты позволяют связывать патогенез АНІ не только с хромосомными аномалиями (абберациями) при формировании плодного яйца, обусловленными «ошибками» при делении клеток, при их дифференцировке, при передаче генетической «информации», но также с повреждениями в результате перенесенных будущей матерью гинекологических заболеваний, ИППП и персистирующих вирусных инфекций [18—21].

На рис. 3, а и рис. 3, б представлены данные о частоте гинекологических заболеваний и социально значимых инфекций в анамнезе у пациенток с АНІ.

Из диаграмм следует, что у пациенток с АНІ наиболее часто встречается эрозия шейки матки (рис. 3, а), а среди репродуктивно значимых инфекций (рис. 3, б) преобладают заболевания вирусной этиологии (40%), затем уреоплазмоз и микоплазмоз (24%). Вирусные заболевания в большей степени сочетались с эрозией шейки матки.

Анализ срока развития и длительности нахождения плодного яйца в полости матки после замирания. Определяли срок развития плодного

яйца, длительность его нахождения в полости матки после замирания и степень отставания размеров ПЯ от срока гестации на день постановки диагноза НБ (рис. 4, а). На рис. 4, а представлены размеры среднего внутреннего диаметра (СВД) плодного яйца по сравнению с усредненными величинами в норме. Как видно на рис. 4, а точка D на оси времени диаграммы соответствует сроку беременности на момент постановки диагноза, отсчитываемому от 1-го дня последней менструации (ПМ). Проецируя размер СВД<sub>р</sub> плодного яйца пациентки на вертикальную ось и сравнивая с размером СВД<sub>н</sub> для данного срока беременности D в норме, можно рассчитать условные сроки развития ПЯ, время остановки развития S, длительность нахождения ПЯ в полости матки после замирания и уровень отставания от нормы размера плодного яйца (СВД).

На рис. 4, б представлена диаграмма, иллюстрирующая различия в распределениях доли пациенток с АНІ по сроку развития ПЯ и по времени нахождения плодного яйца в полости матки до установления диагноза НБ.

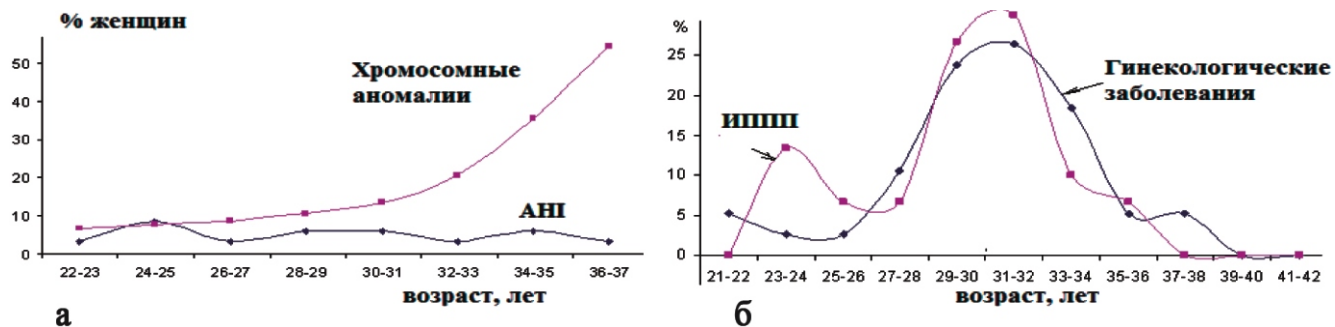


Рис. 2. Доли пациенток с различными факторами риска развития АНІ в зависимости от возраста. а — зависимость от возраста доли пациенток, не имевших в анамнезе ни гинекологических заболеваний, ни ИППП при АНІ и статистические данные о частоте встречаемости хромосомных аномалией у беременных (на 10 000 человек); б — доли пациенток с гинекологическими заболеваниями и ИППП, имевшими место в анамнезе (хотя бы у одной из 24 пациенток) в зависимости от возраста (распределения построены с учетом и сочетанных заболеваний).

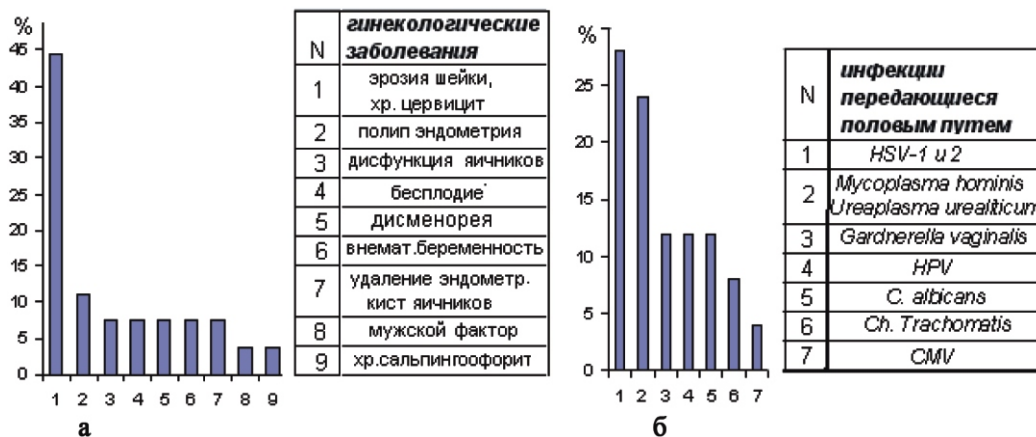


Рис. 3. Частота гинекологических заболеваний и спектр репродуктивно-значимых инфекций. а — частота гинекологических заболеваний в анамнезе пациенток с АНІ; б — частота и спектр ИППП в анамнезе пациенток с АНІ.

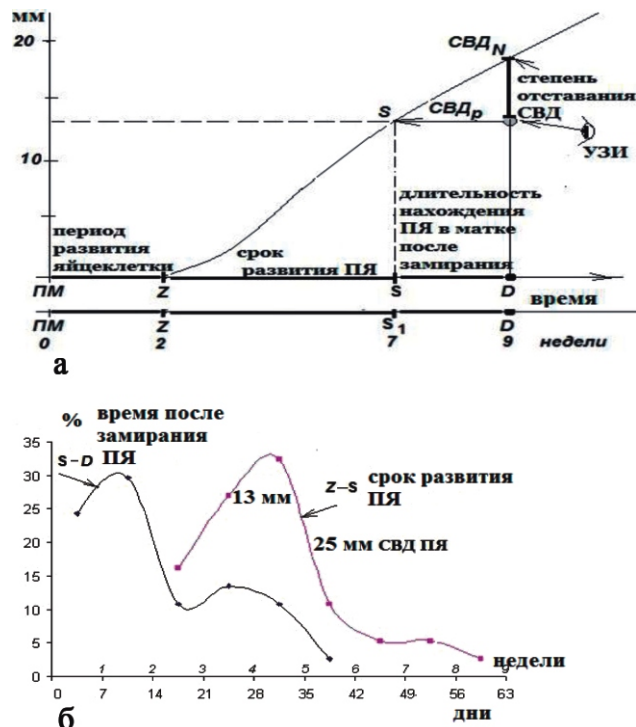


Рис. 4. Схема развития плодного яйца и период пребывания его в матке после заморозки.

а — схема развития ПЯ и период его нахождения в матке после заморозки при АНГ (по данным УЗИ); б — распределение доли пациенток по сроку развития ПЯ и по длительности нахождения ПЯ в полости матки после заморозки до постановки диагноза АНГ (точка D). Около линии, характеризующей длительность развития ПЯ при АНГ отмечены средние размеры СВД ПЯ. Отставание размеров ПЯ достигает 3—4 нед.

Из рис. 4, б видно, что у основной доли пациенток срок развития плодного яйца был от 21 до 35 сут, длительность нахождения плодного яйца до установления диагноза НБ составила от 7 до 14 сут.

Анализ динамики роста уровня  $\beta$ -ХГЧ. Известно, что уже с 4-х — 5-х сут. после оплодотворения поверхностный слой трофобласта способен продуцировать небольшое количество хорионического гонадотропина. Его концентрация удваивается каждые 2 сут. и к 8—10 нед. достигает максимума. Иммуногистохимические исследования показали, что в ранние сроки  $\beta$ -ХГЧ концентрируется в мелких секреторных гранулах под криптами микроворсинок синцитиотрофобласта, то есть транспорт этого гормона ориентирован в межворсинчатое пространство, а затем в кровеносную систему матери [2].

На рис. 5, а, б представлены результаты, обобщающие усредненные данные о сроках развития пустого плодного яйца, времени нахождения его в полости матки после остановки развития и изменение среднего уровня  $\beta$ -ХГЧ у пациенток с различными сроками беременности.

Из графиков следует, что при разных сроках прерывания НБ уровень  $\beta$ -ХГЧ низкий у всех пациенток независимо от срока развития ПЯ, и времени нахождения пустого ПЯ в полости матки после заморозки. При этом отставание уровня  $\beta$ -ХГЧ не соответствовало отставанию развития ПЯ по СВД, что свидетельствует об их слабой корреляционной связи. На рис. 5, б видно, что уровень  $\beta$ -ХГЧ при АНГ в целом в 5—6 раз ниже нижней границы нормы (единичные наблюдения нормальных величин  $\beta$ -ХГЧ обусловлены приемом пациентками прогестерона).

При акушерском сроке 8—9 нед. средние величины, характеризующие течение патологической беременности ниже по сравнению с нормой. Для пациенток, поступивших на сроке беременности 9—10 нед. характерны более низкие величины сроков развития ПЯ по СВД, уровня  $\beta$ -ХГЧ и длины матки, что со-

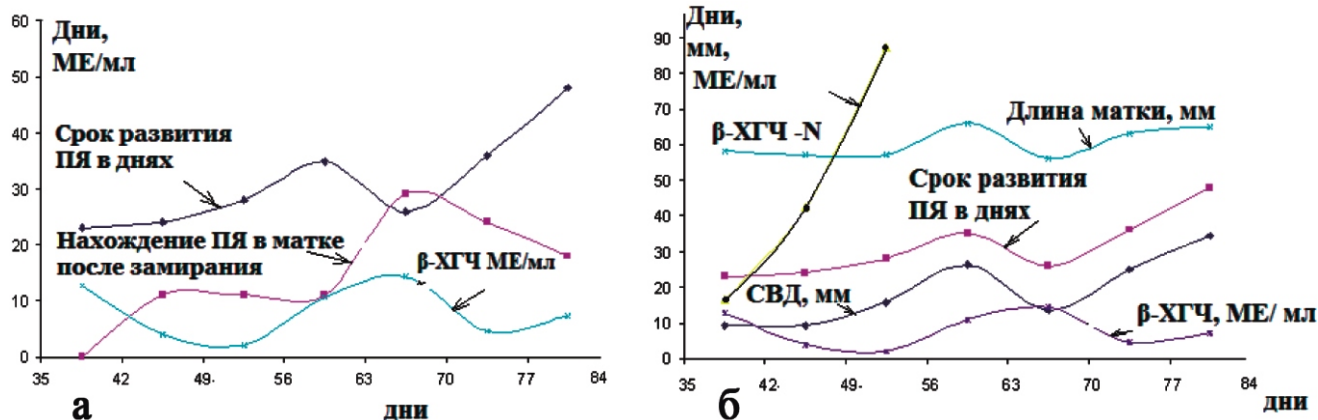


Рис. 5. Сроки развития плодного яйца, длительность пребывания его в матке после заморозки, длина матки и уровни  $\beta$ -ХГЧ. а — усредненные данные о сроках развития, длительности пребывания его в матке после заморозки, времени его нахождения в полости матки после заморозки и уровни  $\beta$ -ХГЧ на разных сроках беременности при АНГ; б — усредненные величины СВД, сроки развития ПЯ, длина матки и уровни  $\beta$ -ХГЧ для пациенток с различными сроками установления диагноза АНГ.

проводяется длительным периодом нахождения замершего ПЯ в полости матки.

Установлен характер изменений уровня  $\beta$ -ХГЧ при разных сроках развития ПЯ и длительности задержки ПЯ в полости матки после остановки его развития при АНІ (рис. 6).

Изменения среднего уровня  $\beta$ -ХГЧ соотносили с долей пациенток с определенным сроком развития ПЯ. При нахождении замершего ПЯ в полости матки длительностью в 1 нед. средний уровень  $\beta$ -ХГЧ составил 4762 мМЕ/мл. Согласно графику, установлено, что средний уровень  $\beta$ -ХГЧ имел максимальное значение при сроках развития плодного яйца 38—41 сут.

Из рис. 6, а следует, что преобладала численность пациенток с низким средним уровнем  $\beta$ -ХГЧ, который возрастал с «запозданием» почти на 1 нед., при малых сроках развития ПЯ. Для сроков развития ПЯ 7—8 нед. уровень  $\beta$ -ХГЧ оказался еще ниже. Это можно объяснить «расстройством» механизма регуляции развития ПЯ, характеризующимся отставанием синтеза  $\beta$ -ХГЧ соответствующими структурами трофобласта.

*Анализ определения сроков развития плодного яйца в зависимости от клинической симптоматики.* На рис. 7 представлены результаты определения сроков развития пустого плодного яйца у пациенток, госпитализированных в стационар с кровянистыми выделениями или при их отсутствии.

Кривая распределения пациенток в зависимости размеров СВД ПЯ при АНІ имела двугорбый характер. При этом «условно» средний размер СВД при постановке диагноза АНІ составил 18,3 мм (при норме около 31,5 мм). Таким образом, размеры ПЯ у пациенток, госпитализированных в стационар с кровянистыми выделениями, были меньше, чем у пациенток без них (рис. 7, б). Это сопровождалось низким уровнем синтеза  $\beta$ -ХГЧ, после начала замиранья ПЯ (рис. 8).

Наиболее часто при АНІ обнаруживали показатели СВД 5—15 мм и 20—25 мм.

На рис. 8, б видно, что уровень  $\beta$ -ХГЧ при анэмбрионии в целом находился ниже нижней границы нормы, (близкие к физиологическим значениям уров-

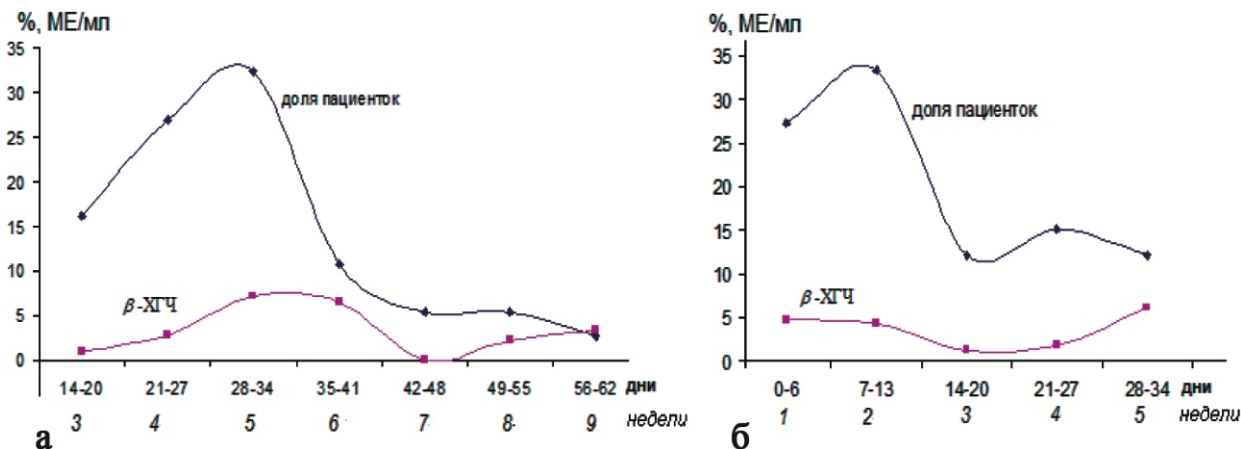


Рис. 6. Уровни  $\beta$ -ХГЧ для разных сроков развития ПЯ и нахождения ПЯ в полости матки после остановки его развития. а — доля пациенток с разным сроком развития ПЯ при АНІ. Средний уровень  $\beta$ -ХГЧ на 3-й нед. развития ПЯ составил 1049 мМЕ/мл; б — доля пациенток с разным периодом нахождения ПЯ в полости матки после замиранья ПЯ и средний уровень  $\beta$ -ХГЧ при АНІ.

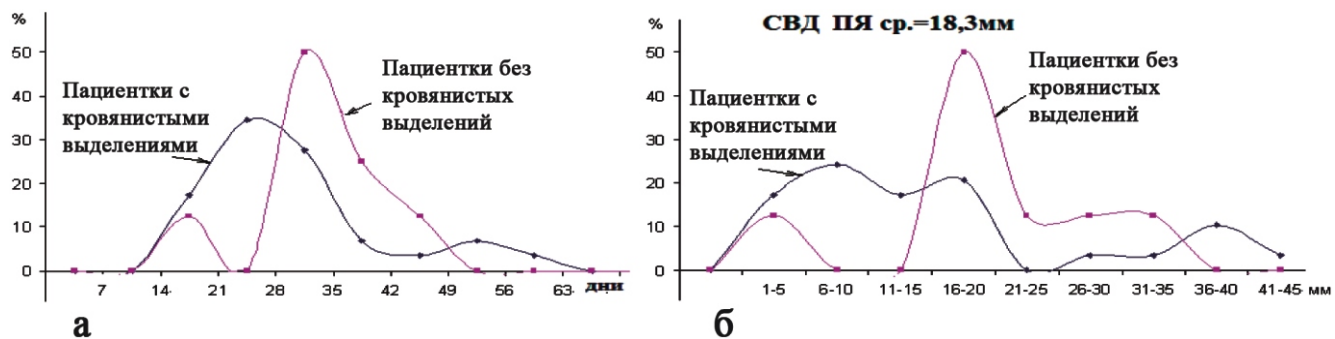


Рис. 7. Сроки развития плодного яйца у пациенток, госпитализированных в стационар с кровянистыми выделениями и без выделений. а — распределение доли пациенток госпитализированных в стационар с кровянистыми выделениями и без выделений по срокам развития плодного яйца при АНІ; б — СВД ПЯ на период замиранья ПЯ у части пациенток с АНІ.

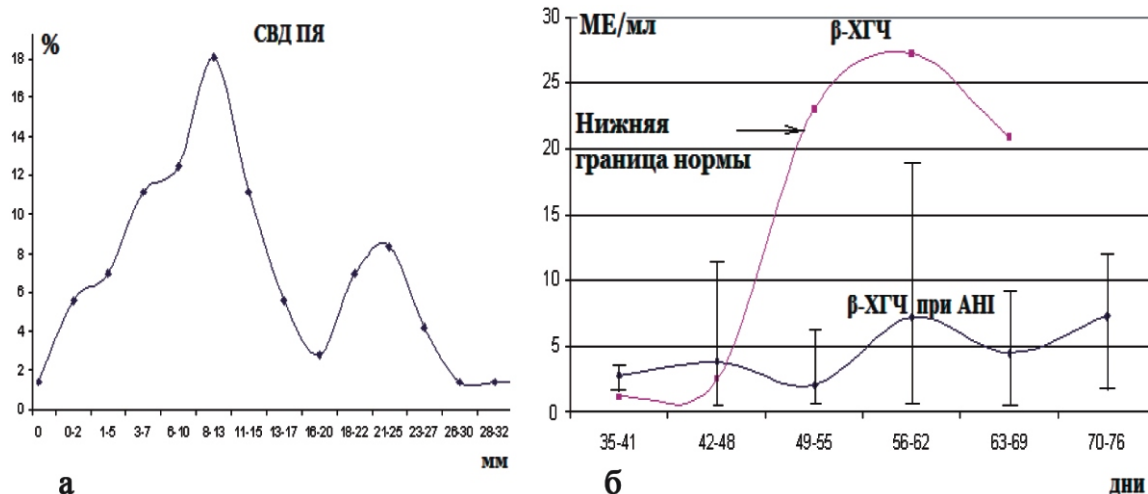


Рис. 8. Размеры среднего внутреннего диаметра плодного яйца и изменение уровня β-ХГЧ при АНІ. а – результат скользящего усреднения размеров СВД при АНІ. По горизонтальной оси – интервалы усреднения размеров; б – изменения β-ХГЧ при АНІ в зависимости от срока гестации.

ни β-ХГЧ отмечены лишь у пациенток, принимавших прогестерон).

Персонализированные показатели течения беременности на ранних сроках АНІ. В табл. 1 представлены показатели развития беременности на ранних сроках при АНІ для наблюдений, при которых величины СВД больше 20 мм и в пределах 8–13 мм.

Из табл. 1, а видно, что уровень β-ХГЧ низкий при различных размерах СВД (верхняя таблица). Исключение составляет наблюдение, когда уровень β-ХГЧ сопряжен с длительным нахождением ПЯ в полости матки после остановки развития при отсутствии у пациентки кровянистых выделений. При очень низкой величине β-ХГЧ (122 мМЕ/мл) на-

Таблица 1, а

Особенности развития беременности на ранних сроках при АНІ

Возраст	Срок беременности	Срок развития ПЯ	СВД ПЯ при АН І	β-ХГЧ	Нахождение ПЯ в матке после замиранья	Длина матки	Кровянистые выделения	Группа крови
28–37	55–81 день	53–70	>19,5	2271–3965 мМЕ/мл	0–23	65–80 мм	+	Rh+
32	76	53	36	3465	0-9	80	+	A(Rh+)
37	61	70	42	3231	23	67	+	A(Rh+)
37	80	<b>51</b>	23	<b>12 343</b>	<b>29</b>	65	–	O(Rh+)
28	81	67	40	2271	14	75	+	O(Rh+)
33	55	55	27	3965	0	66	+	B(Rh+)

Таблица 1, б

Возраст	Срок беременности	Срок развития ПЯ	СВД ПЯ при АНІ	β-ХГЧ	Длительность нахождения замершего ПЯ в матке	Длина матки	Кровянистые выделения	Группа крови
24–35	45–2	36–43	8–13 мм	843–6569 мМЕ/мл	8–13 суток	52–63 мм	+	Rh-
33	45	39	11	1606	6	63	+	A(Rh+)
29	49	36	8	843	13	46	+	A(Rh-)
31	48	39	10	4639	9	57	+	AB(Rh-)
35	47	43	10	2760	4	61	+	O(Rh-)
24	<b>69</b>	36	<b>8</b>	<b>122</b>	<b>33</b>	53	+	O(Rh+)
30	52	41	12	6569	1	52	+	A(Rh+)
27	46	37	8	4465	9	58	+	B(Rh-)



блюдали длительное нахождение ПЯ в полости матки после замирания величиной 8 мм.

Из табл. 1, б также следует, что, несмотря на низкий уровень  $\beta$ -ХГЧ в первом наблюдении длина матки тем больше, чем больше размеры СВД ПЯ.

Диаграммы изменений доли пациенток и длительности нахождения ПЯ в полости матки в днях после замирания для разных возрастных групп при АНІ представлены на рис. 9.

Диаграмма длительности нахождения ПЯ в полости матки после замирания соответствует средним показателям в днях для каждого возрастного интервала. Длительность нахождения ПЯ после остановки развития различна у пациенток в зависимости от их возраста. Период нахождения ПЯ после замирания имел разброс и находился в пределах от 0 до 34—35 сут. Однако при распределении по периодам нахождения ПЯ в полости матки после остановки развития в зависимости от возраста и усреднения величины срока задержки ПЯ могут быть меньше допустимых. Анализ показал, что в среднем длительность периода нахождения ПЯ после замирания в полости матки при АНІ в зависимости от возраста, в большей мере проявлялась у пациенток в возрасте до 25 лет и старше 35 лет.

Корреляционные связи, отражающие степень синхронности изменений показателей. В табл. 2 представлены корреляционные связи, отражающие степень синхронности изменений показателей у пациенток с кровянистыми выделениями.

Из результатов, представленных в табл. 2, следует вывод о полном отсутствии корреляционной связи между уровнем  $\beta$ -ХГЧ и всеми остальными характеристиками развития гестации, кроме отставания показателя СВД ПЯ от нормы. При этом была высокая корреляционная связь между сроком развития плодного яйца и значениями СВД, но отсутствовала кор-

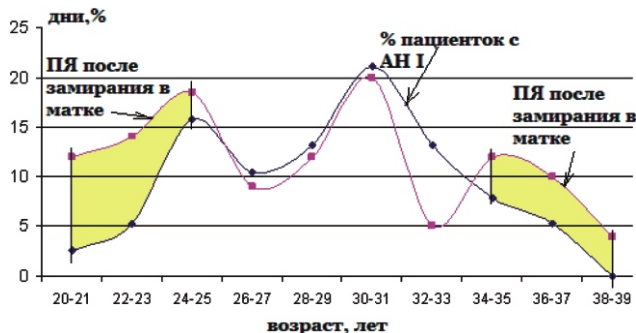


Рис. 9. Диаграммы изменений доли пациенток и длительности нахождения ПЯ в полости матки после замирания (в днях) для разных возрастных групп при АНІ.

реляция с уровнем  $\beta$ -ХГЧ. Корреляционная связь наблюдалась между длительностью задержки ПЯ в полости матки и отставанием размера СВД от нормы. Средний уровень  $\beta$ -ХГЧ был умеренно ниже у пациенток, не имевших кровянистых выделений (табл. 3).

В этой группе выявляется высокая корреляционная связь между длительностью развития плодного яйца, размерами СВД, уровнем  $\beta$ -ХГЧ, размерами матки, а также между длительностью нахождения замершего ПЯ в полости матки.

Появление скудных кровянистых выделений связано с активацией механизмов отторжения патологического плодного яйца. В связи с этим было важно выяснить, в какой мере различаются сроки развития ПЯ по СВД и насколько они синхронно соответствуют сроку прерывания гестации. Уровни  $\beta$ -ХГЧ имели, в отличие от предыдущего наблюдения, корреляционные связи близкие к статистически значимым. При этом в среднем уровень продолжающегося синтеза  $\beta$ -ХГЧ способствовал продолжительности периода нахождения ПЯ в полости матки после остановки его развития. Чем меньше был срок развития ПЯ по

Таблица 2

Корреляционные связи, отражающие степень синхронности изменений показателей у пациенток с кровянистыми выделениями. Средний уровень  $\beta$ -ХГЧ: 2749 ± 2197 мМЕ/мл

Критерий значимости $r > 0,366$ ( $p < 0,05$ )	Срок беременности	Период развития ПЯ	Длительность нахождения замершего ПЯ в матке	СВД ПЯ	Отставание размера СВД от нормы	Длина матки	$\beta$ -ХГЧ
Срок беременности до появления кровянистых выделений	→	<b>0,57</b>	<b>0,63</b>	<b>0,63</b>	<b>0,47</b>	0,25	0,16
Срок развития ПЯ		→	-0,28	<b>0,97</b>	<b>-0,42</b>	<b>0,50</b>	-0,16
Период нахождения замершего ПЯ в матке			→	-0,18	<b>0,95</b>	-0,17	0,29
СВД ПЯ				→	<b>0,38</b>	<b>0,54</b>	-0,16
Отставание размера СВД от нормы					→	-0,30	<b>0,36</b>
Длина матки						→	-0,09

СВД, тем дольше был период нахождения ПЯ в полости матки после замириания. Часть пациенток принимала прогестерон (дюфастон 20—60 мг) с целью сохранения беременности. Возможно, уровень прогестерона поддерживает сохранение ПЯ после замириания в полости матки, что выражается в корреляционных связях (табл. 3) и соответствует двугорбому характеру распределения встречаемости размеров ПЯ при АНІ: первый максимум соответствует 6 нед. гестации, а второй, составляющий 8% наблюдений — 7-й—8-й нед. (рис. 8, а).

Анализ корреляционных связей на фоне приема прогестерона. Нами был проведен сравнительный анализ показателей у пациенток на фоне приема прогестерона в назначенной дозе и не принимавших препарат. Результат определения корреляционных связей отражающих степень синхронности изменений показателей в том и другом наблюдениях обобщены в табл. 4 и 5. Корреляционные зависимости, свидетельствуют о том, в какой мере изменения сопоставляемых показателей происходят синхронно. Вместе с тем процессы,

в которых участвуют какие-либо маркеры (показатели) могут находиться в сильной связи между собой, однако «реализовываться» через маркеры со скрытой временной задержкой. Устанавливая статистически значимые корреляционные связи, мы относили их к степени синхронности изменений (табл. 4).

Срок беременности имел статистически значимую корреляцию и с длительностью развития ПЯ, и с временем его задержки в полости матки, и с размерами СВД у пациенток, не принимавших прогестерон. Кроме того, длительность нахождения ПЯ после остановки развития и отставание размера СВД от нормы было статистически значимо тем меньше, чем дольше шло развитие ПЯ у пациенток, не принимавших прогестерон. Чем больше был срок беременности у женщин, не принимавших прогестерон, тем статистически значимо меньше была длительность нахождения ПЯ в полости матки после замириания.

В табл. 4 и 5 представлены различия в корреляционных связях показателей у пациенток, принимавших и не принимавших прогестерон. Длина матки, как и

Таблица 3  
Корреляционные связи, отражающие степень синхронности изменений показателей у пациенток без кровянистых выделений. Средний уровень β-ХГЧ: 10 816 ± 7376 мМЕ/мл

Критерий значимости r > 0,69 (p<0,05)	Срок беременности	Период развития ПЯ	Длительность нахождения замершего ПЯ в матке	СВД ПЯ	Отставание размера СВД от нормы	Длина матки	β-ХГЧ
Срок беременности до постановки диагноза	→	0,42	<b>0,75</b>	0,41	0,54	0,25	0,44
Длительность развития ПЯ		→	-0,29	<b>1,00</b>	-0,33	-0,05	<b>0,80</b>
Длительность нахождения ПЯ			→	-0,18	<b>0,99</b>	0,30	0,08
СВД ПЯ				→	-0,34	-0,06	<b>0,80</b>
Отставание размера СВД от нормы					→	-0,32	0,07
Длина матки						→	<b>0,99</b>

Таблица 4  
Корреляционные связи, отражающие степень синхронности изменений показателей у пациенток, не принимавших прогестерон (n = 31)

Критерий значимости r>0,355 (p<0,05)	Срок беременности	Период развития ПЯ	Длительность нахождения замершего ПЯ в матке	СВД ПЯ	Отставание размера СВД от нормы	Длина матки	β-ХГЧ
Срок беременности до появления кровянистых выделений	Связь →	<b>0,56</b>	<b>0,40</b>	<b>0,61</b>	<b>0,45</b>	0,21	0,20
Период развития ПЯ		→	<b>-0,36</b>	<b>0,98</b>	<b>-0,42</b>	<b>0,35</b>	0,23
Длительность нахождения замершего ПЯ в матке			→	-0,29	<b>0,88</b>	-0,11	0,00
СВД ПЯ				→	<b>-0,39</b>	0,33	0,22
Отставание СВД ПЯ от нормы					→	-0,12	-0,07
Длина матки						→	0,27

длительность развития ПЯ при этом увеличивается и в том и другом случае только с увеличением размера СВД, причем более тесная корреляционная связь имела место у пациенток, принимавших прогестерон. Отличительной особенностью является и то, что прием прогестерона проявляется положительной корреляционной связью между уровнем  $\beta$ -ХГЧ и отставанием размера ПЯ от нормы. При этом можно отметить, что на фоне приема прогестерона продолжал титроваться  $\beta$ -ХГЧ, и чем дольше была его секреция, тем время нахождения плодного яйца в полости матки было продолжительнее.

### Выводы

1. Распределение доли пациенток с АНІ, в зависимости от *возраста*, имеет двугорбый характер. Первый максимум приходится на возраст 24—25 лет у первобеременных женщин, второй — на возраст 30—31 год, в основном как у первобеременных, так и у повторнобеременных. Доля первобеременных и пациенток с привычным невынашиванием при АНІ также меньше, чем при НБ в целом.

2. *Срок развития плодного яйца* при АНІ меньше, чем при НБ в целом, у основной доли пациенток находился в пределах от 21 до 35 сут. Распределение сроков гестации, как и сроков развития ПЯ по частоте наблюдений имеет два пика.

3. Период нахождения плодного яйца в полости матки после замирания был в пределах от 1 до 14 сут., максимальная длительность составила от 3 до 4 нед. у пациенток в возрасте до 25 лет и старше 35 лет.

4. Средний уровень  $\beta$ -ХГЧ на 8—9 нед. беременности при АНІ в 5—6 раз понижен по сравнению с нижней границей нормы. При АНІ нет корреляционных связей между уровнем  $\beta$ -ХГЧ, размерами плодного яйца, срока остановки развития и длительности нахождения замершего плодного яйца в полости матки до появления кровянистых выделений и(или) установления диагноза НБ. При абсолютно низком уровне  $\beta$ -ХГЧ длительность нахождения ПЯ в полости матки после замирания составила до 4 недель, а при умеренно низкой секреции  $\beta$ -ХГЧ задержка ПЯ в полости матки была меньше (до 14 сут.).

5. Молекулярно-генетическое исследование тканей эмбриона у 42 женщин с НБ позволило выявить численные хромосомные нарушения в 40% наблюдений, что является показанием для консультации пациенток у клинического генетика и планирования последующей беременности. Значимыми факторами риска в патогенезе АНІ являются перенесенные в анамнезе гинекологические и вирусные заболевания, что обосновывает проведение противовирусной терапии (виферон — интерферон- $\alpha 2b$  1 000 000 МЕ свечи, содержащие антиоксиданты: аскорбиновую кислоту, токоферола ацетат ректально; виферон-гель 40 000 МЕ местно), после малоинвазивного лечебно-диагностического метода удаления патологического плодного яйца.

6. На фоне приема прогестерона, время нахождения пустого замершего плодного яйца в полости матки было дольше и уровень  $\beta$ -ХГЧ продолжал титроваться в крови, в отличие от пациенток, без приема прогестерона. Эти данные свидетельствуют об отсутствии эффективности развития беременности на фоне приема прогестерона при формировании АНІ.

Таблица 5

Корреляционные связи, отражающие степень синхронности изменений показателей у пациенток, принимавших прогестерон (n = 7). Пациентки, принимавшие прогестерон — 7 человек. Средний уровень  $\beta$ -ХГЧ 7585 ± 12 257 мМЕ/мл

Критерий значимости (p < 0,05)	Срок беременности	Период развития ПЯ	Длительность нахождения замершего ПЯ в матке	СВД ПЯ	Отставание размера СВД от нормы	Длина матки	$\beta$ -ХГЧ
Срок беременности до появления кровяных выделений	→	0,40	<b>0,88</b>	0,53	0,54	0,44	0,42
Период развития ПЯ		→	-0,12	<b>0,95</b>	-0,52	0,77	0,31
Длительность нахождения замершего ПЯ в матке			→	0,04	<b>0,90</b>	-0,04	0,61
СВД ПЯ				→	-0,42	<b>0,89</b>	0,33
Отставание СВД ПЯ от нормы					→	-0,41	<b>0,69</b>
Длина матки						→	-0,36

Примечание. \* Ввиду малого размера группы статистическая значимость полученных корреляционных связей может быть рассчитана неточно.

7. По результатам УЗИ выявлены различные сроки развития ПЯ до подтверждения диагноза НБ. При этом «условно» величина СВД на момент установления диагноза АНІ составила в среднем 18,3 мм (при норме около 31,5 мм). Сроки развития ПЯ по СВД, период нахождения в полости матки после замирания, размеры матки и уровни β-ХГЧ были различны при различных сроках до начала проявления признаков АНІ.

8. Результаты свидетельствуют о сложности корреляционных связей указанных показателей, которые различны при наличии кровянистых выделений и при их отсутствии. Корреляционная связь между размерами ПЯ по СВД и длиной матки была как у пациенток, принимавших прогестерон, так и не принимавших, однако эта связь была сильнее у пациенток его принимавших.

### Заключение

Использование ультразвукового исследования после 8 нед. беременности позволяет своевременно выявить АНІ и ускорить начало проводимого лечения, особенно эвакуацию из полости матки замершего ПЯ. При отсутствии кровянистых выделений, но при подозрении на НБ, УЗИ необходимо проводить в динамике через 7—10 сут. для предупреждения осложнений, связанных с длительным нахождением ПЯ в полости матки после остановки его развития. Ранняя диагностика АНІ позволяет предотвратить позднее лечение, повышая качество здоровья матери и плода. При выявлении численных хромосомных аномалий необходима консультация клинического генетика при планировании последующей беременности.

### Литература

(п.п. 3; 5; 7—15 см. References)

1. Радзинский В.Е., Милованов А.П. *Экстраэмбриональные и амниотические структуры при нормальной и осложненной беременности*. М.; 2004.
2. Милованов А.П., Ожиганова И.Н. Эмбриохориальная недостаточность: анатомо-физиологические предпосылки, обоснование, дефиниции и патогенетические механизмы. *Архив патологии*. 2014; (3): 4-9.
4. Ланшакова П.Е. Об особенностях неразвивающейся беременности на ранних сроках у перво- и повторно беременных женщин. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2016; 18(12): 67-70.
6. Каграманова Ж.А., Ланшакова П.Е. Возрастные и анамнестические особенности женщин как факторы риска развития неразвивающейся беременности на ранних сроках. XVII Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и Дитя». 27-30.09. 2016; 178-9.
16. Мусалаева И.О., Тарасенко Е.В., Азова М.М., Галина Т.В., Мяндина Г.И., Оленев А.С. Роль полиморфного варианта G-105A гена SEPS1 в инициации прежде-

временных родов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(2): 77-81.

17. Каграманова Ж.А., Сускова В.С., Малиновская В.В., Сусков О.И., Емец В.И., Макарова Е.Н. Тактика комплексного иммунологического обследования и лечения воспалительных заболеваний придатков матки. *Аллергология и иммунология*. 2002; 3(2): 309-312.

18. Каграманова Ж.А., Сускова В.С., Емец В.И., Малиновская В.В. Состояние иммунной и интерфероновой систем у больных воспалительными заболеваниями придатков матки. *Цитокины и воспаление*. 2002; 1(2): 148-9.

19. Каграманова Ж.А., Малиновская В.В., Парфенов В.В. Терапия рецидивирующей герпес — вирусной инфекции у женщин препаратом «виферон-3». *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2008; (1): 44-6.

20. Васильев А.Н., Каграманова Ж.А., Малиновская В.В., Парфенов В.В., Выжлова Е.Н., Серова Е.В. Эффективность терапии рецидивирующей генитальной формы герпесвирусной инфекции препаратом виферон, гель для местного применения у женщин. *Клиническая дерматология и венерология*. 2009; (4): 88-91.

21. Стрижаков А.Н., Каграманова Ж.А., Малиновская В.В., Парфенов В.В. Показатели иммунного статуса при хронических герпесвирусных заболеваниях. *Медицинская иммунология*. 2006; 8(2-3): 291-3.

### References

1. Radzinsky V.E. Milovanov A.P. *Extraembryonic and amniotic structures in normal and complicated pregnancy. [Ekstraembrional'nyye i amnioticheskiye struktury pri normal'noy i oslozhnennoy beremennosti]*. Moscow; Medical News Agency. 2004. (In Russian)
2. Milovanov A.P., Ozhiganova I.N. Embryochorial insufficiency: anatomical and physiological prerequisites, rationale, definitions and pathogenic mechanisms. *Arkhiv patologiyi*. 2014; 3: 4-9. (In Russian)
3. Kagramanova J.A., Lanshchakova P.E., Shevchenko S.B., Strizhakov A.N., Malinovskaya V.V., Vyzhlova E.N. Risk factors of non-developing pregnancy in the early stages. *The new Armenian medical journal*. 2016; 10(4): 5-12.
4. Lanshchakova P.E. On the characteristics of nondeveloping pregnancy in the early stages of primigravidant and sekundigravidant women. *Zdorovie I obrazovanie v 21 veke*. 2016; 18(12): 67-70. (In Russian)
5. Kagramanova J.A., Lanshchakova P.E., Strizhakov A.N., Malinovskaya V.V., Shevchenko S.B. Age, anamnesis and blood group in non-developing pregnancy. *International Conference on European Science and Technology*. Oct. 12-13, 2016; 167-74. (In Germany)
6. Kagramanova Zh.A., Lanshchakova P.E. Age, anamnesis of women as risk factors for nondeveloping pregnancy in the early stages. XVII Russian Scientific and Educational Forum «Mat I ditya». 2016; 178-9. (In Russian)
7. Ambartsumyan G., Amander T. Clark Aneuploidy and early human embryo development. *Hum. Mol. Genet*. 2008; 17 (1): 10-5. (In Russian)
8. Garner D., Lane M., Schoolcraft W. Culture and transfer of viable blastocysts a feasible proposition for human IVF. *Hum. Reprod.* 6 Suppl. 2000; 9-23.
9. Kathy K. Niakan, Jinnuo Han, Roger A. Pedersen, Carlos Simon, and Renee A. Reijo Pera. Human pre-implantation embryo development. *Development*. 2012; Mar 1; 139 (5): 829-41.

10. Maklon N., Geraedts J., Fauser B. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum. Reprod. Update.* 2002; 8: 333-43.
11. Morin L, Cargill YM, Glanc PJOGC. Ultrasound Evaluation of First Trimester Complications of Pregnancy. *J Obstet. Gynaecol.* 2016 Oct; 38 (10): 982-8.
12. Sevki Celen, Necmiye Dover, Berna Seckin, Ufuk Goker, Okan Yenicesu, and Nuri Danisman Utility of First Trimester Ultrasonography before 11 Weeks of Gestation: A Retrospective Study. *ISRN Obstet. Gynecol.* Oct 14, 2012; 308-759. Published online.
13. Kolte A.M., Bernardi L.A., Christiansen O.B., Quenby S., Farquharson R.G., Goddijn M., Stephenson M.D. Terminology for pregnancy loss Prior to viability: a consensus statement from the ESHRE Early pregnancy special interest group. *Hum Reprod.* 2015; 30(3): 495-8.
14. Papaioannou G.I, Syngelaki A., Poon L.C.Y., Ross J.A., Nicolaides K.H. Normal Ranges of Embryonic Length, Embryonic Heart Rate, Gestational Sac Diameter and Yolk Sac Diameter at 6-10 Weeks. *Fetal Diagnosis and Therapy.* 2010; (28): 207-19.
15. Kagramanova J.A., Lanshchakova P.E., Strizhakov A.N., Malinovskaya V.V., Shevchenko S.B., Vyizhlova E.N.  $\beta$ -HCG and periods before and after abortion in the early stages of non-developing pregnancy. *Science and Education XIII International Research and Practice Conference.* November 2<sup>nd</sup>-3<sup>rd</sup>, 2016; 298-304. (In Germany).
16. Musalaeva IO, Tarasenko EV, Azova MM, Galkina TV, Myandina GI, Olenev AS The role of polymorphic variant G-105A of the SEPS1 gene in the initiation of premature birth. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2018; 62 (2). (In Russian)
17. Kagramanova Zh.A., Suskova V.S., Malinovskaya V.V., Suskov O.I., Emets V.I., Makarova E.N. Tactics of complex immunological diagnostics and treatment of inflammatory diseases of the uterine adnexa. *Allergologiya I immunologiya.* 2002; 3(2): 309-12. (In Russian)
18. Kagramanova Zh.A., Malinovskaya V.V., Parfenov V.V. Therapy of recurrent herpes-viral infection in women with the drug «viferon-3». *Zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney.* 2008; 1: 44-6. (In Russian)
19. Kagramanova Zh.A., Suskova V.S., Emets V.I., Malinovskaya V.V. The state of the immune and interferon systems in patients with inflammatory diseases of the uterine adnexa. *Tsitokiny i vospaleniye.* 2002; 1(2): 148-9. (In Russian)
20. Vasiliev A.N., Kagramanova Zh.A., Malinovskaya V.V., Parfenov V.V., Vyzhlova E.N., Serova E.V. The effectiveness of therapy for the recurrent genital form of herpes virus infection with the drug viferon, gel for topical application in women. *Klinicheskaya dermatologiya I venerologiya.* 2009; 4: 88-91. (In Russian)
21. Strizhakov A.N., Kagramanova Zh.A., Malinovskaya V.V., Parfenov V.V. Indicators of the immune status in chronic herpes viral diseases. *Meditinskaya immunologiya.* 2006; 8(2-3): 291-3. (In Russian)

#### Сведения об авторах:

Каграманова Ж.А., доктор мед. наук, гл. специалист, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);

Ланцакова П.Е., врач акушер-гинеколог Университетской клинической больницы № 4, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);

Малиновская В.В., доктор мед. наук, проф., Засл. деятель науки России, зав. лаб. онтогенеза и коррекции системы интерферонов ФГБУ «НИЦЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России;

Свистунов А.А., доктор мед. наук, проф., член-корр., первый проректор ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», Минздрава России (Сеченовский Университет);

Выжлова Е.Н., канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. онтогенеза и коррекции системы интерферонов ФГБУ «НИЦЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Поворознюк В.В.<sup>1</sup>, Григорьева Н.В.<sup>1</sup>, Гопкалова И.В.<sup>2</sup>

## Показатели минеральной плотности костной ткани у самок-крыс Wistar различного возраста в условиях экспериментального гипертиреоза

<sup>1</sup> Государственное учреждение «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева» НАМН Украины, 04114, г. Киев, Украина, ул. Вышгородская, д. 67

<sup>2</sup> Государственное учреждение «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского» НАМН Украины, 61002, г. Харьков, Украина, ул. Алчевских, д. 10

Гипертиреоз — одна из частых причин вторичного остеопороза. Изучение темпов потери костной ткани при гипертиреозе (тиреотоксикозе) в различных возрастных группах является важным и мало изученным процессом. **Цель работы** — изучение влияния длительного введения высоких доз L-тироксина на показатели минеральной плотности костной ткани самок-крыс в различные возрастные периоды. **Методика.** Исследование выполнено на 50 самках крыс Wistar 2 мес., 5—6 мес. и 24 мес. L-тироксин (25 мкг на 100 г) вводили внутримышечно в течение 30 сут. Животные были разделены на группы: неполовозрелые самки (контроль), неполовозрелые самки, получавшие L-тироксин; самки репродуктивного возраста (контроль), самки репродуктивного возраста, получавшие L-тироксин; старые самки (контроль), старые самки, получавшие L-тироксин. Прижизненное определение показателей минеральной плотности костной ткани (МПКТ) проводили на двухфотонном рентгеновском денситометре «Prodigy» (GE Medical systems, LUNAR, model 8743, 2005; USA; программа «Experimental animals») дважды (в начале эксперимента и через 30 сут.). Исследовали позвоночник, кости таза, задние конечности и показатель МПКТ всего скелета. **Результаты.** Установлено, что введение высоких доз L-тироксина статистически значимо увеличивает показатели МПКТ во всех отделах скелета только у неполовозрелых животных. У крыс репродуктивного возраста введение высоких доз L-тироксина вызывало снижение показателя МПКТ, при этом максимальная потеря костной ткани была выявлена на уровне позвоночника и задних конечностей. Снижение показателя МПКТ было статистически значимым не только по сравнению с соответствующим показателем контрольной группы, но и по сравнению с исходными значениями. У старых крыс гипертиреоз вызывал менее значимое повышение МПКТ. **Заключение.** Выявленные возрастные особенности динамики показателей МПКТ следует учитывать при интерпретации данных рентгеновской денситометрии, в частности при изучении экспериментального вторичного остеопороза вследствие тиреотоксикоза.

**Ключевые слова:** самки-крысы, минеральная плотность костной ткани, остеопороз, гипертиреоз, тиреотоксикоз.

**Для цитирования:** Поворознюк В.В., Григорьева Н.В., Гопкалова И.В. Показатели минеральной плотности костной ткани у самок-крыс Wistar различного возраста в условиях экспериментального гипертиреоза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 150—156.

**DOI:**

**Для корреспонденции:** Григорьева Наталья Викторовна, доктор мед., наук, гл. науч. сотр. отдела клинич. физиологии и патологии опорно-двигательного аппарата, e-mail: crystal\_ng@ukr.net

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 21.09.2017

Povoroznyuk V.V.<sup>1</sup>, Grygorieva N.V.<sup>1</sup>, Gopkalova I.V.<sup>2</sup>

## Bone mineral density indices in Wistar female rats of different age with experimental hyperthyroidism

<sup>1</sup> D.F. Chebotarev Institute of Gerontology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Vyshgorodskaya Str. 67, Kiev 04114, Ukraine

<sup>2</sup> V.Ya. Danilevsky Institute for Problems of Endocrine Pathology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Alchevskikh Str. 10, Kharkov 61002, Ukraine

Hyperthyroidism is one of the common causes of secondary osteoporosis in patients of different ages, so the study of the rate of bone loss in different age groups is very important and little studied. **The purpose** was to study the effect of prolonged administration of high doses of L-thyroxine on bone mineral density (BMD) parameters of different regions of the

skeleton of Wistar female rats at different age periods. **Methods.** The study was performed on 50 female Wistar rats of three age groups (2 months, 5-6 months and 24 months). L-thyroxin in a dose of 25 mcg per 100 g of body weight, was administered intramuscularly for 30 days. The animals were divided into the following groups: immature females of the control group; Immature female rats who received L-thyroxine; rats of the reproductive age of the control group; rats of reproductive age who received L-thyroxine; Old females of the control group; Old females who received L-thyroxine. In-vivo determination of BMD parameters was performed on a two-photon x-ray densitometer «Prodigy» (GE Medial Systems, LUNAR, model 8743, 2005, USA, Experimental animals program) twice (at the beginning of the experiment and after 30 days). The following sections of the skeleton were examined: the spine, pelvic bones, hind limbs and the BMD index of the entire skeleton. **Results.** It was found that high doses of L-thyroxine significantly increases BMD indices in all parts of the skeleton only in immature female rats. High doses of L-thyroxine to the animals of reproductive age caused declines in BMD, maximum bone loss was detected at the level of the spine and hind limbs. The decline in BMD was statistically significant, not only in comparison with the corresponding index of the control group, but also in comparison with the baseline values. In old rats the hyperthyroidism caused less significant increase in BMD. **Conclusion.** Identified age features of the dynamics of BMD indices should be considered in the interpretation of X-ray densitometry data, in particular in the studies of the experimental secondary osteoporosis due to hyperthyroidism.

**Keywords:** female rats, bone mineral density, osteoporosis, thyroid hormones.

**For citation:** Povoroznyuk V.V., Grygorieva N.V., Gopkalova I.V. Bone mineral density indices of Wistar female rats in different ages with experimental hyperthyroidism. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 150—156. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Nataliia V. Grygorieva N.V., Doctor of Medical Sciences, Prof., Principal Researcher, State Institution «D.F. Chebotarev Institute of Gerontology NAMS Ukraine», 67 Vyshgorodska Str., Kiev, 04114, Ukraine, e-mail: crystal\_ng@ukr.net

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

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Povoroznyuk V.V., [https:// orcid.org/0000-0002-8855-482X](https://orcid.org/0000-0002-8855-482X)

Grygorieva N.V., <https://orcid.org/0000-0002-4266-461X>

Gopkalova I.V., [https:// orcid.org/0000-0001-8389-2232](https://orcid.org/0000-0001-8389-2232)

**Received** 21.09.2017

## Введение

Гипертиреоз является одной из частых причин вторичного остеопороза у пациентов различного возраста. Влияние тиреоидных гормонов на костную ткань изучают более века, первое сообщение о взаимосвязи гипертиреоза и остеопороза с множественными переломами было опубликовано еще в конце 19 столетия [1].

В последнее время благодаря значительному прогрессу биологии существует возможность оценить как *in vivo*, так и *in vitro* действие многих факторов, влияющих на метаболизм костной ткани. Экспериментальное моделирование вторичного остеопороза [2] занимает важное место в понимании механизмов потери костной ткани и обеспечивает возможность оценки специфичности развития нарушений в различных костях скелета, длительность формирования патологии и особенности ее проявления как в компактных, так и в губчатых костях. В настоящее время известно, что гипертиреоз в организме вызывает ускорение метаболизма костной ткани, при этом процессы резорбции преобладают над костеобразованием [3—7]. Доказа-

но, что действие тиреоидных гормонов на костную ткань осуществляется через рецепторы к тиреоидным гормонам ( $RTT\alpha1$ ,  $RTT\alpha2$ ,  $RTT\beta1$ ) [5]. Однако данные относительно связи гипертиреоза с риском остеопоротических переломов и показателями структурно-функционального состояния костной ткани противоречивы, что может быть связано как с особенностями обследуемых когорт в клинических исследованиях [8—13], так и данных экспериментальных исследований с использованием разных видов животных с учетом влияния возрастных и половых особенностей на полученные результаты [2, 4, 6].

Существующие современные инвазивные методы оценки состояния и метаболизма костной ткани (гистоморфометрия, определение биохимических маркеров сыворотки крови и др.) ограничивают оценку результатов исследования в динамике эксперимента, поэтому использование неинвазивных методов, в частности компьютерной томографии или двухфотонной рентгеновской денситометрии (ДРА) позволяет проанализировать динамику параметров структурно-функционального состояния костной ткани при оценке

длительных влияний патогенных факторов на состояние костной ткани [2]. С появлением высокочувствительных денситометров стало возможным оценивать минеральную плотность костной ткани (МПКТ), минеральную насыщенность костной ткани (МНКТ) и площадь костной ткани (ПКТ) у мелких экспериментальных животных. К сожалению, в доступной литературе отсутствуют систематизированные данные рентгеновской денситометрии у крыс в разные возрастные периоды с экспериментальным гипертиреозом (тиреотоксикозом).

*Цель исследования* — изучить влияние длительного введения высоких доз L-тироксина на показатель МПКТ самок-крыс Wistar в различные возрастные периоды.

### Методика

Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Проведение исследования одобрено этическим комитетом института. Эксперименты выполнены на 50 самках-крыс Wistar трех возрастных групп (2 мес., 5—6 мес. и 24 мес.), содержащихся в условиях вивария ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева» НАМН Украины при естественном освещении, на стандартном рационе (стандартный гранулированный комбикорм-концентрат), при свободном доступе к воде и пище. L-тироксин в дозе 25 мкг на 100 г массы тела, вводили внутримышечно в течение 30 сут.

Животные были разделены на 6 групп: 1-я — неполовозрелые самки контрольной группы ( $n = 10$ ); 2-я — неполовозрелые самки, получавшие L-тироксин ( $n = 10$ ); 3-я — самки репродуктивного возраста контрольной группы ( $n = 10$ ); 4-я — самки репродуктивного возраста, получавшие L-тироксин ( $n = 10$ ); 5-я — старые самки контрольной группы ( $n = 5$ ); 6-я — старые самки, получавшие L-тироксин ( $n = 5$ ).

Прижизненное определение показателей МПКТ проводили на двухфотонном рентгеновском денситометре «Prodigy» (GE Medical systems, LUNAR, model 8743, 2005; USA; программа «Experimental animals»). Данная программа позволяет измерять у мелких животных МПКТ как всего скелета в целом, так и отдельных его регионов. Исследование проводили с фиксацией животного на специальном устройстве под эфирным наркозом.

Исследовали следующие отделы скелета: позвоночник, кости таза, задние конечности и показатель МПКТ всего скелета. Погрешность измерения данного прибора составляет  $\pm 0,01$  г/см<sup>2</sup>. Показатели

МПКТ во всех группах оценивали в начале эксперимента и через 30 сут. Динамику показателя МПКТ анализировали в абсолютных единицах (г/см<sup>2</sup>) и в процентах. Последний вычисляли по формуле:  $\Delta\text{МПКТ}, \% = (\Delta\text{МПКТ}/\text{МПКТ}_{\text{исх.}}) \times 100\%$ , где  $\Delta\text{МПКТ}$  — это разность абсолютных показателей МПКТ в начале эксперимента и через 30 сут. Данное исследование проводили в соответствии с правилами Европейской конвенции о гуманном отношении к животным [14].

Статистический анализ проводили с использованием пакетов программы «Statistica 6.0» Copyright© StatSoft, Inc. 1984-2001, Serial number 31415926535897. Использовали следующие методы статистического анализа: проверка нормальности распределения количественных признаков проводилась с использованием критерия Шапиро—Уилка; сравнение средних показателей проводилась с использованием t-критерия Стьюдента и Манн-Уитни.

### Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования было выявлено, что 30-дневное введение L-тироксина существенно снижает прирост массы тела во всех возрастных группах по сравнению с показателями контрольных животных. Так, если у самок контрольных групп значимый прирост данного показателя через 30 сут. составил у неполовозрелых 69%, у репродуктивных — 17,3%, а у старых — 12%, то после введения L-тироксина у неполовозрелых самок не было выявлено существенных различий по сравнению с контрольной группой, а у самок-крыс репродуктивного и старого возраста он снизился соответственно на 19,7% и 7%. Динамика показателей массы тела у животных различных возрастных групп представлена в табл. 1.

При анализе интегрального показателя МПКТ всего скелета в целом в контрольных группах неполовозрелых и репродуктивных животных был выявлен его положительный прирост через 30 сут. исследования (15,8 и 15,2% соответственно) по сравнению с исходными данными. В отличие от этого, в контрольной группе у старых самок, получавших L-тироксин, отмечена статистически значимая потеря МПКТ (на 9,2%). Ответ неполовозрелых и репродуктивных самок на введение L-тироксина был различным. Через 30 сут. исследования у неполовозрелых самок установлено значимое повышение показателя МПКТ (на 9,7%) по сравнению с показателями контрольной группы, а у репродуктивных самок-крыс, наоборот, статистически значимое его снижение (17,9%). У старых самок-крыс введение L-тироксина оказывало значимый стимулирующий эффект и приостанав-



ливалось физиологическую возрастную потерю МПКТ. Динамика изменений минеральной плотности костной ткани всего скелета через 30 сут. после введения тироксина представлена в табл. 2.

В последующем при анализе показателей МПКТ отдельных регионов скелета после 30-суточного введения L-тироксина, в основном, повторялась подобная закономерность, что и при анализе показателя МПКТ всего скелета в целом, однако степень выраженности изменений МПКТ была различной. Так, в задних конечностях у неполовозрелых и старых самок-крыс динамика МПКТ существенно не отличалась от значений контрольной группы (табл. 3), а у животных репродуктивного возраста выявлены ста-

статически значимо более низкие показатели МПКТ по сравнению с контролем.

Наибольшее увеличение показателей МПКТ на введение L-тироксина у неполовозрелых самок было обнаружено в костях таза (на 37,1% по сравнению с исходными значениями и на 17,8% по сравнению с показателями соответствующей возрастной контрольной группы). У репродуктивных и старых самок введение L-тироксина статистически значимых изменений показателя МПКТ костей таза не вызывало (табл. 4).

При анализе показателей МПКТ на уровне позвоночника под действием L-тироксина (табл. 5) у неполовозрелых самок-крыс также наблюдался прирост показателей МПКТ, однако он был значи-

Таблица 1

Динамика показателей массы тела у самок крыс разных возрастных групп через 30 сут. после приема тироксина

Группы	Статистический показатель	W <sub>0</sub> , кг	Δ W <sub>30</sub> , кг	Δ W <sub>30</sub> , %
1-я гр. Неполовозрелые самки (контрольная группа)	—	0,098 ± 0,005	0,066 ± 0,005	68,96 ± 5,15
2-я гр. Неполовозрелые самки, получавшие L-тироксин	t p <sub>1-2</sub>	0,092 ± 0,004 0,82 > 0,05	0,057 ± 0,003 0,45 > 0,05	63,50 ± 4,83 0,77 > 0,05
3-я гр. Самки репродуктивного возраста (контрольная группа)	—	0,171 ± 0,006	0,029 ± 0,002	17,33 ± 1,76
4-я гр. Самки репродуктивного возраста, получавшие L-тироксин	t p <sub>3-4</sub>	0,196 ± 0,007 2,60 < 0,05	-0,008 ± 0,010 3,48 < 0,01	-2,36 ± 5,36 3,49 < 0,01
5-я гр. Старые самки (контрольная группа)	—	0,233 ± 0,006	0,028 ± 0,002	12,01 ± 0,925
6-я гр. Старые самки, получавшие L-тироксин	t p <sub>5-6</sub>	0,247 ± 0,010 2,33 < 0,05	0,013 ± 0,004 9,88 < 0,001	5,093 ± 1,427 10,26 < 0,001

Примечание. W<sub>0</sub> — исходная масса тела, ΔW<sub>30</sub> — динамика показателя массы тела через 30 сут.

Таблица 2

Динамика показателей минеральной плотности костной ткани всего скелета в целом у самок-крыс различных возрастных групп через 30 сут. после приема тироксина

Группа	Статистический показатель	МПКТ <sub>0</sub> , г/см <sup>2</sup>	ΔМПКТ <sub>30</sub> , г/см <sup>2</sup>	ΔМПКТ <sub>30</sub> , %
1-я гр. Неполовозрелые самки (контрольная группа)	—	0,085 ± 0,001	0,014 ± 0,002	15,83 ± 1,99
2-я гр. Неполовозрелые самки, получавшие L-тироксин	t p <sub>1-2</sub>	0,080 ± 0,001 2,68 < 0,05	0,021 ± 0,003 2,11 < 0,05	26,56 ± 3,86 2,45 < 0,05
3-я гр. Самки репродуктивного возраста (контрольная группа)	—	0,098 ± 0,002	0,015 ± 0,003	15,16 ± 3,43
4-я гр. Самки репродуктивного возраста, получавшие L-тироксин	t p <sub>3-4</sub>	0,117 ± 0,005 3,27 < 0,01	-0,006 ± 0,007 2,63 < 0,05	-2,82 ± 5,37 2,82 < 0,05
5-я гр. Старые самки (контрольная группа)	—	0,134 ± 0,005	-0,014 ± 0,008	-9,16 ± 5,70
6-я гр. Старые самки, получавшие L-тироксин	t p <sub>5-6</sub>	0,128 ± 0,004 1,19 > 0,05	-0,001 ± 0,004 1,38 < 0,05	-0,190 ± 3,11 1,16 < 0,05

Примечание. В табл. 2—5 приняты следующие сокращения: МПКТ<sub>0</sub> — исходный показатель МПКТ; ΔМПКТ<sub>30</sub> — динамика показателя МПКТ через 30 сут.

тельно меньшим, чем в костях таза. У самок репродуктивного возраста в позвоночнике была выявлена самая значимая потеря МПКТ по сравнению со всеми исследованными отделами скелета, которая составила 9,9% по сравнению с исходным уровнем и 24,6% по сравнению с показателями контрольной группы соответствующего возраста (табл. 2—5).

В настоящее время многочисленными исследованиями подтверждено, что основные антропометрические показатели крыс (рост, масса тела) имеют свои возрастные особенности. Анализ полученных результатов показателя массы тела у самок контрольных групп выявил статистически значимый прирост данного показателя через 30 сут. исследования (неполовозрелые — на 69%, репродуктивные — на 17,3%, старые — на 12% соответственно).

Согласно данным источников литературы, масса тела, связана с уровнем тиреоидных гормонов в сыворотке крови [15], однако в нашем исследовании не было выявлено статистически значимых различий показателя массы тела у неполовозрелых самок-крыс по сравнению с соответствующими показателями возрастной контрольной группы. В то же время, у самок-крыс репродуктивного и старого возраста, через 30 сут. после введения L-тироксина, выявлено существенное уменьшение показателя массы тела на 19,7% и 7% соответственно.

Впервые было проведено унифицированное исследование на трех возрастных группах самок-крыс Wistar, содержащихся в одних и тех же условиях вивария, с использованием одной и той же дозы L-тироксина, вводимой в течение одного и того же промежутка времени, с определением прижизненной динамики

Таблица 3

**Динамика показателей минеральной плотности костной ткани в задних конечностях у самок крыс разных возрастных групп через 30 сут. после приема тироксина и без него**

Группа	Статистический показатель	МПКТ <sub>0</sub> , г/см <sup>2</sup>	ΔМПКТ <sub>30</sub> , г/см <sup>2</sup>	ΔМПКТ <sub>30</sub> , %
1-я гр. Неполовозрелые самки (контрольная группа)	—	0,068 ± 0,001	0,014 ± 0,002	20,97 ± 3,48
2-я гр. Неполовозрелые самки, получавшие L-тироксин	t p <sub>1-2</sub>	0,062 ± 0,001 4,24 0,0001	0,017 ± 0,002 -1,06 0,30	28,31 ± 2,86 -1,63 0,12
3-я гр. Самки репродуктивного возраста (контрольная группа)	—	0,082 ± 0,001	0,012 ± 0,002	14,04 ± 2,47
4-я гр. Самки репродуктивного возраста, получавшие L-тироксин	t p <sub>3-4</sub>	0,095 ± 0,003 -4,11 0,0001	-0,006 ± 0,002 6,36 0,0001	-5,89 ± 2,50 5,67 0,00001
5-я гр. Старые самки (контрольная группа)	—	0,102 ± 0,003	0,002 ± 0,002	2,02 ± 2,08
6-я гр. Старые самки, получавшие L-тироксин	t p <sub>5-6</sub>	0,104 ± 0,004 -0,40 0,70	-0,004 ± 0,003 1,66 0,12	-3,81 ± 2,43 1,82 0,09

Таблица 4

**Динамика показателей минеральной плотности костной ткани в костях таза у самок крыс разных возрастных групп через 30 сут. после приема тироксина и без него**

Группа	Статистический показатель	МПКТ <sub>0</sub> , г/см <sup>2</sup>	ΔМПКТ <sub>30</sub> , г/см <sup>2</sup>	ΔМПКТ <sub>30</sub> , %
1-я гр. Неполовозрелые самки (контрольная группа)	—	0,087 ± 0,003	0,017 ± 0,002	19,37 ± 3,45
2-я гр. Неполовозрелые самки, получавшие L-тироксин	t p <sub>1-2</sub>	0,080 ± 0,003 1,65 0,116	0,030 ± 0,003 -3,61 0,002	37,14 ± 3,82 -3,45 0,003
3-я гр. Самки репродуктивного возраста (контрольная группа)	—	0,106 ± 0,003	0,017 ± 0,004	17,02 ± 4,41
4-я гр. Самки репродуктивного возраста, получавшие L-тироксин	t p <sub>3-4</sub>	0,108 ± 0,003 -0,47 0,65	0,016 ± 0,005 0,16 0,88	16,05 ± 5,60 0,14 0,89
5-я гр. Старые самки (контрольная группа)	—	0,135 ± 0,006	-0,008 ± 0,010	-4,98 ± 7,46
6-я гр. Старые самки, получавшие L-тироксин	t p <sub>5-6</sub>	0,133 ± 0,009 0,19 0,86	0,001 ± 0,006 -0,77 0,45	2,16 ± 4,62 -0,81 0,43

МПКТ на одном и том же двухфотонном рентгеновском денситометре «Prodigy» с использованием программы «Experimental animals».

Изучение абсолютных исходных значений МПКТ во всех изучаемых группах крыс Wistar выявило, что МПКТ позвоночника значимо выше, чем МПКТ костей таза, а самая низкая МПКТ выявляется в костях задних конечностей.

Анализируя динамику изменения МПКТ, необходимо отметить, что по сравнению с человеком некоторые кости крыс растут всю жизнь и большинство эпифизарных зон, обеспечивающих рост костей в длину, у крыс остаются открытыми и после 30 мес, и только зоны роста в телах поясничных позвонков остаются открытыми до 21 мес. [16]. Полученные нами данные подтверждают вышесказанное, однако в нашей работе при изучении динамики МПКТ в скелете в целом у контрольных крыс Wistar был выявлен период быстрого прироста МПКТ у неполовозрелых и репродуктивных крыс, а также период медленного снижения МПКТ у старых животных. Причем при анализе отдельных частей скелета достоверных статистически значимых различий в скорости прироста МПКТ у репродуктивных и неполовозрелых животных не выявлено.

Совершенно другие закономерности были обнаружены при анализе динамики МПКТ после введения одной и той же дозы L-тироксина. Был выявлен существенный прирост МПКТ у неполовозрелых животных, причем самый высокий был выявлен в костях таза (с 19% в контроле до 37% после L-тироксина). У репродуктивных самок наблюдалась резкая потеря МПКТ во всех отделах скелета, кроме костей таза, причем больше всего — в позвоночнике (с 14% в контроле до 9,9% после L-тироксина). Получен-

ные нами результаты согласуются с данными исследований (Bassett J.H.D. и соавт., 2009) свидетельствующих о том, что тиреоидные гормоны вызывают анаболические эффекты в костной ткани у неполовозрелых животных и катаболические — у репродуктивных [5]. Новизна наших исследований состоит в выявлении особенностей динамики МПКТ в различных отделах скелета после введения L-тироксина. Впервые было показано, что у старых самок-крыс введение L-тироксина в примененной дозе существенно уменьшало потерю МПКТ по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы.

Вероятно, глубже интерпретировать полученные данные помогут дальнейшие исследования по изучению влияния жировой и обезжиренной (мышечной и соединительнотканной) масс тела на МПКТ, а также исследование динамики двух составляющих показателя МПКТ — это площади костной ткани и минеральной насыщенности костной ткани. Этому будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что длительное введение высоких доз L-тироксина приводит к статистически значимым изменениям показателей МПКТ у самок-крыс Wistar, степень выраженности и направленность которого зависит от возраста животных.

У неполовозрелых самок под действием высоких доз тиреоидных гормонов наблюдается прирост МПКТ, который максимально выражен на уровне костей таза, минимально — в костях задних конечностей. Введение той же дозы L-тироксина самкам репродуктивного возраста вызывает значимое снижение показателя МПКТ, максимально выраженное на уровне позвоночника. В отличие от этого, существенных изменений показателя МПКТ на уровне костей

Таблица 5

Динамика изменений минеральной плотности костной ткани в позвоночнике у самок крыс разных возрастных групп через 30 сут. после приема тироксина и без него

Группа	Статистический показатель	МПКТ <sub>0</sub> , г/см <sup>2</sup>	ΔМПКТ <sub>30</sub> , г/см <sup>2</sup>	ΔМПКТ <sub>30</sub> , %
1-я гр. Неполовозрелые самки (контрольная группа)	—	0,10 ± 0,002	0,016 ± 0,003	15,63 ± 2,65
2-я гр. Неполовозрелые самки, получавшие L-тироксин	t p <sub>1-2</sub>	0,09 ± 0,002 2,48 0,02	0,024 ± 0,003 -1,87 0,08	25,07 ± 3,46 -2,17 0,04
3-я гр. Самки репродуктивного возраста (контрольная группа)	—	0,12 ± 0,004	0,011 ± 0,005	14,65 ± 2,92
4-я гр. Самки репродуктивного возраста, получавшие L-тироксин	t p <sub>3-4</sub>	0,14 ± 0,003 -2,80 0,01	-0,014 ± 0,005 3,54 0,002	-9,95 ± 3,317 5,56 0,000
5-я гр. Старые самки (контрольная группа)	—	0,14 ± 0,002	-0,008 ± 0,007	-5,18 ± 4,66
6-я гр. Старые самки, получавшие L-тироксин	t p <sub>5-6</sub>	0,15 ± 0,008 -0,73 0,48	0,006 ± 0,004 -1,74 0,10	4,40 ± 2,63 -1,79 0,10

таза в настоящем исследовании не выявлено. У старых самок выявлена тенденция к повышению показателей МПКТ под влиянием высоких доз L-тироксина по сравнению с возрастной контрольной группой, однако статистически значимые изменения МПКТ обнаружены только на уровне всего скелета.

Выявленные возрастные особенности динамики показателей МПКТ под влиянием высоких доз L-тироксина, следует учитывать при интерпретации данных рентгеновской денситометрии при экспериментальном гипертиреозе.

### Литература

#### (п.п. 1; 3—16 см. References)

2. Поворознюк В.В., Дедух Н.В., Григорьева Н.В., Гопкалова И.В. *Экспериментальный остеопороз*. Киев: Экспресс; 2012.

### References

1. Recklinghausen F.D. *Die Fibrose oder deformierende Ostitis, die Osteomalazie und die osteoplastische Carzinose in ihren gegenseitigen Beziehungen. Osteitis fibrosa or deformans, osteomalacia and osteoplastic carcinosis in their relationships*. Berlin: George Reimer; 1891.

2. Povoroznyuk V.V., Deduh N.V., Grygorieva N.V., Gopkalova IV. *Experimental osteoporosis. [Eksperimentalnyy osteoporoz]*. Kiev; Express; 2012. (in Russian)

3. Gogakos A.I., Bassett J.H.D., Williams G.R. *Arch Biochem Biophys*. 2010; 503(1): 129-36.

4. Combs C.E., Nicholls J.J., Bassett J.H.D., Williams G.R. Thyroid hormones and bone development. *Minerva Endocrinol*. 2011; 36(1): 71-85.

5. Bassett J.H.D. The skeletal phenotypes of TR $\alpha$  and TR $\beta$  mutant mice. *J. of Molecular Endocrinol*. 2009; 42: 269-82.

6. Cardoso L.F., Maciel L.M., Paula F.J. The multiple effects of thyroid disorders on bone and mineral metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014; 58(5): 452-63.

7. Bassett J.H.D., O'Shea P.J., Sriskantharajah S., Rabiner B., Boyde A., Howell P.G. et al. Thyroid hormone excess rather than thyrotropin deficiency induces osteoporosis in hyperthyroidism. *Mol. Endocrinology*. 2007; 21 (5): 1095-107.

8. Blum M.R., Bauer D.C., Collet T.H., Fink H.A., Cappola A.R., da Costa B.R. et al. Subclinical thyroid dysfunction and fracture risk: a meta-analysis. *JAMA*. 2015; 313(20): 2055-65.

9. Lambrinou I., Armeni E., Pliatsika P., Rizos D., Kaparos G., Augoulea A. et al. Thyroid function and autoimmunity are associated with the risk of vertebral fractures in postmenopausal women *J Bone Miner Metab*. 2016; Mar 29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27023333>.

10. Stangierski A., Ruchaia M., Krauze T., Moczko J., Guzik P. Treatment of severe thyroid function disorders and changes in body composition. *Endokrynol Pol*. 2016; 67(4): 359-66.

11. Viniol A., Hickstein L., Walker J., Donner-Banzhoff N., Baum E., Becker A. Influence of thyroid hormone therapy on the fracture rate — A claims data cohort study. *Bone*. 2016; 86: 86-90.

12. Wirth C.D., Blum M.R., da Costa B.R., Baumgartner C., Collet T.H., Medici M. et al. Subclinical thyroid dysfunction and the risk for fractures: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2014; 161(3): 189-99.

13. Yoshihara A., Yoshimura Noh J., Mukasa K., Watanabe N., Iwaku K., Ohye H. et al. The characteristics of osteoporotic patients in Graves' disease patients newly diagnosed after menopause: a prospective observational study. *Endocr J*. 2016; Sep 7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27600197>.

14. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986*. Strasbourg, 1986.

15. Pearce E.N. Thyroid hormone and obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012; 19(5): 408-13

16. Jee W.S.S., Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J. Musculoskel. Neuron. Interact*. 2001; 1 (3): 193-207.

### Сведения об авторах:

Поворознюк Владислав Владимирович, доктор мед. наук, проф., руководитель отдела клинической физиологии и патологии опорно-двигательного аппарата ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева» НАМН Украины;

Григорьева Наталия Викторовна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. отдела клинической физиологии и патологии опорно-двигательного аппарата ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева» НАМН Украины, e-mail: crystal\_ng@ukr.net;

Гопкалова Ирина Всеволодовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. хирургического отд-ния ГУ Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского» НАМН Украины.

Коваленко А.А.<sup>1</sup>, Титова Г.П.<sup>2</sup>, Хугаева В.К.<sup>1</sup>

## Гистологическое исследование тонкой кишки крысы после хирургического устранения обтурационной тонкокишечной непроходимости и стимуляции лимфотока пептидом

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского», 101000, г. Москва, Россия, Б. Сухаревская пл., д. 3

Оперативное лечение различных заболеваний кишечника сопровождается осложнениями в виде нарушений микроциркуляции в области анастомоза кишки. Ранее нами показана способность лимфостимуляторов пептидной природы восстанавливать нарушенную микроциркуляцию, что послужило основой для настоящего исследования. **Цель работы** — оценка влияния стимуляции лимфотока в стенке кишки на процессы восстановления микроциркуляции, структуры и функции тонкой кишки в области оперативного вмешательства. **Методика.** В экспериментах на наркотизированных крысах (хлоралгидрат в дозе 0,6 г/кг в 0,9% растворе NaCl) моделировали различные поражения тонкой кишки (наложение лигатуры, перевязка 1—3 брыжеечных артерий, перекрут петли кишки вокруг оси брыжейки, сочетание нескольких видов повреждений). Резекция поврежденного участка через 1 сут. с последующим созданием тонкокишечного анастомоза завершалась орошением операционного поля раствором пептида-стимулятора лимфотока (40 мкг/кг массы животного в 1 мл 0,9% раствора NaCl). На 7-е сут. после операции проводили гистологическое исследование фрагмента кишки в области анастомоза. **Результаты.** На 7-е сут. после резекции у выживших животных (летальность вследствие кишечной непроходимости составляла 30%) имеют место морфологические признаки острых сосудистых нарушений стенки кишки, изменений кровеносных и лимфатических микрососудов, интерстициальный отек всех слоев стенки кишки, дилатация просвета кишки, повреждение всасывающего эпителия ворсин с истончением щеточной каемки клеток, морфологические признаки гиперфункции бокаловидных клеток. Использование лимфостимулятора пептидной природы после операции увеличивало выживаемость животных на 24%. У части животных отмечалось уменьшение расширения просвета кишки, у других практически полная его нормализация. Восстанавливалась форма кишечных ворсин и распределение бокаловидных клеток. Отсутствовали признаки внутриклеточного и межмышечного отека. Отмечено умеренное полнокровие венул. **Заключение.** Использование лимфостимулятора при хирургическом лечении кишечной непроходимости увеличивает выживаемость животных на 24% по сравнению с контролем, способствует более раннему восстановлению структуры и функции тонкой кишки. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования стимуляции лимфотока при операциях на кишечнике.

**Ключевые слова:** тонкая кишка, некроз, анастомоз, лимфостимуляция, пептид, гистология.

**Для цитирования:** Коваленко А.А., Титова Г.П., Хугаева В.К. Гистологическое исследование тонкой кишки крысы после хирургического устранения обтурационной тонкокишечной непроходимости и стимуляции лимфотока пептидом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 157—162.

DOI:

**Для корреспонденции:** Хугаева Валентина Каргоевна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции НИИОПП, e-mail: vhugaeva@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.07.2018

Kovalenko A.A.<sup>1</sup>, Titova G.P.<sup>2</sup>, Khugaeva V.K.<sup>1</sup>

## Histological examination of rat small intestine after surgical removal of obturation small bowel obstruction and peptide stimulation of lymph flow

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

<sup>2</sup> N.V. Sklifosovsky Institute of First Aid, Bolshaya Sukharevskaya Pl., 3, Moscow 101000, Russia

Surgical treatment of bowel diseases is associated with complications that cause microcirculatory disturbances in the anastomosis area and may lead to a fatal outcome. This study was based on our previous finding that peptide-type lymphatic stimulators are able to restore impaired microcirculation. The aim of this work was stimulating the lymph flow in the intestinal

wall to facilitate recovery of microcirculation, structure and function of the small intestine in the area of surgical intervention. **Methods.** In experiments on anesthetized rats (0.6 g/kg chloral hydrate in 0.9% NaCl), various small bowel lesions were modeled (bowel ligation, ligation of 1—3 mesenteric arteries, gut torsion, combination of several lesion types). In 24 h, the damaged area was resected, and a small intestine anastomosis was created. The surgery was completed with irrigation of the operative field with a solution of lymph flow stimulating peptide (40 mg/kg body weight in 1 ml of 0.9% NaCl). A gut fragment from the anastomosis area was examined histologically on day 7 after the surgery. **Results.** On the 7th day after removing the intestinal obstruction, the surviving animals (lethality 30%) had morphological signs of acute vascular disorders in the intestinal wall; changes in blood and lymphatic microvessels; interstitial edema of all intestinal wall layers; dilatation of the intestinal lumen; damage to the absorptive epithelium of villi with thinning of the brush border, and hyperfunction of mucous (goblet) cells. The use of the peptide after surgery increased the survival rate of animals by 24% and provided a smaller dilatation of the intestinal lumen in some animals. In other animals, the lumen recovered. The shape of intestinal villi and distribution of goblet cells were restored. Signs of intracellular and intermuscular edema were absent. Moderate venular congestion was noticed. **Conclusion.** Using the lymphatic stimulator in surgical treatment of intestinal obstruction increases the survival rate of animals by 24% compared to the control, facilitates earlier restoration of the small intestine structure and function. The obtained results indicated the effectiveness of lymphatic stimulation in intestinal surgery.

**Keywords:** small intestine, necrosis, anastomosis, lymphatic stimulation, peptide, histology.

**For citation:** Kovalenko A.A., Titova G.P., Khugaeva V.K. Histological examination of rat small intestine after surgical removal of obturation small bowel obstruction and peptide stimulation of lymph flow. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 157—162. (in Russian)

**DOI:**

**For correspondence:** Valentina K. Khugayeva, Doctor of Medical Sciences, Principal Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: vkhugaeva@mail.ru

**Information about authors:**

Khugaeva V.K., <https://orcid.org/0000-0002-3180-8630>

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Received** 20.07.2018

## Введение

В последние десятилетия отмечается увеличение числа желудочно-кишечных заболеваний, сопровождающихся нарушением проходимости кишечника (дивертикулы, кровоизлияния, некроз, перитонит и др. [1—6]). Оперативное лечение таких заболеваний заключается в резекции поврежденного участка кишки и создании энтеро-энтероанастомоза. Одним из частых осложнений подобных операций является нарушение проходимости кишки, разрушение стенки анастомоза на фоне нарушенной микроциркуляции в тканях окружающих анастомоз [7]. Традиционные способы улучшения микроциркуляции в различных органах и тканях при различных заболеваниях заключаются в активации сердечной деятельности, воздействии на стенку кровеносных сосудов, улучшении реологических свойств крови и т.д. Однако осложнения и летальные исходы после операций такого рода остаются высокими [8].

На протяжении последних 35 лет в НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН проводились экспериментальные исследования, показавшие возможность восстановления нарушенной микроциркуляции с по-

мощью стимуляции лимфотока в микро- и макрососудах при использовании опиоидных пептидов — агонистов дельта опиоидных рецепторов [9, 10]. Обнаружена опиоидергическая регуляция лимфатических микрососудов брыжейки тонкой кишки крысы [11]. В экспериментах на животных показана высокая эффективность лейэнкефалина и его аналогов при ишемии мозга [9, 10] воспалении кожи [12], остром отеке легких [13]. Использование в клинической практике отечественного препарата даларгина (аналог лейэнкефалина) для лечения панкреатита и язвенной болезни желудка [14], а также многочисленные экспериментальные исследования с даларгином, показавшие его высокую эффективность [15—17], убедили нас в необходимости изучения наиболее активного лимфостимулятора — аналога лейэнефалина и даларгина, при патологии кишечника с целью предотвращения развития осложнений и смертности при операциях, связанных с резекцией части кишки и наложением кишечного анастомоза. *Цель исследования* — оценка роли активации лимфотока в процессе регенерации стенки кишки, восстановлении нарушенной микроциркуляции и функции тонкой кишки после операционного вмешательства.

## Методика

Эксперименты проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Работа одобрена этическим комитетом ФГБНУ НИИОПП. Использовано 67 белых, беспородных крыс самцов массой 200—260 г. Животных наркотизировали хлоралгидратом (0,6 г/кг в 0,9% растворе NaCl) при внутримышечном введении.

Острую кишечную непроходимость (ОКН) воспроизводили путем перевязки тонкой кишки на расстоянии 5—7 см проксимальнее илеоцекального перехода. На 7-е сут. осуществляли резекцию фрагмента некротизированного участка тонкой кишки в области перевязки с наложением межкишечного анастомоза. В опытной группе после операции поверхность анастомоза и окружающие его ткани орошали раствором пептида в дозе 40 мкг/кг массы животного в 1 мл 0,9% раствора NaCl. Пептид — аналог лейкенкефалина и даларгина, синтезирован в лаборатории синтеза пептидов Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ с условным названием № 171. Контролем служили оперированные животные без использования пептида-лимфостимулятора.

На 7-е сут. после воспроизведения ОКН иссекали проксимальный отрезок тонкой кишки для морфологического исследования. Контрольный и опытный материал подвергался стандартной гистологической обработке. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, проводили РАС-реакцию. Микрофотосъемка осуществлялась с помощью цифровой камеры LEICAЕСЗ при общем увеличении:  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ . Моторика кишечника регистрировалась методом фотометрии [18].

## Результаты и обсуждение

Полученные данные структурных изменений представлены на рис. 1—2. Морфологическое изучение проксимального отрезка тонкой кишки крысы на 7-е сут. после хирургического устранения обтурационной тонкокишечной непроходимости показало сохраняющееся расширение просвета кишки с умеренным уплощением кишечных ворсин и укорочением крипт. Выстилающий кишечные ворсины цилиндрический всасывающий эпителий представлялся вакуолизированным, с просветленной цитоплазмой, истонченной и плохо различимой щеточной каемкой. Слой гликокаликса истончен, многочисленные бокаловидные клетки с признаками выделения секрета в просвет кишки (РАС-реакция). Собственная пластинка

слизистой оболочки кишечных ворсин и криптальных отделов отечна с разобщением гистиоцитарных и лимфоидных клеток. Субэпителиальные капилляры неразличимы. Центральный капилляр и венулы криптальных отделов расширены и полнокровны. В подслизистой основе имеются многочисленные полнокровные венулы, расширенные лимфатические сосуды без видимого содержимого в просвете. Четко прослеживается отек мышечных слоев с полнокровием капилляров внутреннего мышечного слоя, перикапиллярным отеком и разобщением мышечных волокон, что наиболее заметно на поперечных срезах наружного мышечного слоя. На отдельных участках мышечного слоя выражено просветление цитоплазмы мы-

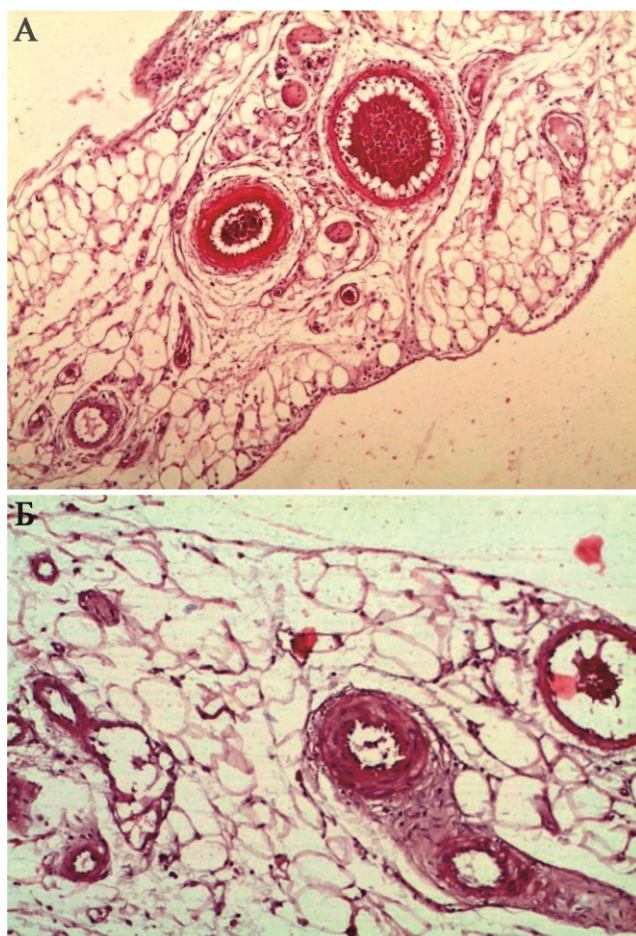


Рис. 1. А — отек жировой ткани брыжеечного края тонкой кишки крысы на 7-е сут. после резекции и создания анастомоза. Острое полнокровие кровеносных микрососудов и расширение просвета лимфатических капилляров. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$ .

Б — влияние лимфостимулирующего пептида на восстановление структуры жировой ткани брыжеечного края кишки крысы на 7-е сут. после резекции и создания анастомоза. Умеренное полнокровие венул, лимфатические микрососуды без дилатации просвета. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$ .

шечных клеток с явлениями миоцитолита и реактивным воспалением. В жировой клетчатке брыжеечного края кишки также сохраняются выраженные признаки острого сосудистого полнокровия, интерстициального отека с расширением лимфатических сосудов без визуализации содержимого в их просвете или наличием эозинофильных масс с единичными лимфоцитами в лимфе. Стенка лимфатических микрососудов представлена только эндотелиоцитами с различными внутрисосудистыми клапанами в отдельных сосудах.

Таким образом, на 7-е сут. после устранения кишечной непроходимости и выживания животных морфологически остаются признаки острых сосудистых изменений в микроциркуляторном русле кровеносных и лимфатических сосудов кишечной стенки, а также интерстициальный отек всех слоев стенки кишки с нарушением дренажной функции лимфатических сосудов. Структурные изменения всасывающего эпителия мышечных ворсин с истончением щеточной каемки

клеток и гиперфункцией слизистых (бокаловидных) клеток указывают на возможное замедление всасывательной функции кишечного эпителия и пристеночно-пищеварения. Отек мышечных слоев стенки кишки с очаговыми повреждениями миоцитов (миоцитолитис) обуславливают нарушение сократительной способности, приводящие к дилатации просвета кишки.

Морфологическое изучение проксимального отрезка кишки на 7-е сут. после устранения обтурационной кишечной непроходимости и использования лимфостимулирующего пептида № 171 показало, что только у части животных сохраняется умеренное расширение просвета кишки. У большей части животных просвет кишки не расширен. Высокие конусообразной формы кишечные ворсины равномерно распределены по всему периметру кишки, выстланы высоким цилиндрическим всасывающим эпителием с равномерно распределенными бокаловидными клетками (рис. 1, 2). У всасывающих эпителиоцитов кишечных ворсин отсутствовали признаки внутриклеточного отека. Они имели высокую четкую щеточную каемку (РАС-реакция) и четкий слой гликокаликса. Бокаловидные клетки, нагруженные секретом, не имели признаков его выделения в просвет кишки. Собственная пластинка слизистой оболочки кишечных ворсин и криптальной зоны имеет равномерно распределенные клеточные элементы с преобладанием лимфоцитов. В криптальных отделах слизистой оболочки и подслизистой основы сохраняются признаки очагового полнокровия венул и четко различимые лимфатические микрососуды с наличием в просвете эозинофильного содержимого в лимфе. На поперечных срезах тонкой кишки четко различимы мышечные слои: широкий внутренний с регулярно расположенными гладкомышечными клетками, разобщенными единичными полнокровными капиллярами, и миоциты наружного слоя без признаков межклеточного отека с хорошо различимыми комплексами межмышечных ганглиозных клеток. В жировой ткани брыжеечного края кишки имеются умеренно полнокровные венулы и артериолы с хорошо различимыми разными по диаметру лимфатическими капиллярами, содержащими лимфу с примесью лимфоцитов в нерасширенном просвете.

Таким образом, в опытной группе на 7-е сут. после устранения обтурационной кишечной непроходимости и применения лимфостимулирующего пептида морфологически четко прослеживается восстановление нарушенного крово- и лимфообращения в стенке тонкой кишки с восстановлением лимфодренажа, регресс интерстициального отека, структурных повреждений всасывающего эпителия и гладкомышечных клеток мышечных слоев, ответственных за сократительную функцию и моторику кишечника. Таким обра-

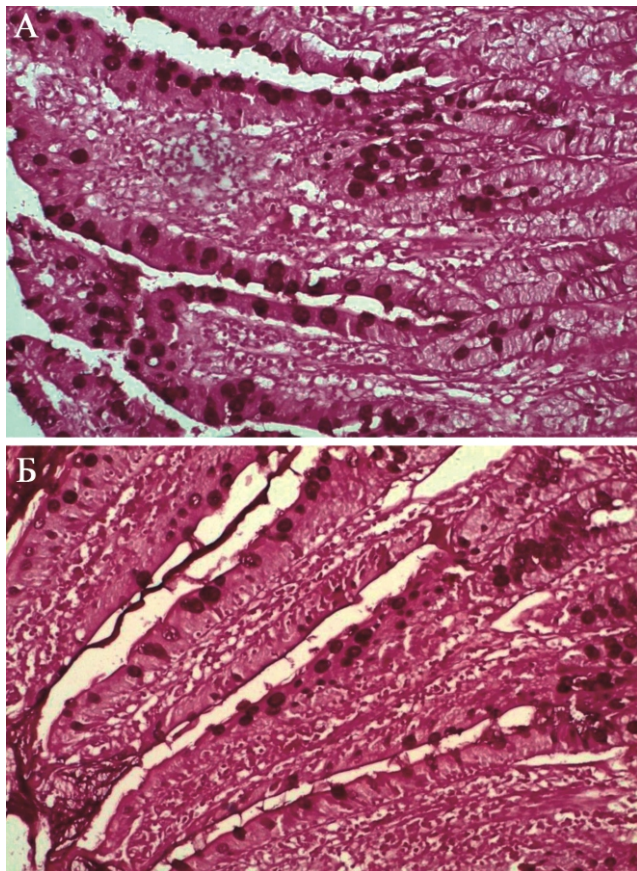


Рис. 2. А — поверхностный эпителий кишечных ворсин крысы на 7-е сут. после резекции и создания анастомоза. Всасывающие эпителиоциты с истонченным слоем гликокаликса и многочисленными бокаловидными клетками. РАС-реакция. Ув. х 200. Б — влияние лимфостимулирующего пептида на восстановление гликокаликса всасывающего эпителия кишечных ворсин на 7-е сут. после резекции и создания кишечного анастомоза. Ув. х 200.



зом, использование лимфостимулирующего пептида при полостных операциях на кишечнике может существенно ускорить восстановление структуры и функции органа благодаря улучшению микроциркуляции, реализующей трофическое обеспечение стенки кишки, и снизить послеоперационную летальность.

### Литература

#### (п.п. 2—6; 16 см. References)

1. Милуков В.Е., Сапин М.Р. Патогенез метаболических нарушений при динамической кишечной непроходимости (Обзор литературы). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2006; 6: 70 — 2.

7. *Острая кишечная непроходимость опухолевой природы. Клинические рекомендации*. Ассоциация колопроктологов России. Ассоциация онкологов России. Российское общество хирургов. М.; 2014.

8. Ермолов А.С. Состояние неотложной помощи при острых хирургических заболеваниях органов брюшной полости в лечебно-профилактических учреждениях города Москвы и меры по ее совершенствованию. *Хирург*. 2011; 8: 4-10.

9. Хугаева В.К., Александров П.Н., Александрин В.В. Микроциркуляция в пилальных сосудах ишемизированного мозга крысы при опиоидной лимфостимуляции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1995; 119(1): 100-5.

10. Хугаева В.К. Нарушение мозгового кровотока при ишемии и его коррекция с помощью лей-энкефалина. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1991; 112(8): 117-20.

11. Хугаева В.К. Участие агонистов и антагонистов опиатных рецепторов в регуляции сократительной активности лимфатических микрососудов брыжейки кишечника крысы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1990; 109(2): 137-40.

12. Ардасенов А.В., Хугаева В.К., Александров П.Н. Микроциркуляторное русло кожи в условиях воспаления и коррекции методом лимфостимуляции. М.; Научный мир; 2004.

13. Султанов Д.В., Хугаева В.К. *Лимфостимулирующее действие препаратов, применяемых при патологии легких. IX Международная конференция «Микроциркуляция и гемореология (От ангиогенеза до центрального кровообращения) 29 июня — 2 июля 2013*. Ярославский государственный университет. 2013.

14. Георгадзе А.К., Бузенков С.В., Джакия А.К. и др. Особенности диагностики и лечения жирового панкреонекроза. *Хирургия*. 1991; 4: 11-4.

15. Рудин И.В. Влияние даларгина на желчеотделительную функцию печени. *Бюллетень сибирской медицины*. 2006; 1: 21-5.

17. Виноградов В.А., Спивак С.Е., Ярыгин К.Н. Опиоидная активность пептидов и заживление ран кожи. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1987; 7: 89-91.

18. Хугаева В.К. Фотометрический метод регистрации моторики кишечника. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1992; 3: 49-50.

1. Milyukov V.E., Sapin M.R. Pathogenesis of metabolic disorders with dynamic intestinal obstruction. *Rossiyskiy zhurnal gastroehnterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2006; 6: 70-2. (in Russian)

2. Bala M., Kashuk J., Moore E.E. Acute mesenteric ischemia: guidelines of the World Society of Emergency Surgery. *World Journal of Emergency Surgery*. 2017; Aug 7:12:38 doi: 10.1186/s13017-017-0150-5.

3. Karas L., Asif M., Chun V. et al. Complicated small bowel diverticular disease: a case series. *BMJ Case Rep*. 2017 Apr 23; 2017. pii: bcr-2017-219699. doi: 10.1136/bcr-2017-219699.

4. Dural A.C., Celik M.F., Yigitbas H. et al. Laparoscopic resection and intracorporeal anastomosis of perforated small bowel caused by fish bone ingestion. *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 2016; Nov; 22(6): 572-574. doi:10.5505/tjtes.2016.88137.

5. Palacios-Zertuche J.T., Guerrero-Hernandez A.J., Salinas-Dominguez R. et al. Case report: Occlusion and intestinal necrosis by obturator hernia. *Cir Cir*. 2016 Dec 16. pii: S0009-7411(16)30121-9. doi: 10.1016/j.circir.2016.11.002. [Epub ahead of print] (in Spanish)

6. Soressa U., Mamo A., Hiko D. et al. Prevalence, causes and management outcome of intestinal obstruction in Adama Hospital, Ethiopia. *BMC Surgery*. 2016; Jun 4; 16(1): 38. doi: 10.1186/s12893-016-0150-5.

7. *Acute intestinal obstruction of tumor nature. Clinical guidelines*. Association of coloproctologists of Russia. Association of oncologists of Russia. Russian society of surgeons. *Ost-raya kishechnaya neprohodimost' opuholevoy prirody. Klinicheskie rekomendatsii*. Assosiatziya koloproktologov Rossii. Assosiatziya onkologov Rossii. Rossiyskoe obshchestvo khirurgov. 2014; 2-29. (in Russian)

8. Ermolov A.S. The state of emergency care for acute surgical diseases of the abdominal cavity organs in the treatment and prophylactic institutions of the city of Moscow and measures for its improvement. *Khirurg*. 2011; 8: 4-10. (in Russian)

9. Khugaeva V.K., Aleksandrov P.N., Alexandrin V.V. Microcirculation in the pial vessels of the rat ischemic brain in opioid lymphostimulation. *Bulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 1995; 119(1): 100-5. (in Russian)

10. Khugaeva V.K. Disturbance of cerebral blood flow in ischemia and its correction with leu-enkephalin. *Bulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 1991; 112(8): 117-20. (in Russian)

11. Khugaeva V.K. The participation of agonists and antagonists of opiate receptors in the regulation of contractile activity of lymphatic microvessels in rat mesentery. *Bulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 1990; 109(2): 137-40. (in Russian)

12. Ardasenov A.V., Khugaeva V.K., Aleksandrov P.N. *Microcirculatory bed of the skin in conditions of inflammation and correction by the method of lymphostimulation. [Mikrotsirkulyatornoe ruslo kozhi v usloviyakh vospaleniya i korrektsii metodom limfostimulyatsii]*. Moscow; Nauchnyy mir, 2004. (in Russian)

13. Sultanov D.V., Khugaeva V.K. *Lymphostimulation the action of the drugs used in lung pathology. IX international conference "Microcirculation and hemoreology (from angiogenesis to Central circulation) 29 June-2 July 2013. [Limfostimuliruyushchee deystvie preparatov, primenyaemykh pri patologii legkikh. IX Mezhdunarodnaya konferentsiya «Mikrotsirkulyatsiya i gemoreologiya (Ot angiogeneza do tsentral'nogo krovoobrashcheniya) 29 iyunya — 2 iyulya 2013.*] Yaroslavl; Yaroslavl state University after K.D. Ushinskiy», 2013; 68. (in Russian)

### References

14. Georgadze A.K., Buzenkov S.V., Dzhakia A.K. et al. Peculiarities of diagnosis and treatment of fatty pancreatic necrosis. *Khirurgiya*. 1991; 4: 11-4. (in Russian)

15. Rudin I.V. Effect of dalargin on liver cholecystectomy. *Bulleten' sibirskoy meditsiny*. 2006; 1: 21-5. (in Russian)

16. Sacerdote P., Limioli E., Gaspani L. Experimental evidence for immunomodulatory effects of opioids.

*Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2003; 521: 106-16.

17. Vinogradov V.A., Spivak S.E., Yarygin K.N. Opioid activity of peptides and healing of skin wounds. *Bulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 1987; 7: 89-91. (in Russian)

18. Khugaeva V.K. Photometric method of registration of intestinal motility. *Patologicheskaya fiziologiya I eksperimental'naya terapiya*. 1992; 3: 49-50. (in Russian)

#### Сведения об авторах:

Коваленко Алексей Анатольевич, гл. врач санатория «Звенигород» Московской обл.;

Титова Галина Павловна, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. электронной микроскопии отдела патологической анатомии НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского;

Хугаева Валентина Каргоевна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП, e-mail: vhugaeva@mail.ru

Мышкин В.А.<sup>1</sup>, Еникеев Д.А.<sup>2</sup>, Габдрахманова И.Д.<sup>2</sup>, Еникеев О.А.<sup>2</sup>, Срубиллин Д.В.<sup>2</sup>, Гимадиева А.Р.<sup>3</sup>

## Церебро-гепатопротекторная активность комплексного соединения янтарной кислоты с 1.3.6-триметил-5-гидроксиурацилом при экспериментальной интоксикации натрия нитритом

<sup>1</sup> ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины и труда и экологии человека», 450106, г. Уфа, Россия, ул. Ст. Кувykiна, д. 94

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450008, г. Уфа, Россия, ул. Ленина, д. 3

<sup>3</sup> ФНБун «Уфимский институт химии» РАН, 450054, г. Уфа, Россия, просп. Октября, д. 71

**Цель работы** — изучение церебро-гепатопротекторного действия комплексного соединения янтарной кислоты с 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацилом (КС) при острой нитритной интоксикации в сравнении с мексидолом. **Методика.** Эксперименты выполнены на крысах-самцах массой 180—240 г. Острую интоксикацию вызывали у крыс подкожным введением 90 мг/кг натрия нитрита. В крови животных определяли уровень гемоглобина, число эритроцитов, общий уровень аденозинтрифосфата (АТФ), активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (г-6-ФДГ), а также количество диеновых конъюгатов (ДК). Маркерами метаболического состояния гепатоцитов служили: активность урoканиназы (УрН), аланин- и аспаратаминотрансферазы (АлАТ, АсАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ), содержание диеновых конъюгатов (ДК) и оснований Шиффа (ОШ). В ткани головного мозга исследовали активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и моноаминоксидазы (МАО), а также содержание ДК и ОШ. Антиоксиданты КС и мексидол вводили в дозе 5 мг/100 г массы тела ежедневно с интервалом в 12 ч в течение 5 сут., начиная с момента введения токсиканта, тестирование осуществлялось на 5-е — 7-е сут. **Результаты.** Установлено, что введение нитрита натрия подавляет активность ферментов антиоксидантной защиты — уровень каталазы и СОД, снижает уровень АТФ и существенно повышает количество ДК в эритроцитах. В крови отравленных крыс выявляется повышенная активность УрН, АлАТ, АсАТ и ЩФ, в ткани печени повышается содержание ДК и ОШ на фоне снижения активности каталазы. В головном мозге у отравленных крыс снижается активность МАО, СДГ и каталазы, увеличивается количество ДК. Установлено, что КС, как и мексидол, в условиях острой интоксикации, моделируемой натрия нитритом, оказывает отчетливо выраженное церебро- и гепатопротекторное действие, но степень их влияния на окислительно-энергетическое состояние эритроцитов различна, причем, эффект КС выше, чем у мексидола. Церебропротекторный эффект КС достигается за счет стабилизации церебральной моноаминоксидазы (МАО), сукцинатдегидрогеназы (СДГ), процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности ферментов антиокислительной защиты. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что протекторная активность КС выше, чем у мексидола. В механизме протекторного эффекта КС важную роль играет мембраностабилизирующее и антиоксидантное действие препарата.

**Ключевые слова:** комплексное соединение янтарной кислоты с 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацилом; мексидол; натрия нитрит; церебропротекторная активность; гепатопротекторная активность; антиоксиданты.

**Для цитирования:** Мышкин В.А., Еникеев Д.А., Габдрахманова И.Д., Еникеев О.А., Срубиллин Д.В., Гимадиева А.Р. Церебро-гепатопротекторная активность комплексного соединения янтарной кислоты с 1.3.6-триметил-5-гидроксиурацилом при экспериментальной интоксикации натрия нитритом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 163—167.  
DOI:

**Для корреспонденции:** Еникеев Дамир Ахметович — зав кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, доктор мед. наук, проф., enikeev@mail.ru.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 12.03.2018

Myshkin V.A.<sup>1</sup>, Enikeev D.A.<sup>2</sup>, Gabdrakhmanova I.D.<sup>2</sup>, Enikeev O.A.<sup>2</sup>, Srubilin D.V.<sup>2</sup>, Gimadieva A.R.<sup>3</sup>

## Cerebro-hepatic protective activity of complex compound of succinic acid with 1.3.6-trimethyl-5-hydroxyuracil in experimental intoxication by sodium nitrate

<sup>1</sup> FBSI «Ufa Scientific Research Institute of Medicine and Labor and Human Ecology», 450106, Ufa, Kuvykiina St., 94

<sup>2</sup> FSBEI «Bashkir State Medical University» of the Ministry of Health of Russia, 450008, Ufa, Lenina St., 3

<sup>3</sup> FSBSI «Ufa Institute of Chemistry» RAS, 450054, Ufa, Prospekt of October, 71

**The aim** of the work was to study the cerebro-hepatoprotective effect of the complex compound of succinic acid with 1,3,6-trimethyl-5-hydroxyuracil (CC) in acute nitrite intoxication in comparison with mexidol. **Methods.** The experiments were carried out on male rats weighing 180—240 g. Acute intoxication was caused in rats by subcutaneous injections of 90 mg/kg of sodium nitrite. Hemoglobin and erythrocytes were studied in the blood of animals, determined the total level of adenosine triphosphate (ATP), the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase (g-6-PDG), and the number of diene conjugates (DC). The markers of the metabolic state of hepatocytes were: the activity of urokinase (UrK), alanine and aspartate aminotransferase (AlAT, AsAT) and alkaline phosphatase (AP), the content of diene conjugates (DC) and Schiff bases (SB). In the brain, the activity of succinate dehydrogenase (SDG) and monoamine oxidase (MAO), as well as the content of DC and SB was investigated. Antioxidant was injected in a dose of 5 mg/100 g of body weight daily with an interval of 12 hours for 5 days, starting from the moment of introduction of the toxicant, testing is carried out on the 5-7th day. **Results.** It has been established, that the introduction of sodium nitrite suppresses the activity of enzymes of antioxidant protection — the level of catalase and SOD, reduces the level of ATP and significantly increases the amount of DC in erythrocytes. In the blood of poisoned rats, an increased activity of UrK, AlAT, AsAT and alkaline phosphatase is detected, the content of DK and SHO increases in the liver tissue in the background of a decrease in catalase activity. In the brain in poisoned rats, the activity of MAO, LDH and catalase decreases, the number of DCs increases. It has been established, that CC, like mexidol, under conditions of acute intoxication, simulated by sodium nitrite, have a cerebro and hepatoprotective effect, positively, but in different degrees, affect the redox energy state of erythrocytes. The cerebroprotective effect of CC is achieved by stabilizing cerebral monoamine oxidase (MAO), succinate dehydrogenase (SDG), lipid peroxidation (LP) and antioxidant protection of enzyme activity. **Conclusions.** The results show that the protective activity of the COP is higher in comparison with the Mexidol. The membrane stabilizing and antioxidant effect plays an important role in the mechanism of the protector effect of the CC.

**Keywords:** complex compound of succinic acid with 1,3,6-trimethyl-5-hydroxyuracil; mexidol; sodium nitrite; cerebroprotective activity; hepatoprotective activity; antioxidants.

**For citation:** Myshkin V.A., Enikeyev D.A., Gabdrakhmanova I.D., Enikeyev O.A., Srubilin D.V., Gimadieva A.R. Cerebro-hepatic protective activity of complex compound of succinic acid with 1,3,6-trimethyl-5-hydroxyuracil in experimental intoxication by sodium nitrate. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 163—167. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** *Enikeyev Damir Akhmetovich*, Head of the Department of Pathophysiology of the Federal State Educational Establishment of Higher Education of Bashkir State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Grand PhD in medicine, Professor, e-mail: enikeyev@mail.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Received** 12.03.2018

## Введение

Известно, что важным звеном патогенеза интоксикации, вызванной введением токсических доз нитрита натрия помимо метгемоглобинемии, является оксидативный стресс. Метгемоглобинизирующее действие токсиканта дополняется его ингибирующим влиянием на активность ферментов дыхательной цепи митохондрий, что ведет к нарушению их функционального состояния и метаболическим расстройствам [1].

Комплексная патогенетическая терапия интоксикационного синдрома при токсическом поражении (ТХМ), помимо специфических средств должна, по-видимому, включать препараты, ограничивающие активацию оксидативного стресса и оказывающие корригирующее влияние на метаболические процессы. К числу таких препаратов можно отнести антиоксиданты, антигипоксанты, а также некоторые субстраты окисления. Среди последних наиболее многообразные возможности в плане метаболической коррекции фун-

кционального состояния и резистентности организма дает янтарная кислота и препараты на ее основе [2]. Однако дефицит фармакологических средств с таким действием сохраняется до сих пор.

## Методика

Эксперименты с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Работа одобрена этическим комитетом университета.

Эксперименты выполнены на крысах-самцах массой 180—240 г. Острую интоксикацию вызывали у крыс подкожным введением 90 мг/кг натрия нитрита. В крови животных исследовали количество гемоглобина и эритроцитов [3]. В эритроцитах определяли общий уровень аденозинтрифосфата (АТФ) [4], активность супероксиддисмутазы (СОД) [5], каталазы (КАТ) [6], глюкозо-6-фосфатдегидрогена-

зы (Г-6-ФДГ) [7], а также количество диеновых конъюгатов (ДК) [8, 9]. Маркерами метаболического состояния гепатоцитов служили: активность уростаниназы (УрН) [10], аланин- и аспаргатаминотрансферазы (АлАТ, АсАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ), которые изучали на биохимическом анализаторе «Епсого» (Австрия). В ткани печени и полушариях головного мозга определяли продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) — диеновые конъюгаты (ДК) и Шиффовы основания (ШО) — спектрофотометрическим и спектрофлуориметрическим методами [5,8,9], активность антиоксидантных ферментов — биохимическими методами [5,6,7]. Гистохимическими методами в головном мозге исследовали активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и моноаминоксидазы (МАО) — по Берстону [11, 12]. Оценку гистохимических реакций проводили на микроскопе с телевизионным анализатором МТ-9. Замеры проводили в 40 полях зрения стандартных площадей срезов органов каждого животного. Исследуемое комплексное соединение и препарат сравнения мексидол — оксиметилэтилперидина сукцинат (2-этил-6-метил-3-оксиперидина сукцинат) ООО МУ «Эллара» вводили животным внутривенно.

Синтез комплексного соединения (КС) янтарной кислоты с 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацилом осуществлен в Институте химии Уфимского научного центра РАН к.х.н. Гимадиевой А.Р. и препарат зарегистрирован в Российской Федерации как антидотное средство (Патент РФ № 2639731). Препаратом сравнения являлся цитопротектор с антиоксидантным механизмом действия 2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридина сукцинат (Мексидол). Антиоксиданты (5 мг/100 г) вводили ежедневно с интервалом 12 ч в течение 5 сут., начиная с момента введения токсиканта. Тестирование осуществляется на 5-е — 7-е сут.

Результаты подвергали статистической обработке. Уровень значимости различий в группах «контроль» и «опыт» определяли с использованием критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при уровне вероятности различий 95% ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

Как видно из данных, представленных в таблице, КС, как и мексидол в условиях интоксикации нитритом натрия проявляет выраженное церебро- и гепатопротекторное действие, однако они в разной степени влияют на окислительно-энергетическое состояние эритроцитов. Церебропротекторный эффект КС достигается за счет стабилизации активности церебральной МАО, СДГ, процессов перекисного окисле-

ния липидов (ПОЛ) и ферментов антиоксидантной защиты.

Протекторная активность КС выше, чем у мексидола. В механизме протекторного эффекта КС важную роль играет мембраностабилизирующее и антиоксидантное действие. Введение нитрита натрия подавляет активность ферментов антиоксидантной защиты — уровень каталазы и СОД, снижает уровень АТФ и существенно повышает количество ДК в эритроцитах.

В крови отравленных крыс выявляется повышенная активность УрН, АлАТ, АсАТ и ЩФ, в ткани печени повышается содержание ДК и ШО на фоне снижения активности каталазы. В головном мозге у отравленных крыс снижается активность МАО, СДГ и каталазы, увеличивается количество ДК (таблица).

Применение мексидола восстанавливает активность МАО и СДГ, но не влияет на содержание ДК, активность каталазы и Г-6-ФДГ в тканях головного мозга. КС нормализует уровень ДК, активность каталазы, но не изменяет активность Г-6-ФДГ (таблица). Введение мексидола оказывает также положительное влияние на содержание в ткани печени ДК и ШО, но не восстанавливает активность ферментов антиоксидантной защиты (каталазы, Г-6-ФДГ).

Применение мексидола не снижает трансферазную активность в крови крыс, отравленных нитритом натрия, но статистически значимо снижает активность ЩФ. В тоже время, эффективность комплексного соединения янтарной кислоты с 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацила — КС по большинству исследованных показателей функциональной активности гепатоцитов выше, чем мексидола (таблица).

Так, введение комплекса с янтарной кислотой, в отличие от мексидола, нормализует или существенно ограничивает токсические эффекты нитрита натрия по показателям активности каталазы, АлАТ и АсАТ.

При введении мексидола и комплексного соединения затравленным нитритом натрия крысам выраженность изменений активности каталазы, СОД и общего уровня АТФ в эритроцитах была статистически значимо ниже, чем в контроле, и приближалась к аналогичным показателям интактных животных (таблица).

Полученные данные свидетельствуют, что в условиях острой интоксикации нитритом натрия препараты, содержащие янтарную кислоту — мексидол и новое комплексное соединение янтарной кислоты с 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацилом — оказывают гепатопротекторное действие, причем комплексное соединение по большинству показателей эффективнее мексидола.

Таблица

Влияние комплексного соединения янтарной кислоты с 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацилом на метаболические показатели эритроцитов головного мозга и печени при острой интоксикации, моделируемой натрием нитритом

Показатель	Группы крыс			
	Интактные (n = 10)	Натрия нитрит (n = 8)	Натрия нитрит + Комплексное соединение (n = 8)	Нитрит + мексидол (n = 8)
<b>Эритроциты</b>				
Диеновые конъюгаты, мкМ/г белка	86,2 ± 4,0	172,8 ± 12,5*	119,2 ± 9,8**	111,5 ± 9,2**
Каталаза, мкМ/мин/г	32,1 ± 1,5	20,6 ± 1,3*	30,2 ± 1,8**	30,8 ± 2,0**
Супероксиддисмутаза, усл.ед/мг белка	1,01 ± 0,05	0,78 ± 0,03*	0,98 ± 0,02**	0,93 ± 0,08**
АТФ мкМ/мл эритроцитов	1,8 ± 0,19	0,7 ± 0,01*	1,5 ± 0,12**	1,3 ± 0,08**
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, нМ/мин/мг белка	14,5 ± 0,50	12,8 ± 0,66	15,8 ± 0,53	13,8 ± 0,48
<b>Головной мозг</b>				
Диеновые конъюгаты, усл.ед.опт.пл	0,203 ± 0,07	0,317 ± 0,078*	0,213 ± 0,05**	0,252 ± 0,15
Каталаза, мМ/мин/мг белка	1,18 ± 0,022	1,02 ± 0,04*	1,19 ± 0,012**	1,19 ± 0,017**
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, нМ/мин/мг белка	19,7 ± 0,70	21,6 ± 0,90	20,9 ± 0,66*	20,3 ± 0,90
Моноаминоксидаза, усл.ед.	7,99 ± 0,17	7,34 ± 0,12*	4,90 ± 0,10**	7,87 ± 0,10**
Сукцинатдегидрогеназа, усл.ед.	8,50 ± 0,19	7,88 ± 0,16*	8,48 ± 0,11**	8,38 ± 0,012**
<b>Печень</b>				
Уроканиназа, мкМ/с*л	1,2 ± 0,8	2,2 ± 0,8	1,9 ± 0,5	1,8 ± 0,45
Аланинаминотрансфераза, мМ/ч*л	3,5 ± 0,12	9,7 ± 0,38*	5,2 ± 0,33**	6,8 ± 1,42*
Аспаратаминотрансфераза, мМ/ч*л	1,0 ± 0,06	3,6 ± 0,4*	2,0 ± 0,6**	3,4 ± 1,3*
Щелочная фосфатаза, мМ/ч*л	16,5 ± 2,8	29,6 ± 0,66*	22,3 ± 0,5**	20,5 ± 0,78**
Диеновые конъюгаты, усл.ед.опт.пл.	0,454 ± 0,022	0,618 ± 0,032*	0,478 ± 0,033**	0,488 ± 0,05**
Шиффовы Основания, усл.ед/мг	0,33 ± 0,02	0,52 ± 0,03*	0,38 ± 0,05**	0,40 ± 0,09**
Каталаза, мМ/мин/мг белка	328 ± 24	222 ± 19*	265 ± 23**	248 ± 28*
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, нМ/мин/мг белка	54,6 ± 2,6	66,2 ± 2,8	77,8 ± 3,2* **	62,5 ± 3,4

Церебропротекторное действие комплексного соединения реализуется путем стабилизации активности церебральной MAO и СДГ.

Сравнение гепатопротекторной эффективности мексидола и комплексного препарата КС свидетельствует в пользу второго, что согласуется с данными о высокой гепатозащитной активности комплексного соединения на модели поражения печени тетрахлометаном [13, 14].

Сохранение окислительно-энергетического потенциала эритроцитов под влиянием препаратов положительно влияет на функциональную устойчивость транспортной системы крови и ее адапционных возможностей и способствует повышению резистентности организма при экстремальных воздействиях токсического генеза. Целесообразны дальнейшие исследования протекторной эффективности и механизма действия комплексного сое-

динения янтарной кислоты с 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацилом.

### Заключение

КС янтарной кислоты с 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацилом оказывает органопротективное действие, превосходящее аналогичный эффект мексидола. Исследованные маркеры дисфункции на фоне применения КС в условиях интоксикации достигают уровня интактных крыс. С целью наиболее полной оценки воздействия интоксикации на организм животных перспективно дальнейшее изучение влияния препарата на молекулярно-патологические изменения в других органах- сердце, легких и почках с целью совершенствования фармакологической коррекции токсических повреждений нитритами.

## Литература

1. Куценко С.А. *Основы токсикологии*. СПб.; Фолиант; 2004. 720 с.
2. Ивницкий Ю.Ю., Головкин А.М., Софронов Г.А. *Янтарная кислота в системе средств метаболической коррекции функционального состояния и резистентности организма*. СПб.; Лань; 1998.
3. Меньшикова В.В., ред. *Лабораторные методы исследования в клинике*. М.; Медицина; 1987.
4. Виноградова И.Л., Баряниева С.Ю., Дервиз Г.В. Метод одновременного определения 2,3 ДФГ и АТФ в эритроцитах. *Лабораторное дело*. 1980; 7: 424-6.
5. Плацер З., Видланова М., Кушелева Л. Процессы перекисного окисления липидов при повреждении и ожирении печени. *Чехословацкое медицинское обозрение*. 1970; 16(1): 30-41.
6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16-28.
7. Glock G., McLean P. Further studies on the properties and of glucosae-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem*. 1953; 55(3): 400-8.
8. May H.E., Reed D.J. A kinetic assay of TPNH-dependent microsomal lipid peroxidation by changes in different spectra. *Abal. Biochem*. 1973; 55(2): 331-337.
9. Tappel A.K. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc*. 1973; 32(8): 1870-4.
10. Мардашов С.Р., Буробин В.А. Обнаружение урoкиназы в крови при отравлении четыреххлористым углеродом. *Вопросы медицинской химии*. 1963; 7: 93-4.
11. Берстон М. *Гистохимия ферментов*. М.; Мир; 1965.
12. Пирс Э. *Гистохимия: теоретическая и прикладная*. М.: Мир; 1962.
13. Мышкин В.А., Еникеев Д.А., Срубиллин Д.В., Репина Э.Ф., Гимадиева А.Р., Габдрахманова И.Д. Защита печени оксиметилурацилом и производными янтарной кислоты при воздействии тетрахлорметаном в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(3): 92-7.
14. Мышкин В.А., Еникеев Д.А., Габдрахманова И.Д., Срубиллин Д.В., Гимадиева А.Р., Репина Э.Ф. Влияние комплексных соединений метилпроизводных 5-гидроксиурацила с янтарной кислотой на антиоксидантную систему и морфо-функциональное состояние печени старых крыс при воздействии тетрахлорметана. *Патогенез*. 2017; 15(2): 52-

## Сведения об авторах:

**Мышкин Владимир Александрович**, доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. отдела токсикологии, ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека»;

**Еникеев Дамир Ахметович**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, e-mail: enikeev@mail.ru;

**Габдрахманова Инга Данировна**, врач-невролог РКБ № 2 г. Уфы, аспирант каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ;

**Еникеев Олег Анатольевич**, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, канд. мед. наук, канд. юр. наук;

**Срубиллин Дмитрий Витальевич**, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ,

**Гимадиева Альфия Раисовна**, канд. хим. наук ст. науч. сотр. лаб. фармакофорных циклических систем ФГБУН Уфимского Института химии РАН.

## References

1. Kutsenko S.A. *Basics of Toxicology [Osnovy toksikologii]*. SPb.; Foliant; 2004. (in Russian)
2. Ivnitkiy Yu.Yu., Golovko A.M., Sofronov G.A. *Amber acid in the system of means of metabolic correction of the functional state and resistance of the organism*. SPb.; Lan'; 1998. (in Russian)
3. Men'shikova V.V., red. *Laboratory methods of research in the clinic*. Moscow; Meditsina; 1987. (in Russian)
4. Vinogradova I.L., Baryanieva S.Yu., Derviz G.V. The method of simultaneous determination of 2,3 DFG and ATP in erythrocytes. *Laboratornoe delo*. 1980; 7: 424-6. (in Russian)
5. Platser Z., Vidlanova M., Kusheleva L. Processes of lipid peroxidation in liver damage and obesity. *Chechoslovatskoe meditsinskoe obozrenie*. 1970; 16(1): 30-41. (in Russian)
6. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16-28. (in Russian)
7. Glock G., McLean P. Further studies on the properties and of glucosae-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem*. 1953; 55(3): 400-8.
8. May H.E., Reed D.J. A kinetic assay of TPNH-dependent microsomal lipid peroxidation by changes in different spectra. *Abal. Biochem*. 1973; 55(2): 331-7.
9. Tappel A.K. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc*. 1973; 32(8): 1870-4.
10. Mardashov S.R., Burobin V.A. Detection of urokinase in the blood during poisoning with carbon tetrachloride. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1963; 7: 93-4. (in Russian)
11. Berston M. *Histochemistry of enzymes*. Moscow; Mir; 1965. (in Russian)
12. Pirs E. *Histochemistry: theoretical and applied*. Moscow; Mir; 1962. (in Russian)
13. Myshkin V.A., Enikeev D.A., Srubilin D.V., Repina E.F., Gimadieva A.R., Gabdrakhmanova I.D. Protection of the liver with oxymethyluracil and succinic acid derivatives when exposed to carbon tetrachloride in an experiment. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(3): 92-7. (in Russian)
14. Myshkin V.A., Enikeev D.A., Gabdrakhmanova I.D., Srubilin D.V., Gimadieva A.R., Repina E.F. Effect of complex compounds of methyl derivatives of 5-hydroxyuracil with succinic acid on the antioxidant system and the morpho-functional state of the liver of old rats exposed to carbon tetrachloride. *Patogenez*. 2017; 15(2): 52-6. (in Russian)

Ганина Е.Б.<sup>1</sup>, Червинец Ю.В.<sup>1</sup>, Грудинин Н.В.<sup>1</sup>, Шестакова В.Г.<sup>1</sup>, Червинец В.М.<sup>1</sup>, Миронов А.Ю.<sup>2</sup>

## Новый подход к лечению стоматита белых крыс (экспериментальное исследование)

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, 170100, г. Тверь, Россия, ул. Советская д. 4

<sup>2</sup> ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия, ул. Адмирала Макарова, д. 10

**Цель исследования** — охарактеризовать микробиологическую картину стоматита до и после его лечения высокоактивными культурами лактобацилл, дать оценку эффективности их применения при экспериментальном стоматите. **Методика.** Опыты проводились на 32 самках беспородных белых крыс массой 230 г. Моделирование стоматита включало 2 этапа: моделирование травматического стоматита и воспроизведение бактериального стоматита на базе травматического. У крыс контрольной и опытных серий на всех этапах эксперимента брали мазки с поверхности десен для характеристики микробиоценоза ротовой полости. **Результаты.** После обработки слизистой оболочки полости рта (СОПР) культурой патогенного штамма *Staphylococcus aureus* существенно снизились частота встречаемости и количество условно-патогенных микроорганизмов. Лечение стоматита у крыс культурами лактобацилл (*Lactobacillus* 11 зв., *Lactobacillus* 2 п.рта, *Lactobacillus* 24 д.ст.) и их комбинацией приводило к снижению распространенности *S. aureus* вплоть до его исчезновения, а также к нормализации количества условно-патогенной микрофлоры. **Заключение.** Исследования показали эффективность использования отдельных высокоактивных штаммов лактобацилл или их комбинации при лечении заболеваний СОПР, в частности бактериального стоматита.

**Ключевые слова:** слизистая оболочка полости рта; стоматит; *Staphylococcus aureus*; микробиоценоз; лактобациллы.

**Для цитирования:** Ганина Е.Б., Червинец Ю.В., Грудинин Н.В., Шестакова В.Г., Червинец В.М., Миронов А.Ю. Новый подход к лечению стоматита белых крыс (экспериментальное исследование). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 168—173.

DOI:

**Для корреспонденции:** Ганина Екатерина Борисовна, аспирант кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России; e-mail: katena-ganina@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.07.2018

Ganina E.B.<sup>1</sup>, Chervinets Yu.V.<sup>1</sup>, Grudin N.V.<sup>1</sup>, Shestakova V.G.<sup>1</sup>, Chervinets V.M.<sup>1</sup>, Mironov A.Yu.<sup>2</sup>

## A new approach to treatment of stomatitis in experiments on white rats (experimental research)

<sup>1</sup> Tver State Medical University, Sovetskaya Str. 4, Tver 170100, Russia

<sup>2</sup> G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Admirala Makarova Str. 10, 125212, Moscow, Russia

**Aim.** To characterize the microbiological picture of stomatitis in intact rats before and after the treatment with highly active cultured lactobacilli and to evaluate the effectiveness of this treatment in experiments on white rats. **Methods.** Experiments were carried out on 32 mongrel female white rats weighing 230 g. Smears were taken from the gum surface of control and experimental rats at all stages of the experiment to characterize the oral cavity microbiocenosis. **Results.** After treatment of the oral cavity with cultured *Staphylococcus aureus*, the occurrence and quantity of opportunistic microorganisms significantly decreased. The treatment of stomatitis in rats with cultured lactobacillus (*Lactobacillus* 11 zv., *Lactobacillus* 2 p.r., *Lactobacillus* 24 d.st. and their combination) led to a decrease in *S. aureus* prevalence up to its extinction and to normalization of the quantitative composition of opportunistic microbiota. **Conclusions.** The study showed the efficacy of highly active lactobacillus strains individually or their combinations in the treatment of oral diseases, in particular, bacterial stomatitis.

**Keywords:** mucous membrane of the oral cavity; stomatitis; *Staphylococcus aureus*; microbiocenosis; lactobacilli.

**For citation:** Ganina E.B., Chervinets Yu.V., Grudin N.V., Shestakova V.G., Chervinets V.M., Mironov A.Yu. A new approach to treatment of stomatitis in experiments on white rats (experimental research). *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 168—173.

DOI:



**For correspondence:** Ganina Ekaterina Borisovna, post-graduate student of the department of microbiology and virology with the course of immunology, Tver State Medical University, RF; e-mail: katena-ganina@mail.ru

#### Information about authors:

Ganina E.B., <https://orcid.org/0000-0002-8686-8526>;  
Chervinets Yu.V., <https://orcid.org/0000-0001-9209-7839> ;  
Grudinin N.V., <https://orcid.org/0000-0003-1100-9513>;  
Shestakova V.G., <https://orcid.org/0000-0003-1136-7396>;  
Chervinets V.M., <https://orcid.org/0000-0001-6549-0010>;  
Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-523>.

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Received** 10.07.2018

## Введение

Нарушение микробиоты полости рта способствует развитию многих стоматологических заболеваний<sup>1</sup>. В настоящее время в структуре всех заболеваний слизистой оболочки полости рта (СОПР) преобладают стоматиты. За последние 36 лет распространенность стоматита среди населения России увеличилась в 10 раз — с 5% до 53% [1—3]. Дисбиотические изменения, сопровождающие стоматиты, оказывают негативное влияние на микробиоценоз СОПР, что отягощает течение воспалительных процессов как мягких, так и твердых тканей полости рта.

Разработка и внедрение в медицинскую практику новых высококачественных пробиотических препаратов, основу которых составляют региональные биоварианты лактобацилл, особенно актуальны в сложившейся ситуации [4].

Для изучения качественной и количественной характеристики микробиоценоза полости рта незаменимо экспериментальное моделирование на животных. Оценка способности культур лактобацилл восстанавливать микробиоценоз ротовой полости доказывает целесообразность и эффективность новых способов лечения инфекционно-воспалительных процессов различной этиологии в полости рта.

**Цель работы** — охарактеризовать в эксперименте на белых крысах микробиологическую картину стоматита до и после его лечения высокоактивными культурами лактобацилл и дать оценку эффективности их применения.

## Методика

Эксперимент выполнен на 32 самках беспородных белых крыс массой 230 г. На проведение опыта получено разрешение этического комитета ФГБОУ ВО

Тверской ГМУ Минздрава России. Содержание, питание, уход за животными проводили в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755). Все крысы содержались в одинаковых условиях температуры, влажности, освещения, рациона питания (комбикорм ПК-120-1, Россия). В экспериментах *in vitro* показано, что штаммы лактобацилл, выделенные из полости рта здоровых людей, обладают высокой антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [6].

На первом этапе нами моделировался травматический стоматит путём нанесения в виде аппликации на десну 9% уксусной кислоты (УК) на СОПР 2 раза в сутки на протяжении 3 сут. [5]. Второй этап — на 4-е сут. на базе травматического стоматита воспроизвели бактериальную модель стоматита путём однократной обработки поврежденной слизистой культурой *S. aureus* (концентрация  $1,5 \times 10^8$  клеток/мл по Мак-Фарланду). Патогенный штамм выделен из зева здорового ребенка 8 лет. На первом и втором этапах все животные подвергались одинаковому воздействию. На третьем этапе крысы были разделены на 5 серий (8 крыс в контрольной и по 6 — в опытных сериях): 1 — без лечения (контрольная), 2 — лечение *Lactobacillus* 11 зв. (опытная № 1), 3 — лечение *Lactobacillus* 2 п. рта (опытная № 2), 4 — лечение *Lactobacillus* 24 д. ст. (опытная № 3), 5 — лечение комбинацией всех 3 культур лактобацилл (опытная № 4). Начиная с 5-х сут. эксперимента ротовую полость опытных крыс обрабатывали в течение 7 сут. 2 раза в день соответствующими культурами *Lactobacillus* (концентрация  $1,5 \times 10^8$  клеток/мл по Мак-Фарланду), *Lactobacillus* 11 зв., *Lactobacillus* 2 п. рта, *Lactobacillus* 24 д. ст., а также комбинацией

<sup>1</sup> Ключева Л.А. Микробиологические нарушения и их коррекция при хроническом рецидивирующем афтозном стоматите (на примере города Сургута): дис. на соиск. учен. степ. канд. мед. наук (03.00.16) / Ключева Лидия Александровна; ГОУ ВПО Сургутский Государственный Университет Ханты-Мансийского АО. Сургут, 2005.

всех 3 культур лактобацилл с целью лечения бактериального стоматита.

У крыс всех серий брали мазки с слизистой дёсен для проведения микробиологического исследования. Мазки брали до применения УК (интактные крысы), на 4-е сут. применения УК, на следующие сутки после обработки *S. aureus*, на 1-е, 4-е и 7-е сут. лечения культурами лактобацилл. Посевы осуществляли на среду Эндо, на желточно-солевой и кровяной агар (Hi-Media, Индия) и инкубировали в аэробных и анаэробных условиях с применением микроаэроостатов и газогенераторных пакетов Gas Pack Plus (BBL, США) при 37°C в течение 18—24 ч. [7]. Исследования осуществляли на программно-аппаратном комплексе Диаморф Цито (ДиаМорф, Россия).

Для оценки статистической значимости использовали парный критерий Стьюдента и дисперсный анализ повторяющихся изменений. Различия показателей считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Все животные были осмотрены перед началом эксперимента. Признаков воспалительного процесса или каких-либо иных патологических изменений обнаружено не было. У интактных крыс со слизистой дёсен в большинстве случаев высевались следующие аэробные и анаэробные микроорганизмы (рис. 1): *Streptococcus spp.* (частота встречаемости — 96%; количество — 3,7 lg КОЕ/мл), *Staphylococcus spp.* (94%; 3 lg КОЕ/мл), *Enterobacteriaceae* (82%, 2 lg КОЕ/мл), *Bacillus spp.* (59%; 2 lg КОЕ/мл), *Peptostreptococcus spp.* (96%; 4,2 lg КОЕ/мл). Другие условно-патогенные бактерии, *Lactobacillus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Peptococcus spp.*,

*Veillonella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*, встречались с меньшей частотой и в меньших количествах. Распространенность и количество *S. aureus* у интактных крыс были относительно невысокими (31%; 0,7 lg КОЕ/мл).

На 4-е сут. эксперимента (после 3-дневной обработки УК) у всех крыс при визуальном осмотре слизистых оболочек дёсен отмечался отёк и выраженная гиперемия. Частота встречаемости *S. aureus* по сравнению с интактными животными увеличилась незначительно — с 31% до 50%, так же, как *Enterococcus spp.* — с 14% до 50%. Распространенность бактерий рода *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella* и семейства *Enterobacteriaceae* возросла до 100%. Частота встречаемости *Bacillus spp.* несколько снизилась с 59% до 50%. Бактерии рода *Peptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, встречающиеся с небольшой частотой у интактных крыс, после обработки УК не выявлены. Количество, так же как и распространенность, *S. aureus* до и после применения уксусной кислоты незначительно увеличилось с 0,7 до 0,8 lg КОЕ/мл (рис. 1). Количество аэробных и анаэробных бактерий, напротив, значительно увеличилось: *Staphylococcus spp.* — с 3 до 4,3 lg КОЕ/мл; *Lactobacillus spp.* — с 2,7 до 3,3 lg КОЕ/мл, семейства *Enterobacteriaceae* — с 2 до 3,8 lg КОЕ/мл, *Peptostreptococcus spp.* — с 4,2 до 6 lg КОЕ/мл, *Prevotella spp.* — с 0,4 до 3,9 lg КОЕ/мл и *Enterococcus spp.* — с 0,4 до 1,4 lg КОЕ/мл. Исключение составляли бактерии рода *Streptococcus* и *Bacillus*, количество которых осталось на прежнем уровне (3,8 и 2 lg КОЕ/мл соответственно).

На 5-е сут. эксперимента (спустя сутки после обработки СОПР крыс культурой *S. aureus*) были зафиксированы внешние признаки воспалительного процесса, что свидетельствует о развитии бактериального стоматита. У всех крыс при осмотре полости рта обнаружено нарастание признаков воспаления слизистых оболочек дёсен (выраженная гиперемия и отёк, петехии, сформированные гнойные очаги). У многих животных в области резцової части десны нижней челюсти сформировался инфильтрат с гнойными наложениями. Частота встречаемости *S. aureus* резко возросла с 50 до 100%. В то же время распространенность других условно-патогенных микроорганизмов снижалась: *Staphylococcus spp.* и *Streptococcus spp.* с 100 до 80%; *Lactobacillus spp.* и *Enterobacteriaceae* — с 100 до 94 и 71% соответственно; *Peptostreptococcus spp.* — с 100 до 94%; *Bacillus spp.* и *Enterococcus spp.* — 50% до 31% и 37% соответственно; а бактерии рода *Prevotella* — вообще исчезли. Однако представители рода *Peptococcus* (31%), *Veillonella* (6%), *Fusobacterium* (3%), *Bacteroides*

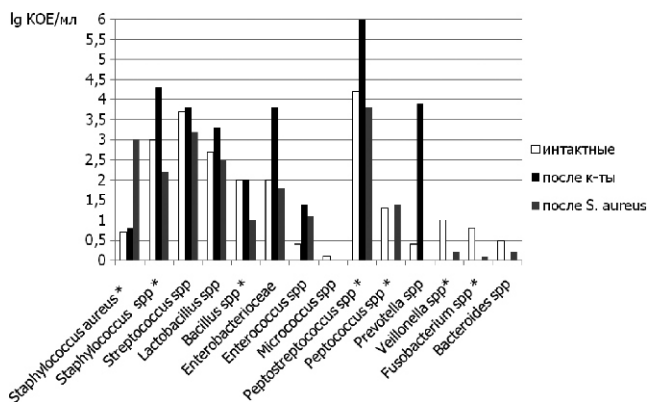


Рис. 1. Количество микроорганизмов в ротовой полости у интактных крыс, после воздействия уксусной кислоты и культуры *S. aureus*. Различия по количеству указанных микроорганизмов (\*) были статистически значимыми в группе сравнения между интактными крысами и после воздействия кислоты и культуры *S. aureus* по парному критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

(11%), не обнаруженные после обработки УК, появились вновь, но с небольшой частотой встречаемости. В количественном отношении самый высокий показатель был обнаружен у бактерий *S. aureus*, количество которого возросло с 0,8 до 3 lg КОЕ/мл. Количество остальных условно-патогенных микроорганизмов уменьшилось: *Peptostreptococcus spp.* с 6 до 3,8 lg КОЕ/мл, *Streptococcus spp.* — с 3,8 до 3,2 lg КОЕ/мл, *Staphylococcus spp.* — с 4,3 до 2,2 lg КОЕ/мл, *Lactobacillus* с 3,3 до 2,5 lg КОЕ/мл, *Enterobacteriaceae* с 3,8 до 1,8 lg КОЕ/мл, *Bacillus spp.* с 2 до 1 lg КОЕ/мл и *Enterococcus spp.* с 1,4 до 1,1 lg КОЕ/мл.

Появились в незначительном количестве не превышающем 1,4 lg КОЕ/мл представители родов *Peptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium* и *Bacteroides* (рис. 1). Данные, полученные после лечения стоматита высокоактивными штаммами лактобацилл, представлены на рис. 2. Прежде всего, акцент делается на влиянии лактобацилл на культуру *S. aureus*, как причину развития бактериального стоматита у крыс. На 6-е сут. (через 1 сут. после первой обработки полости рта лактобациллами) и до окончания эксперимента (12-е сут.) при внешних осмотрах выявлено уменьшение отека и инфильтрации мягких тканей десны, снижение числа гнойных очагов и эрозий в ротовой полости крыс вплоть до полного их исчезновения. Частота встречаемости *S. aureus* снизилась с 100% и колебалась от 40 до 83% при использовании отдельных видов лактобацилл и до 67% при их комбинации. Количество *Staphylococcus aureus* снизилось с 3 lg КОЕ/мл и колебалась от 0,9 до 1,5 lg КОЕ/мл — при применении отдельных видов лактобацилл и до 1,2 lg КОЕ/мл — их комбинации (рис. 2).

На 4-е сут. лечения *S. aureus* исчез у крыс двух опытных серий, за исключением серии № 3 и 4, которых лечили культурой *Lactobacillus 24* д. ст. и комбинацией лактобацилл (частота встречаемости *S. aureus* — 50% и количество — 0,9 и 1,2 lg КОЕ/мл). На 7-е сут. лечения *S. aureus* был обнаружен только у 50% крыс опытной серии № 3, обрабатываемых *Lactobacillus 24* д. ст., в количестве 0,9 lg КОЕ/мл, что практически соответствует показателям интактных крыс. В контрольной серии частота встречаемости и количество *S. aureus* вернулись к показателям нормы лишь на 12-е сут., составив 50% и 0,5 lg КОЕ/мл (рис. 2).

Встречаемость бактерий рода *Lactobacillus* во всех опытных сериях на протяжении 7 сут. лечения культурами лактобацилл составила 100%, превышая показатели интактных крыс. Однако количество лактобацилл к 7-м сут. постепенно снизилось с 3,1 до 1,4 lg КОЕ/мл, что соответствует количественным показателям до начала эксперимента. Распространен-

ность *Lactobacillus spp.* в контрольной серии на 8-е и 10-е сут. составила по 50%, что было существенно ниже показателей опытных крыс и приближалось к показателям интактных животных. Количество лактобацилл контрольной серии снизилось до 1,3 lg КОЕ/мл и стало соответствовать количеству таковых в экспериментальных группах к концу лечения, но было меньше этого значения у интактных крыс (рис. 2).

Распространенность *Staphylococcus spp.* Через 1 сут. после обработки лактобациллами практически вернулась к показателям интактных животных и колебалась от 50 до 100%, а с 4-х сут. лечения составила 100%, так же, как и в контрольной группе. Количество стафилококков в течение 7 сут. колебалось от 1,1 (при комбинации лактобацилл) до 3,1 lg КОЕ/мл (отдельные культуры лактобацилл), что соответствует показателям интактных животных. Количество *Staphylococcus spp.* в контрольной серии к 10-м сут. превышало показатели до эксперимента, составив 3,7 lg КОЕ/мл (рис. 2).

Частота встречаемости *Streptococcus spp.* в процессе лечения уменьшилась до 50% (*Lactobacillus 11* зв., *Lactobacillus 2* п. рта, *Lactobacillus 24* д. ст.) вплоть до их исчезновения (при комбинации лактобацилл). Количество было непостоянным и изменялось в диапазоне от 4,2 lg КОЕ/мл в начале лечения до 1,7 lg КОЕ/мл к его завершению вплоть до их исчезновения, что существенно ниже нормы. В контрольной серии частота встречаемости стрептококков (100%), так же, как и их количество (4 lg КОЕ/мл), практически соответствовало показателям интактных крыс (рис. 2).

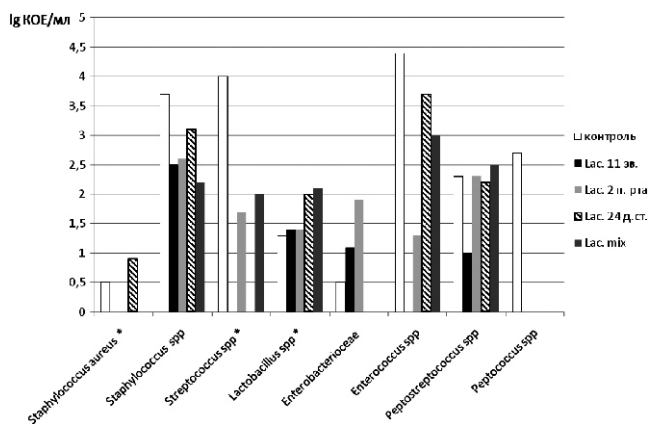


Рис. 2. Количество микроорганизмов в ротовой полости крыс контрольной и опытных серий на 7-е сут. после воздействия *S. aureus*. Различия по количеству указанных микроорганизмов (\*) были статистически значимыми в группе сравнения между контрольной (без лечения) и опытными группами (после применения разных культур лактобацилл) при  $p < 0,05$  (дисперсный анализ повторяющихся изменений).

Показатели частоты встречаемости количества бактерий рода *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Enterococcus* и семейства *Enterobacteriaceae* гораздо быстрее возвращались к исходным значениям при использовании культур лактобацилл, чем без них. В незначительном количестве (не превышающем  $1,4 \lg$  КОЕ/мл) появились представители родов *Veillonella*, *Fusobacterium* и *Bacteroides*.

У крыс контрольной серии, на слизистые дёсен которых воздействовали кислотой и культурой *S. aureus*, но не проводили лечение культурами *Lactobacillus*, клинические проявления были ярче, продолжительность воспалительного процесса дольше и к 12-м сут. у половины животных обнаруживалось присутствие возбудителя. В опытных сериях (лечение культурами *Lactobacillus*), в 100% случаев к окончанию эксперимента признаки воспаления слизистых дёсен отсутствовали.

В доступной литературе недостаточно сведений о полной микробиологической картине, характеризующей интактную слизистую, а также до и после лечения стоматита. В своём исследовании мы дополнили результаты других авторов, описав микробиоту СОПР здоровых крыс и страдающих травматическим и бактериальным стоматитом, а также в процессе и после лечения высокоактивными штаммами лактобацилл.

Проведенные нами и рядом исследователей эксперименты [8], выявили следующие изменения микробиоты СОПР крыс. У здоровых животных наибольшая частота встречаемости и количество микроорганизмов отмечались у аэробов *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus spp.* и анаэробов *Peptostreptococcus spp.*, в то время как *S. aureus* имел низкие показатели. Обработка СОПР уксусной кислотой привела к повышению в 1,5—2 раза количества всех условно-патогенных микроорганизмов. Количественные показатели *S. aureus* увеличились незначительно. После применения культуры *S. aureus* все показатели большинства указанных микроорганизмов снизились.

На базе модели стафилококкового стоматита нами были получены данные, которые позволяют оценить эффективность его лечения у крыс высокоактивными штаммами лактобацилл [9], которые, прежде всего, оказывают влияние на *S. aureus* как основную причину развития бактериального стоматита. Спустя 1 сут. после первой обработки полости рта лактобациллами частота встречаемости *S. aureus* снизилась в среднем до 67%, на 4-е сут. лечения *S. aureus* исчез у крыс двух опытных серий, на 7-е сут. — был обнаружен только у 50% крыс опытной серии № 3. В контрольной серии распространенность и количество *S. aureus* вернулись к показателям интактных крыс лишь на 12-е сут.

Таким образом, наши исследования показали целесообразность использования высокоактивных культур лактобацилл (*Lactobacillus 11* зв., *Lactobacillus 2* п. рта, *Lactobacillus 24* д. ст.) или их комбинации для лечения заболеваний полости рта, в том числе стоматита, вызванного *S. aureus*.

## Литература

1. Рыбаков А.И., Банченко Г.В. *Заболевания слизистой оболочки полости рта*. М.; Медицина; 1978.
2. Дзугаева И.И., Умарова К.В. Анализ структуры заболеваний слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ, регистрируемых у взрослого населения на приеме в типовой стоматологической поликлинике. *Российский стоматологический журнал*. 2014; 5: 50 — 2.
3. Тидген К.В. Новые аспекты в профилактике осложнений острого герпетического стоматита у детей. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 3-4: 697 — 9.
4. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Миронов А.Ю., Ботина С.Г., Гагарина Е.Ю., Самоукина А.М. и др. Индигенные лактобациллы полости рта человека — кандидаты в пробиотические штаммы. *Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье»*. 2012; 1: 131 — 37.
5. Ганина Е.Б., Червинец Ю.В., Шестакова В.Г., Грудинин Н.В., Кузнецова В.С., Прутенская Е.А. Гистологическая картина стоматита в эксперименте на крысах. *Современные проблемы науки и образования*. 2017; 5; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=26783>
6. Червинец Ю.В., Червинец В.М. Пробиотический и адаптационный потенциал лактобацилл, перспективных для конструирования эффективных пробиотических препаратов. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016; 126(2): 108.
7. Воробьев А.А. *Медицинская микробиология, вирусология и иммунология*. М.; Мед. информ. Агентство; 2004.
8. Ярцева А.А., Степанов А.В., Гребенюк А.Н., Антушевич А.Е., Антонов В.Г. Состояние микробиоценоза полости рта экспериментальных животных, подвергшихся комбинированному воздействию повреждающих факторов химиолучевой терапии. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2014; 1(45): 105-9.
9. Кузнецова В.С., Ганина Е.Б., Червинец Ю.В. *Лечение стоматита высокоактивными штаммами лактобацилл в эксперименте на животных*. В кн.: *Материалы XVI-й международной конференции студентов и молодых ученых и I Форума молодежных научных обществ «Студенческая медицинская наука XXI века»*. [https://www.vsmu.by/images/files/confs/2016/program-ta\\_osen\\_2016\\_3.PDF](https://www.vsmu.by/images/files/confs/2016/program-ta_osen_2016_3.PDF).

## References

1. Rybakov A.I., Banchenko G.V. *Diseases of the oral mucosa [Zubolevaniya slizistoy obolochki polosti rta]*. Moscow; Meditsina; 1978. (in Russian)
2. Dzugaeva I.I., Umarova K.V. Analysis of the structure of diseases of a mucous membrane of an oral cavity and a red border of the lips which is recorded in the adult population at the reception in a model dental clinic in Moscow. *Rossiyskiy stomatologicheskij zhurnal*. 2014; 5: 50-2. (in Russian)

3. Tidgen K.V. New aspects in the prophylaxis of complications of sharp herpetic stomatitis for children. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2015; 3-4: 697-9. (in Russian)

4. Chervinets Yu.V., Chervinets V.M., Mironov A.Yu., Botina S.G., Gagarina E.Yu., Samoukina A.M. i dr. The resident lactobacillus from human oral cavity — candidates for probiotic strains. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i zdorov'e»*. 2012; 1: 131-37. (in Russian)

5. Ganina E.B., Chervinets Yu.V., Shestakova V.G., Grudin N.V., Kuznetsova V.S., Prutenskaya E.A. Histologic picture of stomatitis in experiment on rats. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2017; 5; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=26783> (in Russian)

6. Chervinets Yu.V., Chervinets V.M. Probiotic and adaptation potential of lactobacilli, promising for constructing effective probiotic preparations. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2016; 126 (2): 108. (in Russian)

7. *Medical microbiology, virology and the immunology: Textbook / [Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya I im-*

*munologiya]*. pod red. A. A. Vorobyev. Moscow; «Medical information agency», 2012; 2-e izd. ispr. i dop. 704. (in Russian)

8. Yartseva A.A., Stepanov A.V., Grebenyuk A.N., Antushevich A.E., Antonov V.G. Microbiocenosis of oral cavity in experimental animals exposed to damaging factors of chemoradiotherapy. *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii*. 2014; 1 (45): 105-9. (in Russian)

9. Kuznetsova V.S., Ganina E.B., Chervinets Yu.V. *Treatment of stomatitis by highly active strains of lactobacilli in the animal's experiment. V kn.: Materialy XVI-y mezhdunarodnoy konferentsii studentov i molodykh uchenykh i I Foruma molodezhnykh nauchnykh obshchestv «Studencheskaya meditsinskaya nauka HKHI veka»*. [Lechenie stomatita vysokoaktivnymi shtammami laktobatsill v eksperimente na zhivotnykh. V kn.: Materialy XVI mezhdunarodnoy konferentsii studentov i molodykh uchenykh i I Foruma molodezhnykh nauchnykh obshchestv «Studencheskaya meditsinskaya nauka HKHI veka»]. [https://www.vsmu.by/images/files/confjs/2016/programma\\_osen\\_2016\\_3.PDF](https://www.vsmu.by/images/files/confjs/2016/programma_osen_2016_3.PDF)

#### Сведения об авторах:

Ганина Екатерина Борисовна, аспирант каф. микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, e-mail: [katena-ganina@mail.ru](mailto:katena-ganina@mail.ru);

Червинец Юлия Вячеславовна, доктор мед. наук, проф. каф. микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии; ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, e-mail: [julia\\_chervinets@mail.ru](mailto:julia_chervinets@mail.ru);

Грудинин Никита Владимирович, студент 6-го курса педиатрического факультета; ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава e-mail: [Nikita.grudinin@mail.ru](mailto:Nikita.grudinin@mail.ru);

Шестакова Валерия Геннадьевна, канд. биол. наук, доцент, зав. каф. гистологии, эмбриологии и цитологии; ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, e-mail: [shestvg@mail.ru](mailto:shestvg@mail.ru);

Червинец Вячеслав Михайлович, доктор мед. наук, проф. каф. микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии; ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, e-mail: [chervinets@mail.ru](mailto:chervinets@mail.ru);

Миронов Андрей Юрьевич, доктор мед. наук, проф., руководитель отдела микробиологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека.

Абрамян Ш.М.<sup>1,2</sup>, Рожнова Е.В.<sup>3</sup>, Волкова Е.Н.<sup>1</sup>, Блохин С.Н.<sup>2</sup>, Морозов С.Г.<sup>1</sup>

## Роль клеток иммунной системы ротовой полости в послеоперационных осложнениях при лифтинге лица

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> ООО «Фрау Клиник 1», 105062, г. Москва, Подсосенский пер., 20а

<sup>3</sup> Институт стоматологии при ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

**Цель.** Изучение клеток иммунной системы полости рта у пациентов до проведения операции лифтинга лица, а также сопоставление этих данных с показателями, выявленными при осложнениях в послеоперационном периоде. **Методика.** Исследованы клетки иммунной системы полости рта 100 женщин (23—68 лет), которым перед операцией лифтинга лица проведено стоматологическое обследование и необходимое лечение при наличии кариеса дентина, клиновидного дефекта эмали зуба, хронического периодонтита или пульпита. Выделенные путем смывов десневой борозды клетки окрашивали моноклональными антителами и анализировали на проточном цитометре. Определяли уровень спонтанного и индуцированного апоптоза. Оценивали уровень фагоцитоза и генерацию супероксидного аниона нейтрофилами. **Результаты.** Показано, что хронические воспалительные заболевания зубов оказывают негативное влияние на состояние иммунных клеток ротовой полости, сопровождаются повышением генерации супероксидного аниона нейтрофилами, повышением уровня спонтанного и церамид-индуцированного апоптоза клеток десневой борозды. **Заключение.** Наличие хронической патологии зубов, даже после санации, оказывает негативное влияние на течение послеоперационного периода при проведении операции лифтинга лица, в частности, способствует увеличению времени заживления операционной раны, инфицированию раны с появлением очагов некроза в области операционного шва.

**Ключевые слова:** лифтинг лица, ротовая полость, клетки иммунной системы, апоптоз.

**Для цитирования:** Абрамян Ш.М., Рожнова Е.В., Волкова Е.Н., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Роль клеток иммунной системы ротовой полости в послеоперационных осложнениях при лифтинге лица. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 174—178.

DOI:

**Для корреспонденции:** Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед наук, проф., член-корр. РАН, e-mail: sergey\_moroz@list.ru

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Поступила:** 28.10.2018

Abramian Sh.M.<sup>1,2</sup>, Rozhnova E.V.<sup>3</sup>, Volkova E.N.<sup>1</sup>, Blokhin S.N.<sup>2</sup>, Morozov S.G.<sup>1</sup>

## The role of the oral cavity immune cells in the postoperative complications after face lifting

<sup>1</sup> The Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow

<sup>2</sup> Frau Klinik 1, Moscow

<sup>3</sup> Institute of Stomatology at the Sechenov' University, Moscow

**The object.** The study of the cells of the immune system of the oral cavity in patients before the operation of face lifting, as well as a comparison of these indicators with complications in the postoperative period. **Methods.** The immune cells from the oral cavity were studied in 100 women (23—68 years), who underwent a dental examination and necessary treatment if they had the dentin caries, wedge-shaped defect of tooth enamel, chronic periodontitis or pulpitis before the facial lifting operation. The immune cells have been isolated by a lavage of gingival sulcus around the damaged tooth. **Results.** It has been shown that chronic dental diseases made a negative contribution to the oral cavity immune cells. It has been accompanied by the elevated levels of superoxide originating from neutrophils as well as the increased levels of spontaneous and ceramide-induced apoptosis of immune cells isolated from the gingival sulcus. **Conclusion.** The presence of chronic pathology of teeth even in the case of the preoperative dental sanitation has a negative impact on the postoperative period after face lifting, in particular, contributes to the lengthening of the surgical wound healing time, wound infection as well as the partial necrosis of suture.

**Keywords:** face lifting, oral cavity, immune cells, apoptosis.

**For citation:** Abramian Sh.M., Rozhnova E.V., Volkova E.N., Blokhin S.N., Morozov S.G. The role of the oral cavity immune cells in the postoperative complications after face lifting. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 174—178. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Prof. Morozov S.G., e-mail: biopharm@list.ru

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Received** 28.10.2018

## Введение

Кариес зубов и хронический периодонтит — это наиболее часто встречающиеся заболевания [1], влияющие на инфицирование тканей лица пациентов при проведении пластических операций. Перед операцией лифтинга лица требуется обязательное санирование полости рта [2], однако у больных с хроническим периодонтитом практически невозможно добиться полной эрадикации в течение короткого периода времени [3]. Метаболиты, секретируемые микроорганизмами ротовой полости, влияют на тканевой гомеостаз мягких тканей лица [4]. Изменение нормального микробиома ротовой полости может также провоцировать развитие аутоиммунной патологии [5] и системных заболеваний [6], что может осложнять течение послеоперационного периода после операций на лице [7, 8].

Клетки иммунной системы ротовой полости обеспечивают контроль над патогенами у здоровых людей, в частности, нейтрофилы и моноциты обеспечивают клиренс патогенов [9], лимфоциты отвечают за специфический иммунный ответ [10] и т.д. Клетки эпителия ротовой полости активно секретируют хемокины, цитокины и другие факторы антимикробной защиты [11]. При хронической одонтогенной инфекции иммунная система не может поддерживать необходимый уровень защиты, что сказывается на микробной контаминации мягких тканей лица. *Цель.* Изучение клеток иммунной системы полости рта у пациентов до проведения операции лифтинга лица, а также сопоставление этих данных с показателями, выявленными при осложнениях в послеоперационном периоде.

## Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. В работе использован биологический материал 100 пациенток (25—68 лет), которым перед операцией лифтинга лица было проведено стоматологическое обследование. Из них санация полости рта потребовалась 76 пациентам. Для исследования были вы-

браны пациентки с кариесом дентина (K02.1;  $n = 41$ ), пульпитом (K04.0;  $n = 11$ ), хроническим апикальным периодонтитом (апикальной гранулемой, K04.5;  $n = 15$ ) и клиновидным дефектом (K03.10;  $n = 9$ ) (по классификации МКБ-10), а также пациентки без патологии зубов (норма;  $n = 24$ ). Критерием исключения из исследования было наличие у пациентов вирусных или острых бактериальных инфекций.

С помощью стоматологических брашиков производились смывы клеток десневой борозды зуба, требующего санации. Брашики с адгезированными клетками прополаскивали в 1 мл физиологического раствора, после чего пробирку центрифугировали, клетки переводили в полную среду RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Далее клетки окрашивали моноклональными антителами, отмывали и добавляли 0,5 мл 4% параформальдегида для фиксации клеток и анализировали на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) на каналах FL1-A, FL2-A и FL3-A при длине волны, соответственно,  $488 \pm 5$  нм,  $530 \pm 5$  нм и  $605 \pm 5$  нм.

Уровень спонтанного апоптоза определяли по включению пропидиума иодида (PI, в гипотоническом буфере) в олигонуклеосомальные фрагменты ДНК методом проточной цитометрии на канале FL2-A или FL3-A [12]. Индуцированный апоптоз измеряли при культивировании *ex vivo* выделенных живых клеток с C2-церамидом [10 нМ/мл на  $10^6$  клеток] в течение 2 ч [13]. Фагоцитоза нейтрофилов оценивали методом проточной цитометрии по включению в клетки инактивированных стафилококков, меченных флуоресцеинами. Генерацию супероксидного аниона нейтрофилами определяли при стимуляции форболовым эфиром на двулучевом спектрофотометре Hitachi по соответствующей программе.

Полученные данные обрабатывали по программе ANOVA. Сравнение между двумя группами проводили по критерию Стьюдента, сравнение групп с малой выборкой проводили непараметрическим методом множественного сравнения по критерию Ньюмена-Кейлса, при котором  $p \leq 0,05$  считается статистически значимым различием между группами.

### Результаты и обсуждение

У всех пациенток были исследованы клетки, полученные при смывах из десенной борозды санированного зуба (здорового зуба в контроле): выделены нейтрофилы, моноциты, лимфоциты и эпителиальные клетки (рис. 1). Процент нейтрофилов был статистически значимо выше при кариесе дентина, пульпите и хроническом периодонтите ( $p < 0,05$ ), при этом также был повышен процент спонтанного фагоцитоза (табл. 1). При пульпите и хроническом периодонтите выявлен повышенный уровень генерации супероксидного аниона нейтрофилами при стимуляции форболовым эфиром (РМА), что является одним из важных звеньев патогенеза воспалительных заболеваний. Далее определяли уровень спонтанного апоптоза клеток, выделенных из десенной борозды зубов (табл. 2). Естественная гибель нейтрофилов при пульпите и хроническом периодонтите была статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с нормой, гибель моноцитов не отличалась от контрольного уровня, гибель лимфоцитов также была значимо выше при пульпите и периодонтите ( $p < 0,05$ ) с тенденцией к повышению при кариесе и клиновидном дефекте ( $p > 0,05$ ).

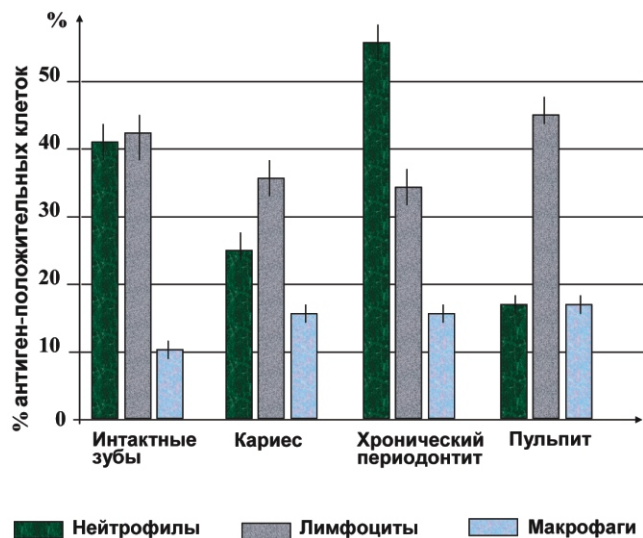


Рис. 1. Изменение клеточного состава десенной борозды при патологии зубов. При оси ординат — процент выделенных антиген-положительных клеток (нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов).

Таблица 1

Реакция нейтрофилов десенной борозды пациенток до операции лифтинга лица

Показатели	Норма (n = 24)	Типы патологии зубов			
		Хрон. периодонтит (n = 15)	Пульпит (n = 11)	Кариес дентина (n = 41)	Клиновидный дефект (n = 9)
% нейтрофилов (CD16 <sup>+</sup> ) в суспензии	19 ± 6%	42 ± 4% #	38 ± 3% #	31 ± 5% #	26 ± 4%
% спонтанного фагоцитоза	52 ± 5%	71 ± 3% #	68 ± 4% #	59 ± 6%	53 ± 5%
% индуцированного фагоцитоза	95 ± 2%	92 ± 4%	87 ± 7%	92 ± 4%	95 ± 3%
Уровень O <sub>2</sub> <sup>-</sup> в ответ на РМА [нМ/мл/10 <sup>6</sup> клеток]	0,387 ± 0,031	0,551 ± 0,042 #	0,497 ± 0,012 #	0,391 ± 0,063	0,398 ± 0,047

Примечание. O<sub>2</sub><sup>-</sup> — супероксидный анион; РМА — форболмиристатацетат; #p < 0,05 по сравнению с нормой (контролем).

Таблица 2

Спонтанный апоптоз клеток, выделенных из десенной борозды пациенток до операции лифтинга лица

Показатели	Норма (n = 24)	Типы патологии зубов			
		Хрон. периодонтит (n = 15)	Пульпит (n = 11)	Кариес дентина (n = 41)	Клиновидный дефект (n = 9)
% спонтанного апоптоза					
Нейтрофилы	6 ± 3%	24 ± 3% #	18 ± 2% #	10 ± 3%	7 ± 2%
Лимфоциты	4 ± 2%	10 ± 1% #	15 ± 2% #	8 ± 3%	7 ± 3%
Моноциты	3 ± 3%	4 ± 3%	5 ± 3%	4 ± 2%	3 ± 2%
Эпителиальные клетки	6 ± 3%	24 ± 3% #	18 ± 2% #	10 ± 3%	7 ± 2%
% индуцированного апоптоза					
Нейтрофилы	21 ± 1%	39 ± 2% #	38 ± 3% #	29 ± 3% #	24 ± 2%
Лимфоциты	15 ± 2%	28 ± 1% #	32 ± 2% #	18 ± 3%	19 ± 4%
Моноциты	14 ± 2%	24 ± 2% #	29 ± 3% #	18 ± 2%	16 ± 5%
Эпителиальные клетки	24 ± 3%	41 ± 3% #	44 ± 5% #	39 ± 3% #	38 ± 3% #

Примечание. # — p < 0,05 по сравнению с нормой (контролем).



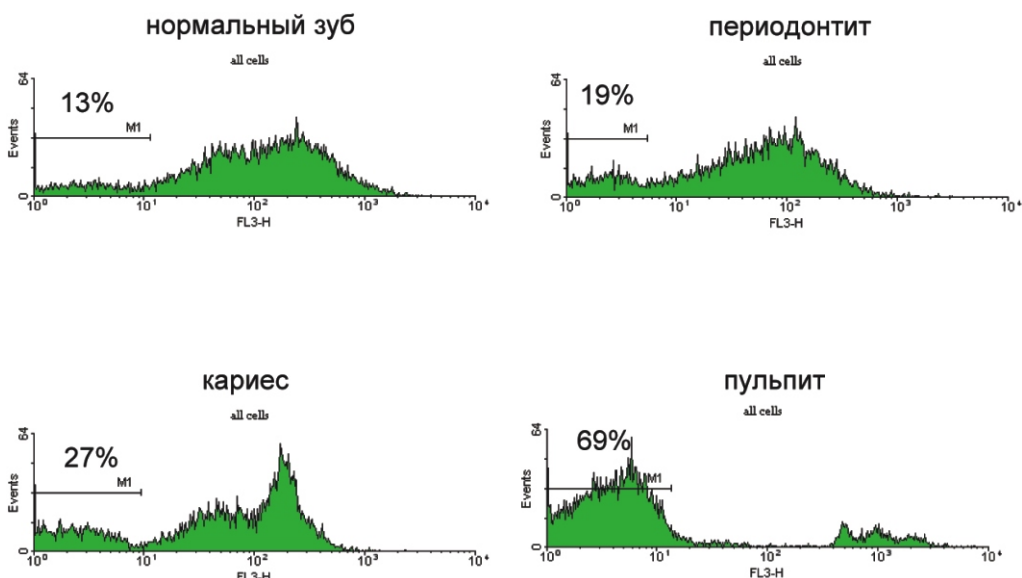


Рис. 2. Уровень C2-церамид-индуцированного апоптоза в общей суспензии клеток, выделенных из десневой борозды при патологии зубов (данные проточной цитометрии). Клетки (апоптоз) представлены крайним левым пиком. Правые пики отражают уровень ДНК в неповрежденных клетках. Схема исследования описана в разделе «Методика».

Уровень апоптоза, индуцированного C2-церамидом (отражает готовность клеток к гибели при контакте с патогенами или с их активными метаболитами) имел ту же тенденцию, что и уровень спонтанного апоптоза, и статистически превышал показатели контроля при пульпите, хроническом периодонтите и кариесе (табл. 2). Таким образом, при патологии зубов усилена гибель клеток локальной иммунной системы ротовой полости. Учитывая тесную взаимосвязь полости рта и других мягких тканей лица, можно говорить о влиянии нарушения локального иммунитета на процессы заживления ран при операциях на лице. Примеры исследования апоптоза клеток на проточном цитометре приведены на рис. 2.

Всем пациенткам была проведена санация полости рта перед операцией лифтинга лица. В послеоперационном периоде у некоторых пациенток наблюдались

осложнения, анализ которых в зависимости от имеющейся патологии зубов представлен в табл. 3.

У пациенток с патологией зубов, даже санированных перед операцией, повышен процент осложнений по сравнению с пациентками со здоровой полостью рта. В основном, это проявляется увеличением сроков заживления операционной раны, развитием гематомы или отека мягких тканей (более выраженного и более продолжительного по сравнению с обычным послеоперационным состоянием), а также с частичным некрозом операционного шва. В данном исследовании инфекционные осложнения не были зарегистрированы у пациенток без патологии зубов, хотя авторы не проводят прямой взаимосвязи между этими состояниями. В основе патогенеза послеоперационных осложнений, как одно из звеньев, лежит нарушение активности клеток локальной иммунной системы, в частно-

Таблица 3

Послеоперационные осложнения у пациенток при выявленных до операции лифтинга лица заболеваниях зубов

Патология зубов	Осложнения после лифтинга лица					Всего осложнений
	Инфекция	Отек тканей	Гематома	Частичный некроз шва	Увеличение сроков заживления раны	
Кариес дентина (n = 41)	3	8	5	1	11	28 #
Пульпит (n = 11)	1	3	1	1	5	11 #
Хрон. периодонтит (n = 15)	1	3	3	1	6	14 #
Клиновидный дефект (n = 9)	—	1	1	—	1	3
Контроль (n = 24)	—	5	2	—	—	7

Примечание. Статистической обработке подвергали только общее количество осложнений. #p<0,05 по сравнению с нормой (контролем).

сти, повышение генерации супероксидного аниона нейтрофилами. Повышение уровня спонтанного и индуцированного апоптоза клеток иммунной системы прямо связано с состоянием операционного шва, так как провоцирует развитие частичных некрозов шва и его заживление вторичным натяжением.

Таким образом, наличие хронической патологии зубов даже после санации полости рта оказывает негативное влияние (в виде осложнений) на течение послеоперационного периода при проведении операции лифтинга лица.

### Выводы

1. Хронический пульпит и периодонтит сопровождаются повышением генерации супероксидного аниона нейтрофилами, что поддерживает воспаление в окружающих тканях.

2. При хроническом пульпите и периодонтите статистически значимо повышены уровни спонтанного и церамид-индуцированного апоптоза клеток десневой борозды поврежденных зубов.

3. Наличие хронических заболеваний зубов (кариес дентина, пульпит, хронический периодонтит, клиновидный дефект зуба) оказывает негативное влияние на состояние клеток локальной иммунной системы ротовой полости у пациентов, что влияет на течение послеоперационного периода после проведения операции лифтинга лица.

### Литература

(п.п. 1-9; 11 см. References)

10. Абрамян Ш.М., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Роль лимфоцитов кожи и подкожно-жировой ткани в развитии осложнений после операции лифтинга лица. *Трансляционная медицина*. 2017; (S3): 6.

12. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Изучение состояния сигнальных путей апоптоза в клетках при проведении пластических операций на лице. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2017; 1: 70.

13. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Определение уровня спонтанного и индуцированного апоптоза клеток, полученных из операционного материала при лифтинге лица. *Патогенез*. 2016; 14(4): 63-8.

### References

1. Rajendra Santosh A., Ogle O., Williams D., Woodbine E. Epidemiology of oral and maxillofacial infections. *Dent. Clin. North Am.* 2017; 61(2): 217-33.

2. Cottom H., Gallagher J., Dhariwal D., Abu-Serriah M. Odontogenic cervico-fascial infections: a continuing threat. *J. Ir. Dent. Assoc.* 2013; 59(6): 301-7.

3. Dolinska E., Skurska A., Pietruska M., Dymicka-Piekarska V., Milewski R., Pietruski J. et al. The effect of non-surgical periodontal therapy on HNP1-3 Level in gingival crevicular fluid of chronic periodontitis patients. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 2017; 65(4): 355-61.

4. Le Moual H. Microbiota-derived metabolites modulate tissue homeostasis: relevance to the oral cavity? *Oral Dis.* 2016; 22(5): 350-2.

5. Nikitakis N., Papaioannou W., Sakkas L., Kousvelari E. The autoimmunity-oral microbiome connection. *Oral Dis.* 2017; 23(7): 828-39.

6. van der Meulen T., Harmsen H., Bootsma H. Spijker-vet F., Kroese F., Vissink A. The microbiome-systemic diseases connection. *Oral Dis.* 2016; 22(8): 719-34.

7. Wall A., Bueno E., Pomahac B., Treister N. Intraoral features and considerations in face transplantation. *Oral Dis.* 2016; 22(2): 93-103.

8. Zawadzki P., Perkowski K., Padzik M., Mierzwinska-Nastalska E., Szaflik J., Conn D. et al. Examination of oral microbiota diversity in adults and older adults as an approach to prevent spread of risk factors for human infections. *Biomed. Res. Int.* 2017; 2017: 8106491.

9. Fine N., Hassanpour S., Borenstein A. Sima C., Oveisi M., Scholey J. et al. Distinct oral neutrophil subsets define health and periodontal disease states. *J. Dent. Res.* 2016; 95(8): 931-8.

10. Abramian Sh.M., Blokhin S.N., Morozov S.G. The role of skin lymphocytes and subcutaneous fat tissue in the development of complications after facelift surgery. *Translyatsionnaya meditsina*.

11. Ramage G., Lappin D., Millhouse E. et al. The epithelial cell response to health and disease associated oral biofilm models. *J. Periodontal Res.* 2017; 52(3): 325-33.

12. Abramian Sh.M., Morozov S.G. Study of the state of signal pathways of apoptosis in cells during plastic surgery on the face. *Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoy i ehsteticheskoy khirurgii*. 2017; 1: 70.

13. Abramian Sh.M., Morozov S.G. Determination of the level of spontaneous and induced apoptosis of cells obtained from surgical material during face lifting. *Patogenez*. 2016; 14(4): 63-8.

### Сведения об авторах:

Абрамян Шмавон Маисович, мл. науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов в ФГБНУ НИИОПП, челюстно-лицевой и пластический хирург, e-mail: 9101110411@mail.ru

Елена Владимировна Рожнова, канд. мед. наук, ассистент каф. терапевтической стоматологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: dr-rozhnova@yandex.ru

Елена Николаевна Волкова, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов в ФГБНУ НИИОПП, e-mail: volkovaenderm@yandex.ru

Сергей Николаевич Блохин, доктор мед. наук, проф., руководитель клиники пластической хирургии и косметологии ООО «Фрау Клиник 1», e-mail: frauclinic-moscow@gmail.com

Сергей Георгиевич Морозов, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ НИИОПП, e-mail: sergey\_moroz@list.ru

Эйзенах И.А.<sup>1</sup>, Швец В.И.<sup>2</sup>, Кубатиев А.А.<sup>3</sup>, Мозес В.Г.<sup>4</sup>, Ильинская Е.В.<sup>1</sup>, Солуянов М.Ю.<sup>5</sup>

## Терапия препаратом с направленной депо-доставкой эрозий уретры после установки субуретральной петли

<sup>1</sup> ГАУЗ КО «Новокузнецкая городская клиническая больница № 1», 654057, г. Новокузнецк, Россия, пр. Бардина, д. 28

<sup>2</sup> ФГБУ «Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова «Московский технологический университет», 119571, г. Москва, Россия, пр. Вернадского, д. 87

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» МР, 650056, г. Кемерово, Россия, ул. Ворошилова, д. 22а

<sup>5</sup> Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», 630117, г. Новосибирск, Россия, ул. Арбузова, д. 6

Осложнения в виде эрозии уретры после установки субуретральной петли при стрессовом недержании мочи у женщин, часто сопровождаются дизурией, что требует терапевтической коррекции. Комплексные препараты с направленной депо-доставкой представляют хороший потенциал в лечении этого mesh-ассоциированного осложнения.

**Цель:** изучить терапевтическую эффективность применения комплексного препарата с возможностями направленной депо-доставки лекарств (гидрогелевый материал альгината натрия с диоксидином и лидокаином — ГАМНДЛ) в лечении эрозий уретры, осложняющих операцию установки субуретральной петли при синдроме стрессового недержания мочи у женщин. **Методика.** У 78 пациенток с эрозией уретры после установки субуретральной петли изучали терапевтическую эффективность ГАМНДЛ при местном трансвагинальном применении. **Результаты.** Показано, что использование ГАМНДЛ эффективно при лечении эрозий (36,1% без лечения и 3,2% после) и дизурии (29% до лечения, 3,2% после) при стрессовом недержании мочи у женщин. Данные статистически значимы. Это подтвердили и лабораторные анализы мочи. Количество пациенток с лейкоцитурией или эритроцитурией существенно снижалось в группе с применением препарата — 12,1% против 46,8%. **Заключение.** Использование полипропиленового материала при установке субуретральной петли при стрессовом недержании мочи у женщин сопровождается реакцией уретры на инородное тело и компрессией стенки уретры, что проявляется дизурией и эрозией уретры. Учитывая анатомическую близость уретры и передней стенки влагалища, а также развитие препаратов направленной депо-доставки в комплексе с другими лекарствами позволяет эффективно использовать эти комплексные препараты, такие, как ГАМНДЛ, в лечение эрозии уретры и дизурии.

**Ключевые слова:** эрозия уретры; направленная депо-доставка препаратов; альгинат натрия; стрессовое недержание мочи; субуретральная петля; меш-ассоциированные осложнения; дизурия.

**Для цитирования:** Эйзенах И.А., Швец В.И., Кубатиев А.А., Мозес В.Г., Ильинская Е.В., Солуянов М.Ю. Терапия препаратом с направленной депо-доставкой эрозий уретры после установки субуретральной петли. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 179—184.

**DOI:**

**Для корреспонденции:** Эйзенах И.А., канд. мед наук, врач-уролог АЛДО ГАУЗ КО «Новокузнецкая городская клиническая больница № 1», e-mail: eiacom@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 26.10.2018

Eyzenakh I.A.<sup>1</sup>, Shvetz V.I.<sup>2</sup>, Kubatiev A.A.<sup>3</sup>, Mozes V.G.<sup>4</sup>, Il'inskaya E.V.<sup>1</sup>, Soluyanov M.Ju.<sup>5</sup>

## Therapy with directed depo-transportation drug the urethra`s erosion after setting the suburethral mesh

<sup>1</sup> SAPHI KR «Novokuznetsk City clinical hospital № 1», 654057, Novokuznetsk, Bardina av., 28

<sup>2</sup> FSBI «Institute of Fine Chemical Technologies named after Lomonosov M.V. «Moscow Technological University», 119571, Moscow, Vernadskogo av., 86

<sup>3</sup> FSBSI «Research Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

<sup>4</sup> FSBEI HE «Kemerovo State Medical University» of the Ministry of Health of Russia, 650056, Kemerovo, Varashilova str., 22a

<sup>5</sup> Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the FSBI «Federal Research Institute of Cytology and Genetics, SB RAS», 630117, Novosibirsk, Arbusova str., 6

**Background.** Formed erosions of urethra after setting suburethral mesh (SM) by stress urinary incontinence (SUI) at women could be accompanied by dysuria and demand the therapeutic correction. The complex preparations with directed depot-transportation have a good potential for treatment this kind of mesh-associated complication. **Objective.** To study the efficiency of using the complex preparation with possibility of directed depot-transportation for medications, for example hydrogel material of sodium alginate with dioxidine and lidocaine (HMSADL) as complex with anesthetic and antibiotic, for treatment of urethra's erosion after setting SM by SUI. **Methods.** By 78 female patients, with vindicated in urethroscope urethra's erosion after setting the SM, was studied the dysuria syndrome and efficiency of locally transvaginal treatment with HMSADL and without HMSADL. There was performed the analysis the two groups of patients with different methods of treatment. **Results.** The results of treatment of dysuria (29% before treatment, 3,2% after) and urethra's erosion (3,2% after treatment) were statistically significantly better in the patients' group, in which were used locally transvaginal HMSADL, as in the group, where the local therapy HMSADL was not used (dysuria — 23,1% before treatment and 19% after, erosion — 36,1% after treatment). It was proved also urine's analysis. There were less patients after treatment with high level of erythrocytes or leucocytes in urine in the group with local treatment by HMSADL 12,1% against 46,8% in the group without local therapy. **Conclusion.** Using the polypropylene material at setting SM by SUI is accompanied by urethra's reaction on foreign substance and compression of urethra's wall, it manifests with dysuria and urethra's erosion. It allows, accounting the anatomical closeness urethra and anterior wall of vagina, but also development of preparations of directed depot-transportation in complex with others medications, to use these complex preparations, such as HMSADL, for treatment the urethra's erosion and dysuria.

**Keywords:** urethra's erosion; directed depot-transportation of medications; sodium alginate; stress urinary incontinence; suburethral mesh; mesh-associated complications; dysuria.

**For citation:** Eyzenakh I.A., Shvets V.I., Kubatiev A.A., Mozes V.G., Il'inskaya E.V., Soluyanov M.Ju. Therapy with directed depo-transportation drug the urethra's erosion after setting the suburethral mesh. *Patologicheskaya Fiziologiya i Experimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 179—184. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Eyzenakh I.A., PhD in medical sciences, urologist OMDD of SAPH of the KR «Novokuznetsk City clinical hospital № 1», e-mail: eiacom@yandex.ru

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

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Eyzenakh I.A., <http://orcid.org/0000-0002-0895-2626>

Received 26.10.2018

## Введение

Распространенность патологии в виде стрессового недержания мочи (СНМ) у женщин составляет до 40%. Очень часто эта патология сочетается с патологией тазового дна — пролапсом гениталий. Эти заболевания, схожие по этиологии и патогенезу, объединяются одним термином — несостоятельность фасциально-мышечного аппарата тазового дна [1]. Малоизученным, но важным фактором, в патогенезе данной патологии является дисплазия соединительной ткани [2]. И поскольку в современной медицине отсутствуют терапевтические средства в лечении последствий дисплазии соединительной ткани, то основным методом лечения несостоятельности тазового дна является хирургический метод [3].

Последние 15 лет урологи и гинекологи, опираясь на положительный и долгосрочный опыт хирургов в герниапластике, стали широко применять синтетические полипропиленовые материалы для коррекции патологии тазового дна, производя процесс искусственного неофасциогенеза [3, 4].

Золотым стандартом оперативного лечения при СНМ является установка субуретральной петли (СУ). При всех достоинствах установка СУ имеет один серьезный недостаток — развитие mesh-ассоциированных осложнений, связанных с использованием синтетического материала — реакцией тканей на полипропиленовый протез [4, 5]. Используемый протез при СНМ подводится непосредственно под уретру и создает давление на стенку уретры для создания дополнительного изгиба. Таким образом создается не только контакт протеза и стенки уретры, но и компрессия уретры. Эти механизмы лежат в основе одного из малоизученных mesh-ассоциированных осложнений — эрозий уретры, проявляющихся дизурией. Эрозии уретры плохо поддаются стандартной терапии. Единых стандартов лечения этого осложнения не существует, в настоящее время предпочтение отдается комбинированным препаратам с возможностями направленной депо-доставки лекарств, которые позволяют местно создавать высокие концентрации лекарственных веществ [3, 6]. На оба звена патогенеза

эффективно действует местная терапия [7]. Особенно актуальным становится данный вид терапии с развитием препаратов-переносчиков, способных доставлять другие препараты через ткани до органа мишени. Именно такой комбинированный препарат, содержащий матрицу — переносчик альгинат натрия [8], можно использовать в лечении эрозий уретры после установки СУ.

### Методика

Исследование проводилось на базе урологического отделения Государственного автономного учреждения здравоохранения Кемеровской области «Новокузнецкая городская клиническая больница № 1». Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов.

Проведено обследование 78 пациенток в период с 2012 до 2017 гг., прооперированных по поводу СНМ с установкой СУ, у которых в позднем послеоперационном периоде выявлена эрозия уретры. Критериями включения являлись: поздний (45—50 сут.) послеоперационный период после установки СУ с использованием синтетического сетчатого имплантата; отсутствие тяжелой соматической патологии по основным классам заболеваний (МКБ-10). Для оценки частоты интраоперационных и ранних послеоперационных осложнений пациенток проводили анализ медицинской документации — историй болезни и протоколов операции. Клиническая эффективность оперативного лечения оценивалась при помощи кашлевой пробы. Наличие эрозии уретры диагностировалось при помощи цистоскопии жестким цистоскопом с углом оптики 90°. После подтверждения диагноза все пациентки были рандомизированы на две группы: группа А (n = 47) получала стандартное лечение (спазмолитики, м-холиноблокаторы, альфа1-адреноблокаторы в стандартных дозировках); группа В (n = 31) дополнительно получала трансвагинально препарат ГМАНДЛ в виде тампонов с локализацией препарата на передней стенке влагалища, ближе к на-

ружному отверстию уретры, с частотой 2 раза в сут., в течение 14 сут. Рандомизация осуществлялась при помощи таблиц случайных чисел (таблица). Эффективность лечения оценивалась клинически и по результатам цистоскопии. Дизурический синдром оценивался по дневникам пациенток, где учитывалось наличие резей и болей, чувство неполного опорожнения, мочеиспускание чаще одного раза в 1 ч и более одного мочеиспускания в ночное время. Наличие хотя бы одного из этих критериев расценивалось как дизурия. Анализ мочи по Ничепоренко проводили за 1 день до начала лечения и в последний день лечения. Выраженность лейкоцитурии и эритроцитурии оценивали как повышение клеточных элементов мочи (КЭМ). Задержка мочи исключалась с помощью УЗИ. Статистический анализ проводили при помощи программы Statsoft Statistica 6,0. Относительные величины описывались процентными долями. Оценка статистической значимости частотных различий осуществлялась при помощи критерия Пирсона  $\chi^2$  и точного критерия Фишера. При проверке нулевых гипотез, критическое значение уровня статистической значимости, принималось равным 0,05.

### Результаты и обсуждение

Возраст пациенток варьировал от 45 до 65 лет. Анализ операционных протоколов и историй болезни показал, что у пациенток в обеих группах отсутствовали интраоперационные и ранние послеоперационные осложнения.

У всех включенных в исследование пациенток при цистоскопии была выявлена эрозия уретры, которая относится к mesh-ассоциированному осложнению [4]. На основании исследований реакций тканей на имплантируемые материалы, можно предположить, что в патогенезе формирования эрозии уретры ведущими являются два плохо прогнозируемых фактора: воспалительная реакция тканей на ксеноматериал и сосудистый компонент, так как имплант подводится непосредственно к уретре и натягивается, создавая компрессию.

Проведенное исследование показало, что отсутствие интраоперационных и ранних послеоперационных

Таблица

Встречаемость симптомов в группах сравнения до и после лечения

Группы	Дизурия до лечения	Дизурия после лечения	Эрозия после лечения	Увеличение КЭМ до лечения	Увеличение КЭМ после лечения
Группа А (n = 47), стандартная терапия	23,4%	19,1%	36,1%	93,61%	46,8%
Группа В (n = 31), ГМАНДЛ	29%	3,2% *	3,2% *	93,54%	12,1% *

Примечание. \* — статистически значимые различия между группами.

осложнений не может быть предиктором низкого риска развития mesh-ассоциированного осложнения. Еще одна особенность данного осложнения то, что оно сочеталось с низкой частотой дизурических проявлений у обследованных больных. Дизурия в виде чувства неполного опорожнения мочевого пузыря, рези при мочеиспускании, никтурии выявлена у 11 (23,4%) женщин в группе А и у 9 (29,0%) в группе В, то есть различия статистически незначимы (таблица) Это дает основание предполагать и активно исключать эрозии уретры у всех женщин, с наличием или без дизурического синдрома, после установки СУ при лечении СНМ с помощью сравнительно несложного метода исследования — цистоуретроскопии. Еще одним критерием может служить исследование мочи — у большинства пациенток были зарегистрированы отклонения от нормы (таблица). Превышение нормы КЭМ в обеих группах выявлено у 44 (93,61%) пациенток в группе А и 29 (93,54) в группе В,  $p = 0,99$ . Эрозиями являются локальные изменения воспалительного характера в плоском эпителии слизистой, не проникающие глубже собственной пластины, характеризующиеся обратимостью и отсутствием замещения соединительной тканью [9]. Полипропилен является биоинертным материалом, а это означает реакцию тканей на него в виде формирования соединительной ткани. Морфологические изменения в тканях, граничащих с полипропиленовым материалом, хорошо изучены [10, 11]. Формирующийся ограниченный вал трансформируется из остро-воспалительного в первые 3—7 сут. (кровенаполнение, лейкоцитарная инфильтрация, отек), до формирования зрелого соединительно-тканного барьера к 35—50 сут. [10, 11]. Примерно в этот период нами проводилось исследование пациенток. Сроки каждого из этапов зависят от многих факторов — от степени травматичности, вида прилегающих тканей, качественных физических параметров полипропилена. При сравнении клинической картины дизурии со сроками морфологических изменений в тканях отмечались параллели. Дизурические проявления начинали обостряться в конце 1 нед. после операции в период острой реакции тканей, и продолжались более 1 мес., когда пациентки начинали обращать на это внимание. При активизации пациентками физического режима, прежде всего вертикальных нагрузок, начинает превалировать второй компонент патогенеза эрозий — реакция тканей на компрессию протезом. Техническая роль протеза в операции при СНМ — создание искусственного изгиба для повышения необходимого давления на стенку уретры, что сопровождается сдавлением тканей протезом. Имеются сведения о некрозе и расслоении тканей стенки уретры вследствие длительной чрезмерной компрессии [5]. Патогенез данного

процесса менее изучен, и к нему можно применить общие знания о реакции тканей на сдавление [12]. Принцип отсутствия жесткой фиксации полипропиленовой петли лежит в основе операции и необходим, в частности, для предотвращения чрезмерной компрессии стенки уретры. Сдавливание сосудов как венозных, так и артериальных нарушают трофику ткани, приводят к накоплению недоокисленных продуктов и ацидозу, отеку [12]. Необходимо учитывать, что уретра имеет несколько источников кровоснабжения: внутренняя срамная артерия, нижняя пузырная и влагалищная артерии [13]. Вены впадают в санториеново сплетение и венозную систему влагалища. Учитывая такое разветвленное кровоснабжение, у уретры есть возможности адаптационных механизмов при компрессии посредством формирования коллатералей. Воспалительная реакция через 2 мес. после операции снижается, а реакция тканей на компрессию может сохраняться значительно дольше [12]. В этом смысле местное ингибирование воспалительных реакций тканей может смягчать клиническую картину.

Нами использован препарат ГМАНДЛ, который является комбинированным препаратом для местного применения и включает в себя альгинат натрия, лидокаин, диоксидин. Гидрогелевый материал альгината натрия, являющийся основой препарата ГМАНДЛ, считается признанным средством направленной доставки других лекарственных средств в тканях, способным создавать в зоне интереса высокую концентрацию нескольких лекарственных компонентов с различным механизмом действия и тем самым улучшать результаты терапии [8, 14]. Результаты проведенного исследования подтверждают это. После проведения лечения явления дизурии сохранялись у 9 (19,1%) пациенток в группе А и у 1 (3,2%) пациентки в группе В,  $p = 0,039$  (таблица). При проведении цистоскопии после лечения эрозия уретры выявлена у 17 (36,1%) пациенток в группе А и у 1 (3,2%) пациентки в группе В,  $p = 0,007$  (таблица).

Природный полисахарид — альгинат натрия — самостоятельно обладает мощным регенеративным, гемостатическим и противовоспалительным эффектом, оказывает положительное терапевтическое действие при эрозиях уретры, снижая воспалительную реакцию в тканях. Еще одно качество этого материала — способность его молекул не вступать в химическую реакцию с лидокаином и диоксидином, а выступать только как депо для таргетной доставки — является неоспоримым преимуществом [8, 14].

В патогенезе дизурического синдрома ведущую роль играет раздражение рецепторов слизистого, мышечного слоя мочевого пузыря и уретры. Это раздражение может иметь как воспалительный, так и не воспалительный характер [15]. Возможность забло-

кировать импульсы от этих рецепторов в нервные ганглии является основной задачей в лечении дизурии. Лидокаин, доставляемый через стенку влагалища к уретре, эффективно справляется с этой задачей. В научной среде нет единого мнения о возможности развития воспалительной реакции без биологически-чужеродного возбудителя [16]. Несомненно, основой воспаления при эрозии уретры является реакция тканей на инородное тело. Но мы не можем исключать наличие бактериального компонента, особенно учитывая физиологически-богатое бактериальное заселение урогенитальной зоны. Диоксидин, являющийся универсальным бактериальным средством, также способствует уменьшению воспалительной реакции. Исследования мочи также подтверждали снижение тканевой реакции на имплант (таблица). После лечения были достигнуты статистически значимые положительные результаты, КЭМ были повышены лишь у 22 (46,8%) пациенток в группе А и 4 (12,1%) в группе В.

Таким образом, компоненты комплексного препарата действуют на все патофизиологические механизмы развития эрозии уретры и, как следствие, на выраженность дизурии. Наличие универсального депо-доставщика альгината натрия, позволяет эффективно использовать комплексный препарат ГМАНДЛ трансвагинально, что подтверждено нашими исследованиями.

### Литература

1. Мусин И.И., Яшук А.Г., Даутова Л.А., Матигулин Р.М. Методы хирургической коррекции стрессового недержания мочи у женщин репродуктивного возраста. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2013; 8(4): 90-93.
2. Смольнова Т.Ю., Буянова С.Н., Савельев С.В., Петрова В.Д. Дисплазия соединительной ткани — как одна из возможных причин недержания мочи у женщин с пролапсом гениталий. *Урология*. 2001; 2: 25-30.
3. Беженарь В.Ф., Богатырева Е.В., Цыпурдеева А.А., Цуладзе Л.К., Русина Е.И., Гусева Е.С. Новые возможности хирургической коррекции тазового пролапса с использованием синтетических имплантов: пути профилактики послеоперационных осложнений. *Акушерство. Гинекология. Репродукция*. 2012; 6(2): 6-13.
4. Краснополянский В.И., Попов А.А. Вагинальная экстраперитонеальная кольпопексия (метод Prolift) — новый взгляд на хирургию опущения и выпадения внутренних половых органов. *Акушерство гинекология*. 2007; 2: 51-57.
5. Лоран О.Б., Синякова Л.А., Дементьева А.В., Твердохлебов Н.Е. Применение синтетических и биологических материалов при лечении сложных мочевого свищей и стрессового недержания мочи. *Consilium medicum*. 2007; 9(4): 46-53.
6. Соловьев В.Б. Клеточная реакция имплантации. *Актуальные науки*. 2016; 2(8): 21-22.

7. Кан Д.В. *Руководство по акушерской и гинекологической урологии*. Москва: Медицина; 1986. 456 с.

8. Олтаржевская Н.Д., Швецов В.И., Коровина М.А., Липатова И.М., Хлыстова Т.С. Выбор состава биополимерной лечебной депо-композиции для использования в различных областях медицины. *Биотехнология*. 2016; 1: 43-52.

9. Зайратьянец О.В. *Общая патологическая анатомия*. Москва: Медицина; 2007.

10. Пикалюк В.С., Гривенко С.Г., Шаранин В.В., Хатинов А.С., Журавель Е.Н., Асанов З.В. Местная реакция тканей а полипропиленовый сетчатый эндопротез при его имплантации в ткани передней брюшной стенки и возможные пути ее уменьшения. *Морфология*. 2014; 8(1): 74-79.

11. Ярош А.А., Должников А.А., Колпаков А.Я., Битенская Е.П., Молчанова А.С., Герасименко Д.В. Исследование биосовместимости хирургических имплантов нового поколения для пластики передней брюшной стенки. *Фундаментальные исследования*. 2011; 10(1): 186-189.

12. Османова А.А. Изменения микрогемодикуляции в раннем посткомпрессионном периоде синдрома длительного сдавления и коррекции инфузией перфторана. *Морфологические ведомости*. 2010; 1: 72-78.

13. Иванова В.Д., Колсанов А.В., Чаплыгин С.С., Юнусов Р.Р., Дубинин А.В., Бардовский И.А. *Клиническая анатомия и оперативная хирургия таза*. Самара; 2011. 112с.

14. Бойко А.В., Корятова Л.И., Олтаржевская Н.Д. *Направленная доставка лекарственных препаратов при лечении онкологических больных*. Москва; Специальное издательство медицинских книг: 2013. 194с.

15. Лоран А.Б., Синякова Л.А., Косова И.В., Охриц В.Е. Лейкоплакий мочевого пузыря как причина стойкой дизурии. *Медицинский совет*. 2009; 1: 9-12.

16. Литвицкий П.Ф. Воспаление. *Вопросы современной педиатрии*. 2006; 5(3): 46-51.

### References

1. Musin I.I., Yashchuk A.G., Dautova L.A., Matigulin R.M. Methods of surgical correction of the urinary incontinence in women of reproductive age. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2013; 8(4): 90-93. (in Russian)
2. Smol'nova T.Yu., Bogdanova S.N., Savel'ev S.V., Petrova V.D. Dysplasia of Connective tissue — as one of the possible causes of urinary incontinence in women with genital prolapse. *Urologiya*. 2001; 2: 25-30. (in Russian)
3. Bezhenar V.F., Bogatyreva E.V., Tscipurdeeva A.A., Tsculadze L.K., Rusina E.I., Guseva E.S. New possibilities of surgical correction of pop with use of synthetic implants: ways of preventive postoperative complications. *Akusherstvo. Ginekologiya. Reproduksiya*. 2012; 6(2): 6-13. (in Russian)
4. Krasnopol'skiy V.I., Popov A.A. Vaginal extraperitoneal colpexy (Prolift method) — a new look at the surgery of descending and prolapse of internal genital organs. *Akusherstvo ginekologia*. 2007; 2: 51-5. (in Russian)
5. Loran O.B., Sinyakova L.A., Dement'eva A.V., Tverdokhlebov N.E. Application of synthetic and biological materials in the treatment of complex urinary incontinence in women. *Consilium medicum*. 2007; 9(4): 46-53. (in Russian)

6. Solov'ev V.B. Cellular implantation reaction. *Aktual'nye nauki*. 2016; 2(8): 21-2. (in Russian)
7. Kan D.V. *Guide to obstetric and gynecological urology. [Rukovodstvo po akusherskoy i ginekologicheskoy praktike]*. Moscow; Meditsina; 1986. (in Russian)
8. Oltarzhevskaja N.D., Shvec V.I., Lipatova I.M., Hlystova T.S. *The choice of the composition of the biopolymer therapeutic depot composition for use in various fields of medicine. Biotechnologiya*. 2016; 1: 43-52. (in Russian)
9. Zajrat'janec O.V. *General pathological anatomy. [Obshchaya potologicheskaya anatomiya]*. Moscow; 2007. (in Russian)
10. Pikalyuk V.S., Grivenko S.G., Sharanin V.V., Khatinov A.S., Zuravel' E.N., Asanov Z.V., Local tissue reaction on the polypropylene mesh endoprosthesis when implanted in the abdominal wall tissue and possible ways to reduce it. *Morfologiya*. 2014; 8(1): 74-9. (in Russian)
11. Yarosh A.L., Dolzhenkov A.A., Kolpakov A.Ya., Bitenskaya E.P., Molchanova A.S., Gerasimenko D.V. Research of biocompatibility of surgical implants of new generation for plasty of anterior abdominal wall. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2011; 10(1): 186-9. (in Russian)
12. Osmanova A.A. Changes in microcirculation in the early postcompression period of prolonged pressure syndrome and correction by perfluorane infusion. *Morfologicheskie vedomosti*. 2010; 1: 72-8. (in Russian)
13. Ivanova V.D., Kolsanov A.V., Chaplygin S.S., Junusov R.R., Dubinin A.V., Bardovskij I.A. *Clinical Anatomy and operative pelvic surgery. [Klinicheskaya anatomiya I operativnaya khirurgiya taza]*. Samara; 2011. (in Russian)
14. Bojko A.V., Korytova L.I., Oltarzhevskaja N.D. *Directed delivery of medicinal preparation in the treatment of cancer patients. [Napravlenaya dostavka lekarstvennykh preparatov pri lecheniinkologicheskikh bol'nykh]*. Moscow; Special'noe izdatel'stvo medicinskih knig; 2013. (in Russian)
15. Loran A.B., Sinjakova L.A., Kosova I.A., Orchic V.E. Leukoplakia of the bladder as cause of persistent dysuria. *Meditsinskiy sovet*. 2009; 1: 9-12. (in Russian)
16. Litvickij P.F. Inflammation. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2006; 5(3): 46-51. (in Russian)

#### Сведения об авторах:

*Эйзенх Игорь Александрович*, врач-уролог отд-ния АЛДО ГАУЗ КО «Новокузнецкая городская клиническая больница № 1», канд. мед. наук, e-mail: eiasom@yandex.ru;

*Швец Виталий Иванович*, каф. биотехнологии и бионанотехнологии, ФГБУ «Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова «Московский технологический университет», доктор хим. наук, проф., акад. РАН;

*Кубатиев Аслан Амирханович*, научный руководитель института ФГБНУ НИИОПП, доктор мед. наук, проф., акад. РАН;

*Мозес Вадим Гельевич*, зав. каф. акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, доктор мед. наук, проф.;

*Ильинская Е.В.*, зав. отд. урологии ГАУЗ КО «Новокузнецкая городская клиническая больница № 1», канд. мед. наук;

*Солуянов М.Ю.*, зав. отд-нием урологии «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», канд. мед. наук.



Бывальцев В.А.<sup>1-4</sup>, Степанов И.А.<sup>1</sup>, Тетюшкин Н.А.<sup>1</sup>, Шамеева М.А.<sup>1</sup>, Алиев М.А.<sup>1</sup>

## Роль цитокинов воспаления в формировании и разрыве артерио-венозных мальформаций головного мозга

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России,

664003, г. Иркутск, Россия, ул. Красного Восстания, д. 1

<sup>2</sup> ЧУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский», 664082, г. Иркутск, Россия, ул. Боткина, д. 10

<sup>3</sup> ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», 664003, г. Иркутск, Россия, ул. Борцов Революции, д. 1

<sup>4</sup> ФГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования», 664049, г. Иркутск, Россия, мкр. Юбилейный, д. 100

Представлен обзор современных данных литературы по изучению роли различных цитокинов воспаления в патогенезе формирования и разрыва церебральных артериовенозных мальформаций (цАВМ). Разрыв цАВМ с формированием внутримозгового кровоизлияния — это наиболее частое и грозное клиническое проявление, приводящее к развитию стойкого неврологического дефицита, ранней инвалидизации и летальным исходам. В патогенезе развития цАВМ важнейшую роль играет воспалительный процесс, приводящий к истончению сосудистой стенки. Обнаружена зависимость между некоторыми генетическими полиморфизмами, которые усиливают экспрессию ряда ангиогенных и провоспалительных факторов, играющих ключевую роль в патогенезе разрыва цАВМ. Представлен анализ экспериментальных исследований, проводимых в мире, по влиянию генетических факторов и провоспалительных цитокинов на развитие, прогрессирование и разрыв цАВМ. Приведены современные данные о молекулярных терапевтических подходах к лечению цАВМ. Обозначены актуальные, остающиеся нерешенными вопросы, что обуславливает необходимость проведения дальнейших экспериментальных и клинических исследований при лечении данной нозологической формы.

**Ключевые слова:** церебральные артерио-венозные мальформации, молекулярный патогенез, генетические полиморфизмы, воспаление, цитокины, потенциальные терапевтические цели.

**Для цитирования:** Бывальцев В.А., Степанов И.А., Тетюшкин Н.А., Шамеева М.А., Алиев М.А. Роль цитокинов воспаления в формировании и разрыве артерио-венозных мальформаций головного мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 185—194.

DOI:

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Бывальцев Вадим Анатольевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нейрохирургии и инновационной медицины ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: byval75vadim@yandex.ru

Поступила 28.12.2017

Byvaltsev V.A.<sup>1-4</sup>, Stepanov I.A.<sup>1</sup>, Tetyushkin N.A.<sup>1</sup>, Shameeva M.A.<sup>1</sup>, Aliyev M.A.<sup>1</sup>

## Role of inflammation cytokines in forming and rupture of brain arterio-venous malformations

<sup>1</sup> Irkutsk State Medical University, Ministry of Health, 1, Krasnoe Vosstanie str., Irkutsk, 664003, Russia

<sup>2</sup> Railway Clinical Hospital on the station Irkutsk-Passazhirskiy of Russian Railways Ltd., 10, Botkina str., 664082, Irkutsk, Russia

<sup>3</sup> Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, 1, Bortsov Revolutsii str., 664003, Irkutsk, Russia

<sup>4</sup> Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, 100, Yubileiniy Microdistrict, 664049, Irkutsk, Russia

This review analyzes current reports on the pathogenetic role of inflammatory cytokines in formation and rupture of cerebral arteriovenous malformations (cAVM). The authors analyzed reports from PubMed, MedLine, and eLibrary databases that addressed the role of inflammatory cytokines in the molecular pathogenesis of cAVM formation and rupture. The cAVM rupture leading to intracranial hemorrhage is the most frequent and formidable clinical manifestation resulting in persistent neurologic deficits, early disability, and death. In the pathogenesis of cAVM development, an important role belongs to the inflammatory process, which induces thinning of the vascular wall. Relationships were found between some genetic polymorphisms that enhance expression of a number of angiogenic and proinflammatory factors that play a key role in the pathogenesis of cAVM rupture. The review presents experimental studies conducted worldwide and focusing on the influ-

ence of genetic factors and proinflammatory cytokines on cAVM development, progression and rupture. The authors provided modern molecular therapeutic approaches to the treatment of cAVM. The topical, still unsolved issues were identified, which warrant further experimental and clinical studies on the treatment of this nosological form.

**Keywords:** cerebral arteriovenous malformations; molecular pathogenesis; genetic polymorphisms; inflammation; cytokines; potential therapeutic targets.

**For citation:** Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Tetyushkin N.A., Shameeva M.A., Aliyev M.A. Role of inflammation cytokines in forming and rupture of brain arterio-venous malformations. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 185—194. (In Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** *Byvaltsev Vadim Anatolievich*, MD, PhD, Head of Neurosurgery and Innovative Medicine Department of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Irkutsk State Medical University» Ministry of Health of Russia; 664082, Irkutsk, 10, Botkina Str., e-mail: byval75vadim@yandex.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

#### Information about authors:

Byvaltsev V.A., <https://orcid.org/0000-0003-4349-7101>

Stepanov I.A., <https://orcid.org/0000-0002-2592-4512>

Tetyushkin N.A., <https://orcid.org/0000-0003-3828-8743>

Shameeva M.A., <https://orcid.org/0000-0002-3085-2998>

Aliyev M.A., <https://orcid.org/0000-0002-5995-3194>

Received 28.12.2017

## Введение

Церебральные артериовенозные мальформации (цАВМ) представляют собой патологический конгломерат сосудов, в котором кровь из артериальной системы шунтируется непосредственно в венозную, минуя микроциркуляторное русло [1, 2]. По данным различных авторов, частота встречаемости цАВМ составляет от 0,94 до 1,34 на 100 000 населения в год, при этом данное патологическое состояние дебютирует в возрасте 30—35 лет [3—5].

На сегодняшний день, основной причиной формирования и разрыва цАВМ является аплазия микроциркуляторного русла, в результате чего возникает гемодинамический удар высокой интенсивности на сосудистую стенку вен, что в конечном итоге приводит к развитию венозной гипертензии и разрыву цАВМ [6, 7]. Разрыв цАВМ с формированием внутрочерепного кровоизлияния — это наиболее частое и грозное клиническое осложнение, приводящее к развитию стойкого неврологического дефицита, ранней инвалидизации и летальному исходу. По данным мировой литературы, кровоизлияния из цАВМ встречаются в 42—65% геморрагических инсультов [8]. К основным факторам риска разрыва цАВМ относятся: малый размер цАВМ (менее 3 см в диаметре), малое количество питающих артерий, небольшой диаметр основного афферента, сочетание с аневризмами сосудов головного мозга, артериальная гипертензия, венозный стеноз, а также возраст не старше 35 лет [8].

Хирургическое лечение цАВМ представляет собой актуальную проблему современной сосудистой нейрохирургии, что зачастую связано с размерами цАВМ, их локализацией в веществе головного мозга и типом венозных дренажей [10]. Недавно опубликованное рандомизированное клиническое исследование, посвященное неразрваным цАВМ ARUBA (A Randomized trial of Unruptured Brain Arteriovenous Malformations), наглядно продемонстрировало, что раннее выявление цАВМ с помощью различных методов нейровизуализации, позволяет эффективно профилактировать разрыв цАВМ и значительно снизить показатели смертности от данной сосудистой аномалии [16]. Тем не менее, смертность от разрыва цАВМ остается высокой, что делает необходимым проведение дальнейших исследований, посвященных изучению генетических и молекулярных механизмов развития, прогрессирования и разрыва цАВМ. Такого рода исследования, позволяют по новому взглянуть на терапевтические подходы к лечению данного заболевания. Доказано, что в патогенезе развития цАВМ важнейшую роль играет воспалительный процесс, приводящий к истончению сосудистой стенки. Более того, обнаружена зависимость между некоторыми генетическими полиморфизмами, которые усиливают экспрессию ряда ангиогенных и провоспалительных факторов, играющих ключевую роль в патогенезе разрыва цАВМ.

*Цель настоящего обзора* — анализ современных данных литературы, посвященных изучению механизмов патогенеза формирования и разрыва цАВМ.

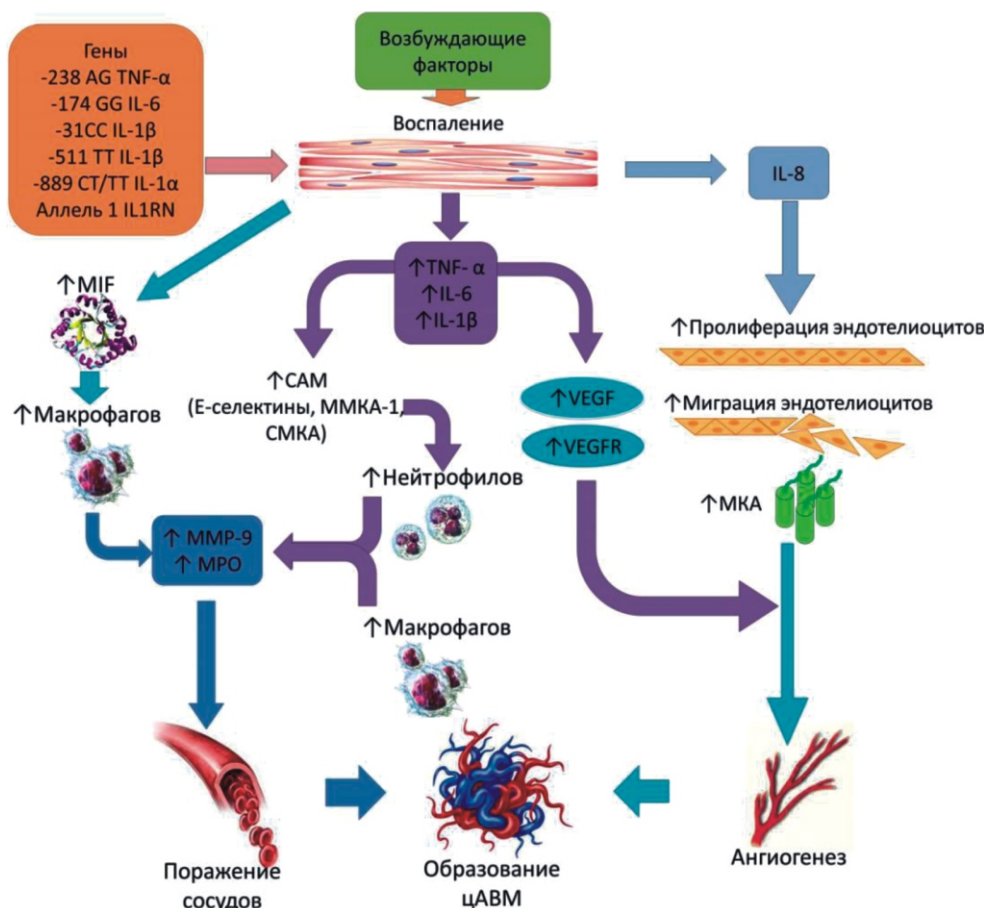
*Генетическая предрасположенность*

Генетическим факторам отводится ведущая роль в развитии процесса воспаления при воздействии различных индуцирующих экзо- и/или эндогенных агентов. В большей части генов, кодирующих провоспалительные цитокины, обнаружены генетические варианты, которые приводят к развитию процесса воспаления и сосудистому дисморфогенезу [11, 12]. В настоящее время установлено, что такие цитокины, как фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-1 и -1 $\beta$  (IL-1 и IL-1 $\beta$ ), а также антагонист рецептора IL-1 (IL1RN) имеют несколько полиморфных маркеров генов, часть из которых вовлечена в патогенез развития сосудистых мальформаций, в том числе и  $\mu$ АВМ.

В исследовании L. Rawlikowska и соавт. [12] обнаружены два полиморфных маркера в гене IL-6 (-174 G>C и -572 G>C) и изучена их роль в развитии внутримозговых кровоизлияний, обусловленных разрывом  $\mu$ АВМ. Наличие генотипа GG генетического варианта -174 G>C гена IL-6 ассоциировано с повышенной экспрессией IL-6 в  $\mu$ АВМ. В свою

очередь, высокий уровень экспрессии IL-6 индуцирует синтез ряда других провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, матриксные металлопротеиназы-3, 9, 12 (ММР-3, 9, 12)), что подтверждает связь между высоким содержанием IL-6 и выраженными протеолитическими процессами в  $\mu$ АВМ. Принято считать, что IL-6-индуцированная экспрессия ММР-9 приводит к деградации внеклеточного матрикса, окружающего микрососудистую сеть и эндотелиальные клетки, что в конечном итоге повышает риск разрыва  $\mu$ АВМ [13, 14]. Наличие у пациента генотипа GG полиморфного маркера -174 G>A гена IL-6 увеличивает риск развития сосудистой аномалии и ее разрыва в 3 раза (рисунок). С другой стороны, при наличии С аллеля вероятность развития сосудистых мальформаций крайне низкая. В других подобных работах достоверно не подтверждена зависимость между наличием генетического варианта -572 G>C и риском разрыва  $\mu$ АВМ [12].

Два полиморфных маркера также обнаружены в гене провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$  у пациентов с  $\mu$ АВМ: -238 G>A и -308 G>A. Наглядно



Молекулярно-генетические и клеточные механизмы патогенеза формирования и разрыва  $\mu$ АВМ.

продемонстрировано [15], что наличие в генотипе генетического варианта -238 G>A связано с высоким риском развития внутримозгового кровоизлияния. Напротив, вероятность разрыва цАВМ при наличии полиморфного маркера -308 G>A минимальная.

В последнее время большое внимание уделяется изучению роли цитокина IL-1 в развитии цАВМ. Показано, что 3 маркера в гене IL-1β, 2 маркера в гене IL-1α и некоторые аллели гена IL1RN связаны с высоким риском кровоизлияния из цАВМ [16, 17]. Пациенты с подтвержденными диагнозами цАВМ и наличием генотипа CC генетического варианта β -31 и генотипа TT полиморфного маркера-511 гена IL-1, имели повышенный риск внутримозгового кровоизлияния, в отличие от пациентов с генотипом CT, TT генетического варианта α -889 C>T гена IL-1 или с аллелью гена IL1RN (рисунок) [16—18]. Таким образом, IL-1 представляется перспективной терапевтической мишенью у пациентов с цАВМ.

*Роль IL-6 в формировании и разрыве цАВМ*

В патогенез формирования цАВМ вовлечены различные провоспалительные цитокины. При этом ключевую роль в развитии цАВМ отводят цитокину IL-6. Установлено, что увеличение синтеза IL-6 в исследуемых тканях приводит к увеличению продукции других провоспалительных цитокинов: IL-1β, TNF-α и IL-8 [19]. Более того, синтез IL-6 стимулирует рост, активацию и пролиферацию лейкоцитов, эндотелия, а также гладкомышечных клеток сосудов (таблица). В формировании лейкоцитарной инфильтрации очага участвуют эндотелиальные клетки, синтезирующие молекулы клеточной адгезии (МКА). В свою очередь, МКА связывают циркулирующие лейкоциты и локализуют их в очаге воспаления. Результаты гистологического исследования показали, что в исследуемых препаратах удаленных цАВМ содержалось большое количество МКА (Е-селектина, межклеточ-

ной МКА-1 и сосудистой МКА-1), а концентрация Е-селектина превышала концентрации МКА в несколько раз [20].

Процесс неоангиогенеза неразрывно связан с действием целого ряда цитокинов, в том числе и IL-6. Так, показано [19], что при воздействии на церебральные эндотелиоциты IL-6 (100 нг/мл) и фактором роста эндотелия сосудов (VEGF, 20 нг/мл), последние имеют практически идентичные эффекты на активацию процесса ангиогенеза. Авторы отметили, что IL-6 способен стимулировать синтез VEGF эндотелиальными клетками сосудов головного мозга, путем активации рецепторов фактора роста эндотелия сосудов-II (VEGFR-II), стимулирования пролиферации гладкомышечных клеток и усиления экспрессии гена MMP-9 [21]. Таким образом, усиленный распад внеклеточного матрикса, непрерывная активация процесса неоангиогенеза и стойкие высокие концентрации IL-6, служат основными факторами риска разрыва цАВМ.

*Роль нейтрофилов, макрофагов и матриксных металлопротеиназ (ММР)*

Многочисленные экспериментальные исследования показывают, что повышенная концентрация провоспалительных цитокинов и избыточная экспрессия МКА, синтезируемых клетками эндотелия сосудов, приводят к скоплению лейкоцитов в цАВМ. Доказано, что повреждение сосудистой стенки связано с ферментативной активностью лейкоцитов, синтезирующих миелопероксидазу, ММР, различные цитокины и протеолитические ферменты [22]. В исследовании Y. Chen и соавт. [23] наглядно продемонстрировано, что в ткани цАВМ при ее иммуногистохимическом окрашивании обнаруживаются клеточные маркеры CD68, CD3 и CD20, соответствующие макрофагам, клеткам микроглии, Т- и В-лимфоцитам. Стоит отметить, что нейтрофилы преимущест-

Таблица

Основные механизмы патогенеза формирования и разрыва цАВМ

	Ответственные провоспалительные цитокины	Основные эффекты
Привлечение лейкоцитов в очаг воспаления	IL-6, TNF-α, IL-1β	Повышение уровня Е-селектина, межклеточных МКА-1 и сосудистых МКА-1
Неоангиогенез	IL-6, VEGF, HIF-1, NF-κB, IL-1β, и IL-8	Экспрессия Е-селектина, межклеточных МКА-1, сосудистых МКА-1, пролиферация и миграция эндотелия, экспрессия МКА, снижение активности апоптотических процессов
Сосудистая нестабильность	MIF, каспаза-3, MMP-9, IL-6, TNF-α, VEGF, снижение количества TIMP	Привлечение в очаг макрофагов, пролиферация эндотелия
Проницаемость сосудов	VEGF	Фенестрация и деградация эндотелия, активация процессов неоангиогенеза
Пролиферация гладких миоцитов	IL-6	Контроль уровней VEGF и MMP-9

венно располагаются на внутренней поверхности сосудистой стенки и в паренхиме цАВМ, а макрофаги локализуются на внешней поверхности сосудистой стенки. При этом ткань цАВМ содержит минимальное количество Т- и В-лимфоцитов. Применение методики двойного иммунофлуоресцентного окрашивания, позволило обнаружить некоторые типы ферментов в цАВМ — миелопероксидазу и ММР-9. Принято считать, что высокое содержание ММР-9 в патологическом очаге связано с активным действием нейтрофилов. Синтез нейтрофилами ММР-9 приводит к разрушению внеклеточного матрикса сосудистой стенки, тем самым уменьшая ее прочность и эластичность. Потеря упруго-эластичных свойств сосудистой стенки неизбежно приводит к ее дилатации и повреждению. Таким образом, можно предположить, что высокое содержание ММР в сосудистой стенке, является фактором риска разрыва цАВМ [22, 24—35]. Так показано [28], что содержание общей фракции ММР, про-ММР и активной ММР существенно выше в цАВМ, в отличие от здоровой мозговой ткани. Уровни содержания тканевых ингибиторов ММР (ТИМР-1 и ТИМР-2) также значимо выше в цАВМ, но их пропорциональное соотношение с ММР-9 значительно меньше, что, вероятно, обуславливает высокий риск разрыва цАВМ.

Известно несколько сообщений, посвященных изучению взаимосвязи между значениями уровней ММР-9 в плазме крови и риском разрыва цАВМ [36]. Исследователи пришли к выводу, что между уровнями концентрации ММР-9 в плазме крови и в ткани цАВМ существует статистически значимая корреляционная зависимость (рис.). Также установлено, что плазменная концентрация ММР-9 у пациентов с цАВМ до выполнения операции значимо выше, в отличие от контроля, повышенная концентрация ММР-9 в плазме крови может рассматриваться в качестве неспецифического маркера данной сосудистой аномалии [36]. Стоит отметить, что через 1 сут. плазменные концентрации ММР-9 после выполнения микронейрохирургической резекции и эндоваскулярной эмболизации сопоставимы между собой, а спустя 30 сут. после операции уровни ММР-9 возвращались к исходным предоперационным значениям.

К настоящему времени установлено, что фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF) участвует в дегенерации сосудов цАВМ. Содержание белка MIF в ткани цАВМ вдвое превышает таковую в нормальном веществе головного мозга [37]. Важно отметить, что функция белка MIF тесно связана с активностью некоторых видов ММР (ММР-2, ММР-9, ММР-12) и одновременно низким содержанием ТИМР, что приводит к дилатации сосудистой стенки

и увеличению риска разрыва цАВМ [13, 38, 39]. Многочисленные наблюдения, посвященные изучению молекулярного патогенеза формирования аневризм брюшной аорты, наглядно продемонстрировали, что MIF индуцирует экспрессию ММР, участвующих в дегенерации структурных белковых компонентов сосудистой стенки (фибрина, фибронектина, тенасцина и остеоонектина) [13, 39, 40]. Примечательно, что внеклеточная форма белка MIF располагается преимущественно в интиме и адвентиции сосудов, в то время как внутриклеточная форма MIF локализуется в мышечной оболочке патологических сосудов цАВМ. Методом введения радиоактивной метки из терминальной трансферазы показано [37], что скорость апоптоза в клетках цАВМ увеличивается в 10 раз. Совокупность вышеперечисленных данных позволяет предположить, что наличие MIF в патологическом очаге способствует скоплению макрофагов и снижению прочности стенок сосудов цАВМ, путем индукции ММР и ускорения апоптотических процессов.

#### *Роль нуклеарного фактора-каппа В (NF-κB) и гипоксией-индуцируемого фактора (HIF-1)*

Особая роль в развитии и прогрессировании цАВМ отводится ангиогенезу и ремоделированию сосудов [41]. Большая часть сосудов головного мозга формируется на стадии эмбрионального развития, с последующим постнатальным созреванием. Известно, что цАВМ — это врожденная сосудистая аномалия головного мозга, образующаяся на поздних стадиях эмбриогенеза. Реже цАВМ могут формироваться *de novo* [9]. Спонтанный рост и регресс цАВМ позволяет высказать предположение о том, что формирование данной сосудистой аномалии не ограничивается лишь стадией эмбрионального развития [43, 44]. Так, при воздействии определенных факторов (хроническая гипоксия, стресс, постоянная физическая нагрузка, изменения гормонального фона) в организме взрослого человека формируется новообразованная сосудистая сеть, что может выступать в качестве субстрата для развития цАВМ [45—50]. Более того, такие патологические состояния, как опухоли головного мозга, инсульты и черепно-мозговая травма, способны влиять на ангиогенез с помощью ангиопоэтинов и VEGF. Данные биологические активные вещества вызывают реактивацию эндотелия сосудов, разрушение сосудистой стенки и слияние перинидальных капилляров с ядром, тем самым увеличивая в размерах цАВМ [51]. С точки зрения клеточной биологии, цАВМ представляет собой динамическую структуру, цАВМ способны увеличиваться или уменьшаться в размерах, в зависимости от концентрации провоспалительных цитокинов и экспрессии ангио-

генных факторов и их рецепторов на эндотелии сосудов. Эндотелиоциты цАВМ экспрессируют высокие уровни VEGF-A, -B, -C, -D и рецептор VEGF-1 [52, 53, 81].

Процесс воспаления стимулирует лимфоциты к синтезу ряда провоспалительных цитокинов, таких, как IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , которые регулируют экспрессию VEGF с помощью различных клеточных сигнальных путей. Указанные цитокины индуцируют экспрессию NF- $\kappa$ B, который, в свою очередь, связывает промоуторные участки генов VEGF и IL-8, тем самым повышая их экспрессию и активируя процессы ангиогенеза в цАВМ [54, 55]. VEGF увеличивает проницаемость капилляров и усиливает действие межклеточной и сосудистой МКА-1, привлекая в патологический очаг лейкоциты и активируя процесс воспаления и деградации сосудистой стенки с помощью лейкоцитарных ММР [56—60]. Более того, VEGF способствует образованию фенестр в области плотных клеточных контактов эндотелиоцитов [61]. Исследования *in vitro* показали, что VEGF индуцирует процессы ангиогенеза, а именно способствует миграции эндотелиоцитов к межклеточному матриксу и построению капилляроподобных трубочек [62]. Кроме того, VEGF способен регулировать экспрессию гена ММР-9 через NO-зависимый механизм [63, 64]. Вышеперечисленные данные позволяют предположить, что индуцированная воспалением экспрессия VEGF, способствует активации процессов ангиогенеза, ремоделированию сосудов и дальнейшему прогрессированию воспаления в стенках цАВМ.

NF- $\kappa$ B-VEGF клеточный сигнальный путь в цАВМ также активируется HIF-1. Благодаря шунтированию крови непосредственно из артериального русла в венозное, прилежащее вещество головного мозга испытывает ишемию, что приводит к накоплению HIF-1, который регулирует экспрессию гена VEGF [65, 66]. HIF-1-зависимая экспрессия гена VEGF способствует пролиферации и миграции эндотелия сосудов, а также ингибированию апоптоза клеток эндотелия (при участии факторов Flt-1 и Flk-1) [65]. Показано [67], что эндотелий цАВМ устойчив к действию дексаметазона и TGF- $\beta$  как мощных проапоптотических агентов. Немаловажное значение в активации процессов ангиогенеза отводится фактору венозной гипертензии. Так представлена [68] сосудистая модель венозной гипертензии на мышцах и оценено влияние данного фактора на состояние мозгового кровотока, уровень оксигенации вещества головного мозга и концентрацию VEGF. Авторы пришли к следующему заключению: венозная гипертензия не оказывает влияния на состояние мозгового кровотока и доставку кислорода в цАВМ, тем не менее, исследователями отмечено статистически значи-

мое увеличение концентрации HIF-1 (в 5 раз) и VEGF (в 3 раза) в плазме крови [68]. Эти данные позволяют утверждать, что экспрессия HIF-1 может увеличиваться не только за счет гипоксии, но и при воздействии ряда провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ ) [68]. Можно предположить, что фактор венозной гипертензии оказывает неблагоприятное воздействие на эндотелиоциты, активируя воспалительный каскад, повышенную экспрессию HIF-1, VEGF и тем самым приводя к формированию новой сосудистой сети (рисунк).

Указанные выше провоспалительные цитокины и биологически активные вещества (IL-6, ММР-9, NF- $\kappa$ B, HIF-1 и VEGF) играют важнейшую роль в регрессии цАВМ, в частности после процедуры эндоваскулярной эмболизации. Дело в том, что внутрисосудистая эмболизация цАВМ способна влиять на уровни экспрессии HIF-1a, VEGF и ММР-9 [36, 69, 70]. Многочисленными исследованиями показано, что в эмболизированных цАВМ отмечаются более высокие концентрации HIF-1 и VEGF [69, 71]. Частичная эмболизация цАВМ приводит к развитию гипоксии, которая участвует в регуляции экспрессии VEGF через NO- и NF- $\kappa$ B-внутриклеточные сигнальные пути и результатом работы перечисленных сигнальных путей является неоангиогенез [26, 27, 36, 63, 70]. Таким образом, неполная эмболизация цАВМ оказывает неблагоприятное воздействие на ее структуру и гемодинамику, что значительно увеличивает риск развития внутричерепных кровоизлияний.

#### *Потенциальные терапевтические цели*

Деградация соединительной ткани ферментом ММР-9, является одним из основных механизмов прогрессирования и разрыва цАВМ [13, 22, 25, 34, 73]. Ингибиторы ММР-9 продемонстрировали высокую эффективность в снижении риска развития внутричерепных кровоизлияний [74—76]. Более того ингибирование фермента ММР-9 способно нивелировать его отрицательное воздействие на стенки цАВМ. При исследовании влияния ингибиторов ММР-9 миноциклина и пирролидина дитиокарбата на моделях цАВМ мышей [26, 27] авторы пришли к выводу, что блокада ММР-9 статистически значимо снижает риск развития внутричерепных кровоизлияний. Миноциклин полностью ингибирует активность церебральной ММР-9, тем самым уменьшая риск развития VEGF-индуцированных внутримозговых гематом. Пирролидина дитиокарбат также снижает активность ММР-9 в среднем на 80% и снижает риск разрыва цАВМ. Кроме того, пирролидина дитиокарбат ингибирует NF- $\kappa$ B, что приводит к уменьшению экспрессии VEGF [26, 27, 63].

Большая часть наблюдений, посвященных изучению влияния ингибиторов ММР-9 на цАВМ, выполнены на моделях животных, и лишь единичные исследования проведены на людях. Так, изучено [29] влияние доксициклина на ММР-9 у 14 пациентов с цАВМ, из которых 10 принимали доксициклин в дозе 100 мг за 1 нед. до оперативного вмешательства (микронеурохирургическая резекция цАВМ), а оставшиеся 4 пациента были включены в группу плацебо. При исследовании резецированных цАВМ показано, что доксициклин способен ингибировать церебральную ММР-9, но достоверных значений в сравнении с группой плацебо авторами не получено. Указанные данные во многом согласуются с результатами предыдущих исследований, посвященных изучению влияния доксициклина на уровни ММР у пациентов с аневризмой брюшной части аорты и атеросклерозом сонных артерий [74, 77].

Не менее перспективным методом терапевтического воздействия на цАВМ является использование ингибиторов VEGF, а частности бевацизумаба. На моделях цАВМ у мышей показано [78], что бевацизумаб способен проникать через интактный гематоэнцефалический барьер в области VEGF-индуцированных очагов ангиогенеза и уменьшать количество новообразованных диспластических кровеносных сосудов.

Другим не менее перспективным методом лечения цАВМ может стать ингибирование Notch-внутриклеточного сигнального пути. В ряде исследований наглядно продемонстрировано, что ингибирование Notch-сигнального пути с помощью доксициклина приводило к редукции сосудов и снижению риска кровоизлияния на моделях АВМ-подобных сосудистых аномалий [26, 27, 72, 79]. В работе на моделях цАВМ мышей отмечено, что применение доксициклина способствовало уменьшению диаметра АВ-шунтов и перестройке кровотока в обход цАВМ по нормальному микроциркуляторному руслу [80]. Тем же коллективом авторов показано, что выключение гена Notch у мышей приводило к быстрой редукции АВ-шунта или его переходу в капиллярные сосуды.

### Заключение

Таким образом, воспаление играет важнейшую роль в развитии, прогрессировании и разрыве цАВМ, путем влияния различных цитокинов на лейкоциты, эндотелиоциты и гладкомышечные клетки сосудистой стенки. Наличие определенных генетических полиморфизмов приводит к повышенной экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  и IL-8), которые способствуют формированию, прогрессированию и увеличению риска разрыва цАВМ. Указанные цитокины стимулируют

миграцию нейтрофилов и макрофагов в очаг воспаления и активируют синтез ММР, приводящих к деградации внеклеточного матрикса сосудистой стенки. Повышенный синтез MIF и VEGF индуцируют процесс воспаления и неоангиогенеза. Использование ингибиторов VEGF и ММР, представляет собой перспективное направление молекулярной терапии пациентов с цАВМ. Тем не менее, необходимы дополнительные лабораторные и клинические исследования, направленные на изучение влияния процессов воспаления на прогрессирование и риск разрыва цАВМ. Несомненно, понимание молекулярно-генетических механизмов позволит разработать новые способы терапевтического воздействия на молекулярно-генетические механизмы формирования и разрыва цАВМ и уже в ближайшее время внедрить полученные результаты в широкую клиническую практику.

### Литература

(п.п. 1—55; 57—81 см. References)

56. Бывальцев В.А., Белых Е.Г., Степанов И.А. Выбор способа лечения церебральных аневризм различных локализаций в условиях развития современных эндоваскулярных технологий: метаанализ. *Вестник РАМН*. 2016; 71(1): 31-40.

### References

1. Shtaya A., Millar J., Sparrow O. Multimodality management and outcomes of brain arterio-venous malformations (AVMs) in children: personal experience and review of the literature, with specific emphasis on age at first AVM bleed. *Child's Nervous System*. 2017; 33(4): 573-81.
2. Belykh E., Lei T., Safavi-Abbasi S., Yagmurlu K., Al-mefty R.O., Sun H., et al. Low-flow and high-flow neurosurgical bypass and anastomosis training models using human and bovine placental vessels: a histological analysis and validation study. *J Neurosurg*. 2016; 22: 1-14.
3. Berman M.F., Sciacca R.R., Pile-Spellman J., Stapf C., Connolly E.S Jr., Mohr J.P. et al. The epidemiology of brain arteriovenous malformations. *Neurosurgery*. 2000; 47: 389-96.
4. Gross B.A., Du R., Natural history of cerebral arteriovenous malformations: a meta-analysis. *J Neurosurg*. 2013; 118: 437-43.
5. Stapf C., Mast H., Sciacca R.R., Berenstein A., Nelson P.K., Gobin Y.P. et al. The New York Islands AVM Study: design, study progress, and initial results. *Stroke*. 2003; 34: e29-e33.
6. Hademenos G.J., Massoud T.F. Risk of intracranial arteriovenous malformation rupture due to venous drainage impairment. A theoretical analysis. *Stroke*. 1996; 27: 1072-83.
7. Vinuela F., Nombela L., Roach M.R., Fox A.J., Pelz D.M. Stenotic and occlusive disease of the venous drainage system of deep brain AVM's. *J Neurosurg* 1985; 63: 180-4.
8. Tiwari R, Singh VK. Arterio Venous Malformation of the Face: Surgical Treatment. *Journal of Maxillofacial & Oral Surgery*. 2015; 14: 25-31.

9. Mohr J.P., Parides M.K., Stapf C., Moquete E., Moy C.S., Overbey J.R. et al. Medical management with or without interventional therapy for unruptured brain arteriovenous malformations (ARUBA): a multicentre, non-blinded, randomized trial. *Lancet*. 2014; 383: 614-21.
10. Mohr J.P., Parides M.K., Stapf C., Moquete E., Moy C.S., Overbey J.R., et al. Medical management with or without interventional therapy for unruptured brain arteriovenous malformations (ARUBA): a multicentre, non-blinded, randomized trial. *Lancet*. 2014; 383: 614-21.
11. Hashimoto T., Lawton M.T., Wen G, Yang G.Y., Chaly T., Jr., Stewart C.L. et al. Gene microarray analysis of human brain arteriovenous malformations. *Neurosurgery*. 2004; 54: 410-23.
12. Pawlikowska L., Tran M.N., Achrol A.S., McCulloch C.E., Ha C., Lind D.L. et al. Polymorphisms in genes involved in inflammatory and angiogenic pathways and the risk of hemorrhagic presentation of brain arteriovenous malformations. *Stroke*. 2004; 35: 2294-300.
13. Rosenberg G.A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*. 2002; 39: 279-91.
14. Li X., Wang R., Wang X., Xue X., Ran D., Wang S. Relevance of IL-6 and MMP-9 to cerebral arteriovenous malformation and hemorrhage. *Mol Med Rep*. 2013; 7: 1261-6.
15. Achrol A.S., Pawlikowska L., McCulloch C.E., Poon K.Y., Ha C., Zaroff J.G. et al. Tumor necrosis factor-alpha-238G4A promoter polymorphism is associated with increased risk of new hemorrhage in the natural course of patients with brain arteriovenous malformations. *Stroke*. 2006; 37: 231-4.
16. Sturiale C.L., Puca A., Sebastiani P., Gatto I., Albanese A., Di Rocco C. et al. Single nucleotide polymorphisms associated with sporadic brain arteriovenous malformations: where do we stand? *Brain*. 2013; 136: 665-81.
17. Kim H., Hysi P.G., Pawlikowska L., Poon A, Burchard E.G, Zaroff J.G. et al. Common variants in interleukin-1-Beta gene are associated with intracranial hemorrhage and susceptibility to brain arteriovenous malformation. *Cerebrovasc Dis*. 2009; 27: 176-82.
18. Fontanella M., Rubino E., Crobeddu E., Gallone S., Gentile S., Garbossa D. et al. Brain arteriovenous malformations are associated with interleukin-1 cluster gene polymorphisms. *Neurosurgery*. 2012; 70: 12-7.
19. Chen Y., Pawlikowska L., Yao J.S, Shen F., Zhai W., Achrol A.S. et al. Interleukin-6 involvement in brain arteriovenous malformations. *Ann Neurol* 2006; 59:72-80.
20. Storer K.P., Tu J., Karunanayaka A., Morgan M.K., Stoodley M.A. Inflammatory molecule expression in cerebral arteriovenous malformations. *J Clin Neurosci*. 2008; 15: 179-84.
21. Yao J.S., Zhai W., Fan Y., Lawton M.T., Barbaro N.M., Young W.L. et al. Interleukin-6 upregulates expression of KDR and stimulates proliferation of human cerebrovascular smooth muscle cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27: 510-20.
22. Chen Y., Fan Y., Poon K.Y., Achrol A.S., Lawton M.T, Zhu Y. et al. MMP-9 expression is associated with leukocytic but not endothelial markers in brain arteriovenous malformations. *Front Biosci*. 2006; 11: 3121-3128.
23. Chen Y., Zhu W., Bollen A.W., Lawton M.T., Barbaro N.M., Dowd C.F. et al. Evidence of inflammatory cell involvement in brain arteriovenous malformations. *Neurosurgery* 2008; 62: 1340-9.
24. Hashimoto T., Wu Y., Lawton M.T., Yang G.Y., Barbaro N.M., Young W.L. Coexpression of angiogenic factors in brain arteriovenous malformations. *Neurosurgery*. 2005; 56: 1058-65.
25. Rosenberg G.A. Growth and bleeding in BAVM: another role for MMPs. *Stroke*. 2003; 34: 925-31.
26. Lee C.Z., Xu B., Hashimoto T., McCulloch C.E., Yang G.Y., Young W.L. Doxycycline suppresses cerebral matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis induced by focal hyperstimulation of vascular endothelial growth factor in a mouse model. *Stroke*. 2004; 35: 1715-9.
27. Lee C.Z., Xue Z., Zhu Y., Yang G.Y., Young W.L. Matrix metalloproteinase-9 inhibition attenuates vascular endothelial growth factor-induced intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2007; 38: 2563-8.
28. Hashimoto T., Wen G., Lawton M.T., Boudreau N.J., Bollen A.W., Yang G.Y. et al. Abnormal expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in brain arteriovenous malformations. *Stroke*. 2003; 34: 925-931.
29. Hashimoto T., Matsumoto M.M., Li J.F., Lawton M.T., Young W.L. Suppression of MMP-9 by doxycycline in brain arteriovenous malformations. *BMC Neurol*. 2005; 5: 1.
30. Lee C.Z., Yao J.S., Huang Y., Zhai W., Liu W., Guglielmo B.J. et al. Dose-response effect of tetracyclines on cerebral matrix metalloproteinase-9 after vascular endothelial growth factor hyperstimulation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26: 1157-64.
31. Cheng S.Y., Nagane M., Huang H.S., Cavenee W.K. Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF121 and VEGF165 but not VEGF189. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 12081-7.
32. Asahi M., Wang X., Mori T, Sumii T., Jung J.C., Moskowitz M.A. et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2001; 21: 7724-32.
33. Hamann G.F., Okada Y., del Zoppo G.J. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996; 16: 1373-8.
34. Montaner J., Alvarez-Sabin J., Molina C.A., Angles A., Abilleira S., Arenillas J. et al. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke*. 2001; 32: 2762-7.
35. Wang X., Tsuji K., Lee S.R., Ning M., Furie K.L., Buchan A.M. et al. Mechanisms of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke. *Stroke*. 2004; 35: 2726-30.
36. Starke R.M., Komotar R.J., Hwang B.Y., Hahn D.K., Otten M.L., Hickman Z.L. et al. Systemic expression of matrix metalloproteinase-9 in patients with cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery*. 2010; 66: 343-8.
37. Chen G., Zheng M., Shu H., Zhan S., Wang H., Zhou D. et al. Macrophage migration inhibitory factor reduces apoptosis in cerebral arteriovenous malformations. *Neurosci Lett*. 2012; 508: 84-8.
38. Noels H., Bernhagen J., Weber C., Macrophage migration inhibitory factor: a noncanonical chemokine important in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2009; 19: 76-86.



39. Schober A., Bernhagen J., Weber C., Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)*. 2008; 86: 761-70.
40. Lukes A., Mun-Bryce S., Lukes M., Rosenberg G.A., Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*. 1999; 19: 267-84.
41. Fleetwood I.G., Steinberg G.K., Arteriovenous malformations. *Lancet*. 2002; 359: 863-73.
42. Uria J., Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases as emerging targets for cancer therapy. *Revista de Oncologia*. 2000; 2: 282-93.
43. Du R., Hashimoto T., Tihan T., Young W.L., Perry V., Lawton M.T. Growth and regression of arteriovenous malformations in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Case report. J Neurosurg*. 2007; 106: 470-7.
44. Minakawa T., Tanaka R., Koike T., Takeuchi S., Sasaki O. Angiographic follow-up study of cerebral arteriovenous malformations with reference to their enlargement and regression. *Neurosurgery*. 1989; 24: 68-74.
45. Black J.E., Isaacs K.R., Anderson B.J., Alcántara A.A., Greenough W.T. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 5568-72.
46. Whitaker V.R., Cui L., Miller S., Yu S.P., Wei L. Whisker stimulation enhances angiogenesis in the barrel cortex following focal ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27: 57-68.
47. Xu K., Lamanna J.C. Chronic hypoxia and the cerebral circulation. *J Appl Physiol*. (1985) 2006; 100: 725-30.
48. Li S., Chen B.P., Azuma N., Hu Y.L., Wu S.Z., Sumpio B.E. et al. Distinct roles for the small GTPases Cdc42 and Rho in endothelial responses to shear stress. *J Clin Invest*. 1999; 103: 1141-50.
49. Louissaint A. Jr., Rao S., Leventhal C., Goldman S.A. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*. 2002; 34: 945-960.
50. Ardelt A.A., McCullough L.D., Korach K.S., Wang M.M., Munzenmaier D.H., Hurn P.D. Estradiol regulates angiopoietin-1 mRNA expression through estrogen receptor $\alpha$  in a rodent experimental stroke model. *Stroke*. 2005; 36: 337-41.
51. Sato S., Kodama N., Sasaki T., Matsumoto M., Ishikawa T. Perinatal dilated capillary networks in cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery*. 2004; 54: 163-8.
52. Jabbour M.N., Elder J.B., Samuelson C.G., Khashabi S., Hofman F.M., Giannotta S.L. et al. Aberrant angiogenic characteristics of human brain arteriovenous malformation endothelial cells. *Neurosurgery*. 2009; 64: 139-46.
53. Koizumi T., Shiraishi T., Hagihara N., Tabuchi K., Hayashi T., Kawano T. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors in and around intracranial arteriovenous malformations. *Neurosurgery*. 2002; 50: 117-24.
54. Angelo L.S., Kurzrock R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 2825-30.
55. Li A., Dubey S., Varney M.L., Dave B.J., Singh R.K. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*. 2003; 170: 3369-76.
56. Byvaltsev V.A., Belykh E.G., Stepanov I.A. The Choice of the Treatment Method for Cerebral Aneurysms of Different Locations in the Era of Advanced Endovascular Technologies: A Meta-Analysis. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2016; 71(1): 31-40. (In Russian)
57. Dvorak H.F., Detmar M., Claffey K.P., Nagy J.A., van de Water L., Senger D.R. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995; 107: 233-5.
58. Vinuela F, Duckwiler G, Jahan R, Murayama Y. Therapeutic Management of Cerebral Arteriovenous Malformations. Present Role of Interventional Neuroradiology. *Interventional Neuroradiology*. 2005; 11: 13-29.
59. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983; 219: 983-5.
60. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N et al. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem*. 1989; 264: 20017-24.
61. Roberts W.G., Palade G.E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci*. 1995; 108: 2369-79.
62. Pepper M.S., Ferrara N., Orci L., Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 189: 824-31.
63. Lee C.Z., Xue Z., Hao Q., Yang G.Y., Young W.L. Nitric oxide in vascular endothelial growth factor-induced focal angiogenesis and matrix metalloproteinase-9 activity in the mouse brain. *Stroke*. 2009; 40: 2879-81.
64. Bhandari V., Choo-Wing R., Chapoval S.P., Lee C.G., Tang C., Kim Y.K. et al. Essential role of nitric oxide in VEGF-induced, asthma-like angiogenic, inflammatory, mucus, and physiologic responses in the lung. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 11021-6.
65. Ng I., Tan W.L., Ng P.Y., Lim J. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in cerebral arteriovenous malformations. *J Clin Neurosci*. 2005; 12: 794-9.
66. Uranishi R., Baev N.I., Kim J.H., Awad I.A. Vascular smooth muscle cell differentiation in human cerebral vascular malformations. *Neurosurgery*. 2001; 49: 671-9.
67. Wautier M.P., Boval B., Chappey O., Enjolras O., Wernert N., Merland J.J. et al. Cultured endothelial cells from human arteriovenous malformations have defective growth regulation. *Blood*. 1999; 94: 2020-8.
68. Zhu Y., Lawton M.T., Du R., Shwe Y., Chen Y., Shen F. et al. Expression of hypoxia inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor in response to venous hypertension. *Neurosurgery*. 2006; 59: 687-96.
69. Sure U., Battenberg E., Dempfle A., Tirakotai W., Bien S., Bertalanffy H. Hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor are expressed more frequently in embolized than in nonembolized cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery*. 2004; 55: 663-9.
70. Buell T.J., Ding D., Starke R.M., Webster Crowley R., Liu K.C. Embolization-induced angiogenesis in cerebral arteriovenous malformations. *J Clin Neurosci*. 2014; 21(11): 1866-71.
71. Sure U., Butz N., Schlegel J., Siegel A.M., Wakat J.P., Mennel H.D. et al. Endothelial proliferation, neoangiogenesis, and potential de novo generation of cerebrovascular malformations. *J Neurosurg*. 2001; 94: 972-7.

72. Murphy P.A., Lam M.T., Wu X., Kim T.N., Vartanian S.M., Bollen A.W. et al. Endothelial Notch4 signaling induces hallmarks of brain arteriovenous malformations in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 10901-6.

73. Rosell A., Ortega-Aznar A., Alvarez-Sabin J., Fernandez-Cadenas I., Ribo M., Molina C.A. et al. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*. 2006; 37: 1399-406.

74. Baxter BT, Pearce WH, Waltke E.A., Littooy F.N., Hallett J.W. Jr., Kent K.C. et al. Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: report of a prospective (phase II) multicenter study. *J Vasc Surg*. 2002; 36: 1-12.

75. Bendeck M.P., Conte M., Zhang M., Nili N., Strauss B.H., Farwell S.M. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol*. 2002; 160: 1089-95.

76. Curci J.A., Mao D., Bohner D.G., Allen B.T., Rubin B.G., Reilly J.M. et al. Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2000; 31: 325-42.

77. Axisa B., Loftus I.M., Naylor A.R., Goodall S., Jones L., Bell P.R. et al. Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaques. *Stroke*. 2002; 33: 2858-64.

78. Walker E.J., Su H., Shen F., Degos V., Amend G., Jun K. et al. Bevacizumab attenuates VEGF-induced angiogenesis and vascular malformations in the adult mouse brain. *Stroke*. 2012; 43: 1925-30.

79. Manning M.W., Cassis L.A., Daugherty A. Differential effects of doxycycline, a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, on angiotensin II-induced atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 483-8.

80. Murphy P.A., Kim T.N., Lu G., Bollen A.W., Schaffer C.B., Wang R.A. Notch4 normalization reduces blood vessel size in arteriovenous malformations. *Sci Transl Med*. 2012; 4: 117ra8.

81. Malyshev I.Yu. Kruglov S.V. Lyamina S.V. Hypoxia, inflammation and phenotypic plasticity of macrophages: the central role of HIF-1 and NF- $\kappa$ B. *Patologicheskaya Fiziolgiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2012; 56 (3): 42-50.

#### Сведения об авторах:

*Бывальцев Вадим Анатольевич*, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нейрохирургии и инновационной медицины Иркутского государственного медицинского университета, зам. директора по инновационной и международной деятельности Иркутского научного центра хирургии и травматологии, главный нейрохирург Департамента здравоохранения ОАО «РЖД», зав. научно-клиническим отделом нейрохирургии Иркутского научного центра хирургии и травматологии, проф. каф. травматологии, ортопедии и нейрохирургии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования, e-mail: byval75vadim@yandex.ru;

*Степанов Иван Андреевич*, аспирант каф. нейрохирургии и инновационной медицины Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: edmoilers@mail.ru;

*Тетюшкин Николай Андреевич*, клинический ординатор каф. нейрохирургии и инновационной медицины Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: kolyntmedis@rambler.ru;

*Шамеева Мария Анатольевна*, клинический ординатор каф. нейрохирургии и инновационной медицины Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: Marishameeva@mail.ru;

*Алиев Марат Амангелдиевич*, докторант каф. нейрохирургии и инновационной медицины Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: a.marat.0903@mail.com

Круглова М.П.<sup>1</sup>, Иванов А.В.<sup>2</sup>, Введенская О.Ю.<sup>1</sup>, Кубатиев А.А.<sup>2</sup>

## Гипергомоцистеинемия и хроническая болезнь почек

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Гипергомоцистеинемия (ННСу) является независимым фактором риска развития сердечно-сосудистых осложнений, а также непосредственной причиной ренальных повреждений у пациентов с хронической болезнью почек (ХБП). В данном обзоре рассмотрены возможные механизмы нарушения метаболизма гомоцистеина (Нсу) при ХБП, а также молекулярные и клеточные механизмы повреждений, опосредованных гипергомоцистеинемией (ННСу).

**Ключевые слова:** гипергомоцистеинемия; хроническая болезнь почек; нитратный стресс; оксидативный стресс; гомоцистеинилирование; гипометилирование; стресс эндоплазматического ретикула.

**Для цитирования:** Круглова М.П., Иванов А.В., Введенская О.Ю., Кубатиев А.А. Гипергомоцистеинемия и хроническая болезнь почек. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 195—201.

**DOI:**

**Для корреспонденции:** Круглова Мария Петровна, старший преподаватель кафедры патологии, e-mail: marykruglova@live.ru

**Финансирование.** Работа не имела спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 06.11.2018

Kruglova M.P.<sup>1</sup>, Ivanov A.V.<sup>2</sup>, Vvedenskaya O.Yu.<sup>1</sup>, Kubatiev A.A.<sup>2</sup>

## Hyperhomocysteinemia and chronic kidney disease

<sup>1</sup> FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991 Moscow, Trubetskaya Str. 8, Bld. 2

<sup>2</sup> FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315 Moscow, Baltiyskaya Str. 8

Hyperhomocysteinemia (ННСу) is an independent risk factor for cardiovascular disease and the direct cause of renal injury in patients with chronic kidney disease (CKD). This review considers the potential mechanisms of homocysteine (Нсу) metabolism disorders, and pathogenesis of molecular and cellular damage mediated by hyperhomocysteinemia (ННСу).

**Keywords:** Hyperhomocysteinemia; chronic kidney disease; nitrate stress; oxidative stress; homocysteinilation; hypomethylation; endoplasmic reticulum stress.

**For citation:** Kruglova M.P., Ivanov A.V., Vvedenskaya O.Yu., Kubatiev A.A. Hyperhomocysteinemia and chronic kidney disease. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2018; 62 (4): 195—201. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Kruglova Maria Petrovna, Senior Lecturer, Department of Pathology, Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991 Moscow, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, e-mail: marykruglova@live.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Kruglova M.P., <https://orcid.org/0000-0001-6939-160X>

Ivanov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2424-6115>

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

**Received** 06.11.2018

## Введение

Хроническая болезнь почек (ХБП) — это состояние, характеризующееся прогрессирующей потерей функции почек в течение нескольких месяцев или лет. Основными причинами ХБП являются нефриты, сахарный диабет (СД), эссенциальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца (ИБС) и в связи с чем распространение ХБП сопоставимо с распространением данных заболеваний и составляет приблизительно 14% [1—2], что обуславливает ее клиническую и социальную значимость. Одной из наиболее актуальных проблем современной нефрологии являются сердечно-сосудистые осложнения у пациентов с ХБП [3—5]. Согласно данным Национального института диабета, заболеваний системы пищеварения и почек США (National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases) для пациентов с ХБП риск умереть от сердечно-сосудистых осложнений более чем в 20 раз выше, нежели вероятность дожить до терминальной стадии болезни [6]. Гипергомоцистеинемия (ННсу) является независимым фактором риска развития сердечно-сосудистых осложнений (инфаркты, инсульты) при различных патологических состояниях, в том числе и при ХБП [7—10]. Так, увеличение концентрации гомоцистеина (Нсу) регистрируется уже на ранних стадиях ХБП и продолжает увеличиваться по мере нарастания почечной дисфункции, при этом увеличение концентрации гомоцистеина в плазме крови на 5 мкм/л увеличивает риск развития сосудистых осложнений на 30% [3]. К настоящему времени представлен ряд данных экспериментальных и клинических исследований, указывающих на непосредственную связь ННсу с развитием как острых, так и хронических нарушений почечной гемодинамики и функции, приводящих к прогрессированию ХБП и развитию сердечно-сосудистых осложнений. *Цель обзора* — обсуждение роли гипергомоцистеинемии в патогенезе ХБП и сопутствующих ей сердечно-сосудистых осложнений.

*Механизмы гипергомоцистеинемии при хронической болезни почек.* Гипергомоцистеинемия — это патологическое состояние, характеризующееся повышением уровня гомоцистеина плазмы крови более 15 мкм/л [9], по сути, является результатом нарушений его метаболизма в метиониновом цикле. Увеличение содержания Нсу в плазме крови у пациентов с ХБП может быть следствием нарушений как почечного, так и общего его метаболизма. Обнаруженная тесная связь между уровнем Нсу, креатинина плазмы и скоростью клубочковой фильтрации (СКФ) [11] изначально позволяла предполагать, что Нсу выводится из организма с мочой посредством клубочковой фильтрации, так же как и креатинин. Однако, было показано, что секреция Нсу с мочой весьма незначительна (около 6 ммоль/сут) и около 99% отфильтрованного Нсу реабсорбируется почками [12]. Также были получены данные о том, что почечная артериовенозная

разница концентраций Нсу незначительна [13, 14], что вновь противоречит утверждению о прямой зависимости уровня Нсу плазмы от СКФ. Присутствие ферментов путей транссульфирования (TS) и реметилирования (RM) гомоцистеина в почечной ткани человека свидетельствует о его возможном почечном метаболизме, и соответственно, нарушение активности или дефицит данных ферментов могут способствовать повышению уровня плазменного Нсу при различных патологических состояниях, в том числе при ХБП [15]. Нарушение почечной перфузии, как вследствие заболеваний почек, так и вследствие сердечно-сосудистой патологии, может приводить к изменению активности ферментов, участвующих в метаболизме Нсу. А поскольку СКФ также зависит от уровня почечного кровообращения, то это может, по крайней мере, частично объяснить связь ННсу с высоким уровнем креатинина плазмы и снижением СКФ.

При ХБП также наблюдается высокий уровень Суs и низкий уровень таурина, коррелирующие с высоким уровнем Нсу [16], поэтому вероятно, что в данном случае имеет место блок декарбоксилирования цистеинсульфоновой кислоты, промежуточного метаболита между Суs и таурином. В связи с этим можно сделать вывод о том, что реакции TS при ХБП не нарушаются [17]. Также предполагается, что уровень таурина влияет на активность фермента ВНМТ (бетаин-гомоцистеин метилтрансферазы) [18, 19]. В результате недостатка таурина компенсаторно увеличивается содержание бетаина, а, следовательно, снижается активность ВНМТ, что приводит к нарушению процессов реметилирования и утилизации Нсу. Почки являются основным органом, утилизирующим плазменный пул SAH — метаболитического предшественника Нсу, являющегося мощным ингибитором реакций метилирования [13, 20]. Таким образом, почки могут косвенно контролировать реакции трансметилирования (ТМ), а значит и экспрессию генов, в том числе генов ферментов ответственных за метаболизм гомоцистеина, что в условиях ХБП может также являться причиной ННсу.

Уровень Нсу непосредственно зависит от уровня фолиевой кислоты. Изначально предполагалось, что у пациентов с ХБП нарушается обмен витаминов, участвующих в метиониновом цикле. Однако у данных пациентов уровни метионина, бетаина и витаминов группы «В» находились на нормальном уровне [15], а положительные результаты с использованием схем лечения ХБП, включающих терапию фолатами [21], позволяют сделать вывод о том, что при ХБП метаболизм фолиевой кислоты и других витаминов не нарушен.

Что касается нарушений экстраренального метаболизма Нсу, то печень является наиболее вероятным органом-мишенью для действия почечных метаболитов. Поэтому альтернативная теория подразумевает под собой нарушение метионинового цикла непосредственно

в печени под действием почечных метаболитов, таких, как SAH, диметилглицина и сульфатов [22]. Поскольку почки играют одну из ведущих ролей в регуляции сосудистого тонуса, снижение их функции может приводить к расстройству кровообращения, в том числе к нарушению местного печеночного кровотока и, как следствие, к снижению активности печеночных ферментов. Исследования показали, что в результате почечной ишемии-реперфузии у крыс снижалась активность глутаматцистеин лигазы и цистатионин-лигаза печени, ответственных за синтез глутатиона — эндогенного антиоксиданта, что приводило к снижению его уровня и повышению уровня гомоцистеина в плазме и в свою очередь способствовало развитию оксидативного стресса [23]. Таким образом, точные механизмы гипергомоцистеинемии при ХБП остаются недостаточно изученными, но большая часть исследовательских данных, свидетельствует о вероятном нарушении метаболизма Hcy преимущественно по пути реметилирования.

*Молекулярные и клеточные механизмы поврежденных, опосредованные гипергомоцистеинемией.* Гомоцистеин обладает широким спектром цитотоксических эффектов и может вызывать как прямые, так и косвенные патологические эффекты различной локализации, инициируя как ренальные, так и сосудистые повреждения. Нарушение функции почек при ХБП, опосредованное как действием первичного патогенного фактора, так и гипергомоцистеинемией, вызывает снижение синтеза депрессорных факторов (кинины, простогландины) и последующее включение в патологический процесс ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), что в результате приводит к развитию эндотелиальной дисфункции, ренопривной артериальной гипертензии и вторичного нарушения почечного кровотока, что усугубляет течение ХБП и способствует прогрессированию эндотелиальной дисфункции и системной циркуляторной гипоксии, формируя порочный круг.

Таким образом, существующая тесная взаимосвязь между почечной патологией и эндотелиальной дисфункцией объясняет целесообразность рассмотрения данных процессов в совокупности. Важнейшими клеточными и молекулярными механизмами повреждений, обусловленными гипергомоцистеинемией, являются гомоцистеинилирование белков, стресс эндоплазматического ретикула (ЭР-стресс), гипометилирование, воспаление, оксидативный и нитратный стрессы.

*Гомоцистеинилирование.* Гомоцистеинилирование — процесс образования ковалентных связей Hcy с белками, с последующим изменением их функции [24]. Существует 2 механизма гомоцистеинилирования белков: S- и N-гомоцистеинилирование. S-гомоцистеинилирование осуществляется путем образования дисульфидной связи между Hcy и остатком цистеина в другой белковой молекуле. N-гомоцистеинилирование является результатом

высокой реакционной способности Hcy-тиолактона (Hcy-TL), синтез которого катализируется метионильной-tРНК синтетазой в присутствии АТФ. N-гомоцистеинилирование происходит при образовании связи между карбоксильной группой тиолактона и аминогруппой остатков лизина другого белка с образованием стабильной амидной связи [25], что, в свою очередь, приводит к изменению его функций. В частности в ходе ряда исследований было показано, что Hcy-TL способен модифицировать альбумины [26], гемоглобин, иммуноглобулины [27, 28], липопротеины [29], фибронектин [30], фибриноген [27, 28]. Так, гомоцистеинилирование фибронектина может приводить к развитию склеротических процессов в почечной ткани и усугублять течение ХБП, модификация липопротеинов (ЛП) приводит к повышению их атерогенности и значительному увеличению риска развития сердечно-сосудистых осложнений, а образование N-Hcy-фибриногена усиливает тромбообразование и приводит к расстройству микроциркуляции. Однако главным образом цитотоксичность этого процесса связана с активацией воспалительных и аутоиммунных процессов и стрессом эндоплазматического ретикула. N-гомоцистеинилирование белков приводит к изменению их структуры, физико-химических свойств и функций. Модифицированные белки могут приобретать свойства антигенов, индуцировать синтез антител и инициировать аутоиммунные реакции. Так было показано, что модификация альбумина и гемоглобина активировал синтез иммуноглобулинов, при этом уровень IgG коррелировал с уровнем общего Hcy (tHcy) и N-Hcy-Lys [26, 31, 32]. Наличие в крови модифицированных белков и антител к ним приводит к образованию иммунных комплексов (комплексов АГ-АТ), что может вызывать прямые клеточные повреждения, главными мишенями для которых являются эндотелий сосудов [32] и базальная мембрана клубочкового аппарата почек. Стресс эндоплазматического ретикула (ЭР-стресс) характеризуется накоплением в просвете эндоплазматического ретикула неправильно свернутых или несвернутых белковых молекул. В результате это вызывает клеточную перегрузку, приводящую к нарушению ее функционирования и в конечном итоге к гибели. Одним из возможных механизмов ответа на ЭР-стресса является изменение экспрессии генов, ответственных за этот процесс. Белок GRP78 является ключевым индуктором ЭР-стресса. Было показано, что тиолактон, опосредованно через активацию NF- $\kappa$ B, увеличивает mРНК, усиливает экспрессию генов белка GRP78 и одновременно способствует его отсоединению от сенсоров ЭР-стресса (IRE, PERK, ATF6) [33]. Это впоследствии приводит к активации сигнальной молекулы IRE-1 (инозитол-зависимый фермент-1) и запуску апоптоза по MAPK-пути. В частности, было показано, что данный механизм реализуется в проксимальных почечных канальцах [34]. Кроме того, было показано, что ак-

тивация NF- $\kappa$ B тиолактоном приводит не только к усилению экспрессии генов белка GRP78, но и провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , ICAM-1 [33], ингибированию экспрессии калий-зависимых кальциевых каналов IKCa и SKCa на поверхности мембран эндотелиоцитов [35], повышению активности NADPH-оксидазной системы и гиперпродукции АФК, тогда как применение ингибиторов ЭР-стресса вызывает обратный эффект и повышает активность SOD, eNOS, таким образом, уменьшая выраженность воспалительного ответа и повреждающих эффектов Hcy [33]. Таким образом, стресс эндоплазматического ретикулума выступает в качестве одного из ведущих механизмов реализации цитотоксического эффекта Hcy, развития воспалительного ответа, оксидативного стресса, гибели клеток и является причиной прогрессии ХБП и Hcy-индуцированной эндотелиальной дисфункции.

**Гипометилирование.** Hcy-индуцированное гипометилирование является одним из ключевых биохимических механизмов, через который реализуется повреждающий эффект гомоцистеина. Увеличение уровня Hcy при ХБП сопровождается увеличением уровня SAH и снижением индекса метилирования, т.е. соотношения SAM /SAH. SAH является метаболическим предшественником Hcy и мощным конкурентным ингибитором метилтрансфераз и, как следствие, реакций трансметилирования, которые играют ключевую роль в эпигенетической регуляции экспрессии генов [36]. Утилизация основного плазменного пула SAH осуществляется почками, поэтому при ХБП его уровень значительно возрастает. Помимо ингибирования ферментативной активности метилтрансфераз, блок переноса метильной группы может быть связан с нарушением экспрессии их генов. Было показано, что Hcy блокирует экспрессию гена G9a, кодирующего метилтрансферазу, и приводит к гипометилированию ДНК [37]. С другой стороны средство SAH к DNMT выше, чем у SAM, и SAH, конкурентно связываясь с DNMT, блокирует ее активность и препятствует процессу переноса метильной группы на акцептор [36]. Это вызывает гипометилирование и, как уже отмечалось выше, изменение экспрессии ряда генов. Так на культивированных эндотелиальных клетках человека было показано, что в условиях гипометилирования снижалась экспрессия и активность eNOS [38], усиливалась транскрипция белка *rb6shc*, ответственного за оксидативный стресс [39], что в результате приводило к развитию эндотелиальной дисфункции. Усиление экспрессии генов провоспалительных цитокинов [40] и клеток иммунной системы [41] вследствие гипометилирования инициирует воспалительный ответ, коррелирующий с уровнем Hcy. В зависимости от локализации процесса и выраженности действия повреждающего фактора, это приводит к запуску процессов клеточной гибели и интенсификации склеротических процессов в почечной ткани, а в случае сердечно-сосудистой си-

стемы — к повреждению эндотелия и развитию системной гипоксии и системного воспалительного ответа.

**Воспаление.** Hcy инициирует системный хронический воспалительный ответ, который является одним из главных признаков ХБП. Так, уже на ранних стадиях ХБП регистрируется увеличение плазменного уровня провоспалительных цитокинов, таких, как интерлейкины (ILs), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [42], С-реактивного белка [43], количество которых продолжает нарастать по мере прогрессирования заболевания, при этом положительно коррелируя с уровнем Hcy. Непосредственную роль в регуляции воспалительного ответа при ХБП играют клетки иммунной системы, в частности моноциты CD40+. CD40 является представителем семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF) [44] и экспрессируется на поверхности антиген-презентирующих клеток, таких как моноциты, макрофаги и дендритные клетки. Лиганд к CD40 (CD40L) относится к семейству цитокинов TNF и в присутствии GM-CSF, IL-3, IFN- $\gamma$  является мощным индуктором синтеза провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6,8 [45]. Так было показано, что блок взаимодействия между CD40 и CD40L позволял снижать тяжесть поражения почек [44]. В другом исследовании указывается, что экспрессия CD40 и плазменные уровни CD40L и провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , ILs) возрастают с повышением степени тяжести ХБП и положительно коррелирует с уровнями Hcy и SAH [41]. Одним из ключевых моментов в запуске воспалительного ответа, опосредованном Hcy, является образование инфламмосомы NLRP3 типа. NLRP3 инфламмосома состоит из 3 основных белков и включает NOD-подобный рецептор NLRP3, адаптерный подобный пятнышку регуляторный белок, ассоциированный с апоптозом и каспазу-1 [46]. NOD-подобные рецепторы играют важную роль в системе врожденного иммунного ответа. Помимо того, что эти рецепторы присутствуют в клетках иммунной системы, их экспрессия также выражена в эндотелиальных клетках, почечных проксимальных канальцах, эпителиальных клетках, гломерулярных моноцитах и подоцитах, что обуславливает эндотелиальные и ренальные повреждения при их активации [22]. В результате сборки инфламмосомы, индуцированной гипергомоцистеинемией, активируется фермент каспаза-1. Каспаза-1, в свою очередь, протеолитически расщепляет и активирует IL-1 $\beta$  и/или IL-18. Затем IL-1,18, опосредованно через активацию NF- $\kappa$ B и увеличение мРНК, усиливают экспрессию генов провоспалительных цитокинов, таких, как IL-6 и IL-1, TNF- $\alpha$ , CRP [42]. Это приводит к развитию воспалительного ответа и запуску гибели эндотелиальных клеток [47] и клеток почечной ткани [46] по механизму пироптоза (программированный некроз), что инициирует сосудистые повреждения и усугубляет течение склеротических процессов в почках.

**Оксидативный стресс.** Механизмы образования активных форм кислорода (АФК) при ННсу главным образом могут быть связаны с процессами автоокисления Нсу, изменением активности NADPH-оксидазной системы (NOX) и развитием митохондриальной дисфункции. Нсу содержит высоко реакционноспособную тиольную группу и может подвергаться быстрому окислению в присутствии ионов кислорода и металлов (железа и меди), и генерировать большое количество АФК, включая супероксид-анион, перекись водорода и гидроксильный радикалы, которые могут вызывать последующее окисление липидов, белков, углеводов, нуклеиновых кислот и приводить к клеточному повреждению. Основным источником радикалов кислорода в клетках является NOX. Нсу-индуцированный локальный и системный оксидативный стресс и, как следствие клеточная дисфункция, связаны с повышением ее активности. В фагоцитирующих клетках Нсу усиливает процессы фосфорилирования цитозольных субъединиц p47 rhox и p67 rhox чрез активацию протеинкиназы С-бета и вызывает их мобилизацию к клеточной мембране, что приводит к сборке и активации ферментативной системы и усилению продукции АФК [22], которая является одной из форм биологической активности фагоцитирующих клеток и соответственно одним из факторов развития оксидативного стресса и воспалительного ответа, как местного, так и системного. Также было показано, что Нсу может усиливать экспрессию NOX-4 и вызывает ее транслокацию в митохондрии, активируя продукцию АФК собственно эндотелиальными клетками [48, 49]. Другим важным источником АФК является транспортная цепь переноса электронов в митохондриях. В определенных условиях, например при действии гипоксического фактора, митохондрии производят супероксид анион радикал. Продукция АФК митохондриями является важным механизмом, опосредующим патогенное действия Нсу. На эндотелиальных клетках пулочной вены человека было показано, что вызванная гомоцистеином митохондриальная дисфункция способствовала образованию АФК и запуску апоптоза эндотелиальных клеток [50]. Таким же образом Нсу может инициировать апоптоз и мезангиальных клеток почек [25, 34].

ННсу-опосредованная продукция супероксида NADPH-оксидазой и митохондриями, а также образование АФК вследствие автоокисления Нсу являются важными биохимическими механизмами в патогенезе различных заболеваний, и при ХБП обуславливают клеточные повреждения, связанные с развитием как локального, так и системного оксидативного стресса и воспалительного ответа.

**Нитратный стресс.** Оксид азота (NO) играет роль сигнальной молекулы в регуляции различных физиологических процессов [22]. Ряд исследований демонстрирует неоднозначные и противоречивые данные

относительно влияния ННсу на уровень NO в плазме крови. С одной стороны было показано, что Нсу снижает активность эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), с последующим уменьшением продукции NO. При этом экспрессия eNOS не изменялась [51]. С другой стороны Нсу активирует индуцибельную форму фермента (iNOS) и способствует гиперпродукции NO [52]. Но в условиях оксидативного стресса это способствует образованию сильнейшего окислителя — пероксинитрита [53]. Пероксинитрит изменяет редокс-статус сосудистой стенки, вызывая увеличение экспрессии молекул адгезии (VCAM-1, ICAM-1), Е-селектина и моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1) в эндотелиальных клетках [37], а также инактивирует супероксиддисмугтазу (SOD), снижая активность системы антиоксидантной защиты [54]. Таким образом, эндотелий-зависимая вазодилатация снижается из-за уменьшения биодоступности оксида азота, которая связана с повышенным образованием пероксинитрита в условиях оксидативного стресса.

## Заключение

Гипергомоцистеинемия является неотъемлемым компонентом ряда заболеваний, в том числе хронической болезни почек. ННсу при ХБП может быть результатом нарушения как почечного, так и общего метаболизма, и является причиной развития сердечно-сосудистых осложнений и собственно ренальных повреждений. Молекулярные и клеточные механизмы реализации патологического действия гомоцистеина многообразны и в данном обзоре были рассмотрены лишь некоторые из них: гипометилирование, гомоцистеинилирование, стресс эндоплазматического ретикулума, активация воспалительного и аутоиммунного ответа, оксидативный и нитратный стрессы. Таким образом, Нсу является ключевым фактором, инициирующим как прямые, так и косвенные цитотоксические эффекты различной локализации, обуславливающие развитие прямых почечных повреждений и эндотелиальной дисфункции, что значительно повышает риск развития сердечно-сосудистых осложнений (инфаркты, инсульты) и уровень летальности при ХБП.

## Литература

(п.п. 1; 2; 4; 6; 7; 9—45; 47—52  
см. References)

3. Шугушев Х.Х., Багова Ф.М., Агтаева М.Ж. Сердечно-сосудистая система и хроническая болезнь почек. *Архив внутренней медицины*. 2014; 2(4): 56-9.
5. Смирнов А.В., Доброзраов В.А., Каюков И.Г. Кардио-ренальный континуум: патогенетические основы превентивной нефрологии. *Нефрология*. 2005; 9 (3): 7-15.
8. Цыбиков Н. Н., Фелелова Е. В., Терешков П. П., Измествев С. В. Дисфункция эндотелия при эксперименталь-

ной гипергомоцистеинемии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(3): 42-6.

46. Пирожков С. В., Литвицкий П. Ф. Роль инфлам-масом в патогенезе социально-значимых заболеваний человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(1): 77-89.

## References

1. Cortinovis M., Ruggenti P., Remuzzi G. Progression, Remission and Regression of Chronic Renal Diseases. *Nephron*. 2016; 134: 20-24.

2. Martinez-Castelao A., Gorriz J.L., Segura-de la Morena J., Cebollada J., Escalada J., Esmatjes E. et al. Consensus document for the detection and management of chronic kidney disease. *Nefrologia*. 2014; 34(2): 243-62.

3. Shugushev H.H., Bagova F.M., Attaeva M.ZH. Cardiovascular system and chronic kidney disease. *Arhiv vnutrennej mediciny*. 2014; 2(4): 56-9. (in Russian)

4. Levin A. Clinical epidemiology of cardiovascular disease on chronic kidney disease prior to dialysis. *Semin Dial*. 2003; 16(2): 101-5.

5. Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Kayukov I.G. Cardio-renal continuum: pathogenetic basis of preventive nephrology. *Nefrologiya*. 2005; 9 (3): 7-15. (in Russian)

6. Herzog C.A., Asinger R.W., Berger A.K. Charytan D.M., Diez J., Hartet R.G. et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2011; 80(6): 572-86.

7. Petersen J.F., Larsen B.S., Sabbah M., Nielsen O.W., Kumarathurai P., Sajadieh A. Long-term prognostic significance of homocysteine in middle-aged and elderly. *Biomarkers*. 2016; 21: 490-6.

8. Cybikov N. N., Fefelova E. V., Tereshkov P. P., Izmes't'ev S. V. Endothelial dysfunction in experimental hyperhomocysteinemia. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(3): 42-6. (in Russian)

9. Heinz J., Kropf S., Luley C., Dierkes J. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease in patients treated by dialysis: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009; 54(3): 478- 89.

10. Salinas F.M., Letelier S.L.M. Effect of homocysteine lowering on mortality and vascular disease in advanced chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Rev Med Chil*. 2009; 137: 982.

11. Ye Z., Zhang Q., Yan Li, Wang C., Zhang J., Ma X. et al. High Prevalence of Hyperhomocysteinemia and Its Association with Target Organ Damage in Chinese Patients with Chronic Kidney Disease. *Nutrients*. 2016; 8: 645-57.

12. Refsum H., Helland S., Ueland P.M. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem*. 1985; 31(4): 624-8.

13. Garibotto G., Sofia A., Saffiotti S., Russo R., Deferrari G., Rossi D., Verzola D., Gandolfo M.T., Sala M.R. Interorgan exchange of aminothiols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 284: 757-63.

14. Van Guldener C. Homocysteine and the kidney. *Curr Drug Metab*. 2005; 6: 23-6.

15. Nakanishi T., Otaki Y., Hasuike Y., Nanami M., Itahana R., Miyagawa K. et al. Association of hyperhomocysteinemia with plasma sulphate and urine excretion in patients with progressive renal disease. *Am J Kidney Dis*. 2002; 40: 909-15.

16. Suliman M.E., DivinoFilho J.C., Barany P., Anders-tam B., Lindholm B., Bergstrom J. Effects of high-dose folic acid and pyridoxine on plasma and erythrocyte sulfur amino acids in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 1287-96.

17. Van Guldener C., Kulik W., Berger R., Dijkstra D.A., Jakobs C., Reijngoud D.J. et al. Homocysteine and methionine metabolism in ESRD: a stable isotope study. *Kidney Int*. 1999; 56: 1064-71.

18. Kim Y.C., Kwon D.Y., Kim J.H. Alterations in the metabolomics of sulfur-containing substances in rat kidney by betaine. *Amino Acids*. 2014; 46(4): 963-8.

19. Jurkowska H., Niewiadomski J., Hirschberger L.L., Roman H.B., Mazor K.M., Liu X. et al. Downregulation of hepatic betaine:homocysteinemethyltransferase (BHMT) expression in taurine-deficient mice is reversed by taurine supplementation in vivo. *Amino acids*. 2016; 48(3): 665-76.

20. Ivanov A., Virus E.D., Nikiforova K.A., Kushlinskii N.E., Luzyanin B.P., Maksimova M.Yu. et al. Capillary electrophoresis and phenylboronic acid solid phase extraction for the determination of S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio in human urine. *Electrophoresis*. 2016; 37: 2663-9.

21. Xie D., Yuan Y., Guo J., Yang S., Xu X., Wang Q. et al. Hyperhomocysteinemia predicts renal function decline: a prospective study in hypertensive adults. *Scientific Reports*. 2015; 5: 162-68.

22. Long Y., Nie J. Homocysteine in Renal Injury. *Kidney Dis*. 2016; 2: 80-7.

23. Shang Y., Siow Y.L., Isaak C.K., Isaak O.K. Downregulation of Glutathione Biosynthesis Contributes to Oxidative Stress and Liver Dysfunction in Acute Kidney Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2016. Available at <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/9707292/>

24. Skovierova H., Vidomanova E., Mahmood S., Sopkova J., Drgova A., Cervenova T. et al. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(10): 1733.

25. Yi F., Li P-L. Mechanisms of Homocysteine-Induced Glomerular Injury and Sclerosis. *Am J Nephrol*. 2008; 28(2): 254-64.

26. Sikora M., Marczak L., Twardowski T., Stobiecki M., Jakubowski H. Direct monitoring of albumin lysine-525 N-homocysteinylated in human serum by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2010; 405(1): 132-4.

27. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteinethiolactone-mediated vascular disease. *J. Physiol. Pharmacol*. 2008; 59: 155-67.

28. Jakubowski H., Glowacki R. Chemical biology of homocysteinethiolactone and related metabolites. *Adv Clin Chem*. 2011; 55: 81-103.

29. Vignini A., Nanetti L., Bacchetti T., Ferretti G., Curatola G., Mazzanti L. Modification induced by homocysteine and low-density lipoprotein on human aortic endothelial cells: an in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(9): 4558-61.

30. Hubmacher D., Sabatier L., Annis D.S., Mosher D.F., Reinhardt D.P. Homocysteine modifies structural and functional properties of fibronectin and interferes with the fibronectin-fibrillin-1 interaction. *Biochemistry*. 2011; 50(23): 5322-32.

31. Jakubowski H. New method for the determination of protein N-linked homocysteine. *Anal Biochem*. 2008; 380: 257-61.

32. Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med*. 2005; 43(10): 1011-4.

33. Wu S., Gao X., Yang S., Meng M., Yang X., Ge B. The role of endoplasmic reticulum stress in endothelial dysfunction induced by homocysteinethiolactone. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015; 29(3): 252-9.

34. Shastry S., Ingram A.J., Scholey J.W., James L.R. Homocysteine induces mesangial cell apoptosis via activation of p38-mitogen-activated protein kinase. *Kidney Int*. 2007; 71: 304-11.



35. Wang X-C., Sun W-T., Yu C-M., Pun S-H., Underwood M.J., He G-W. et al. ER stress mediates homocysteine-induced endothelial dysfunction: Modulation of IKCa and SKCa channels. *Atherosclerosis*. 2015; 242: 191-198.
36. Van Guldener C, Stam F, Stehouwer CD: Hyperhomocysteinaemia in chronic kidney disease: focus on transmethylation. *Clin Chem Lab Med*. 2005; 43: 1026-31.
37. Lei W., Long Y., Li S., Liu Z., Zhu F., Hou F.F. et al. Homocysteine Induces Collagen I Expression by Downregulating Histone Methyltransferase G9a. *PLoS One*. 2015; 10(7):e0130421.
38. Barroso M., Rocha M.S., Esse R., Goncalves I.Jr., Gomes A.Q., Teerlink T. et al. Cellular hypomethylation is associated with impaired nitric oxide production by cultured human endothelial cells. *Amino Acids*. 2012; 42(5): 1903-11.
39. Kim C.S., Kim Y.R., Naqvi A., Kumar S., Hofman T.A., Jung S.B. et al. Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66shc. *Cardiovasc Res*. 2011; 92(3): 466-75.
40. Familtseva A., Jeremic N., Kunkel G.H., Tyagi S.C. Toll-like receptor 4 mediates vascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Mol Cell Biochem*. 2017; 433(1-2): 177-94.
41. Yang J., Fang P., Yu D., Zhang L., Zhang D., Jiang X. et al. Chronic Kidney Disease Induces Inflammatory CD40+ Monocyte Differentiation via Homocysteine Elevation and DNA Hypomethylation. *Circulation Research* 2016; 119(11): 1226-41.
42. Babaei M., Dashti N., Lamei N., Abdi K., Nazari F., Abbasian S., Gerayeshnejad S. Evaluation of plasma concentrations of homocysteine, IL-6, TNF-alpha, hs-CRP, and total antioxidant capacity in patients with end-stage renal failure. *Acta Med Iran*. 2014; 52(12): 893-8.
43. Pang X., Si J., Xu S., Li Y., Liu J. Simvastatin inhibits homocysteine-induced CRP generation via interfering with the ROS-p38/ERK1/2 signal pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol*. 2017; 88: 42-7.
44. Kairaitis L., Wang Y., Zheng L., Tay Y.C., Wang Y., Harris D.C. Blockade of CD40-CD40 ligand protects against renal injury in chronic proteinuric renal disease. *Kidney Int*. 2003; 64(4): 1265-72.
45. Alderson M.R., Armitage R.J., Tough T.W., Strockbine L., Fanslow W.C., Spriggs M.K. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med*. 1993; 178 (2): 669-74.
46. Pirozhkov S.V., Litvickij P.F. The role of inflammas in the pathogenesis of socially significant human diseases. Pathological physiology and experimental therapy. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(1): 77-89.
47. Xia M., Conley S.M., Li G., Li P-L., Boini K.M. Inhibition of Hyperhomocysteinemia-Induced Inflammasome Activation and Glomerular Sclerosis by NLRP3 Gene Deletion. *Cell Physiol Biochem*. 2014; 34(3): 829-41.
48. Xi H., Zhang Y., Xu Y., Yang W.Y., Jiang X., Sha X. et al. Caspase-1 Inflammasome Activation Mediates Homocysteine-Induced Pyroptosis in Endothelial Cells. *Circ Res*. 2016; 118(10): 1525-39.
49. Steed M.M., Tyagi S.C. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15: 1927-43.
50. Tyagi N., Sedoris K.C., Steed M., Ovechkin A.V., Moshal K.S., Tyagi S.C. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289: 2649-56.
51. Zhang Z., Wei C., Zhou Y., Yan T., Wang Z., Li W., Zhao L. Homocysteine Induces Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells via Mitochondrial Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; Available at: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/5736506/>.
52. Zhang X., Li H., Jin H., Ebin Z., Brodsky S., Goligorsky M.S. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000; 279(4): 671-8.
53. Widner B., Enzinger C., Laich A., Wirleitner B., Fuchs D. Hyperhomocysteinemia, pteridines and oxidative stress. *Curr Drug Metab*. 2002; 3: 225-32.
54. Szabo C., Mabley J.G., Moeller S.M., Shimano-vich R., Pacher P., Virag L. et al. Pathogenetic role of peroxynitrite in the development of diabetes and diabetic vascular complications: studies with FP15, a novel potent peroxynitrite decomposition catalyst. *Mol Med*. 2002; 8: 571-80.
55. Wu S, Gao X, Yang S, Meng M, Yang X, Ge B. The role of endoplasmic reticulum stress in endothelial dysfunction induced by homocysteine thiolactone. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015; 29(3): 52-9.

### Сведения об авторах:

Круглова Мария Петровна, старший преподаватель, каф. патологии; Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России;

Введенская Ольга Юрьевна, канд. мед. наук, доцент, каф. патологии; Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России;

Иванов Александр Владимирович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., ФГБНУ НИИОПП;

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, науч. руководитель института, ФГБНУ НИИОПП.

Пальцын А.А.

## Кишечная микробиота

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8  
Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования Российская медицинская Академия последипломного образования, 123995, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1

Совершенствование методов генетического анализа и развернувшиеся на этой основе работы по международному проекту «Микробиом человека» представили большой объем знаний, существенно меняющих представления об эволюции живой природы и о механизмах развития многих болезней. Пришло осознание факта, что здоровье и болезни человека в большой степени определяются взаимодействием его собственных клеток с населяющими его тело (прежде всего кишечник) микробными (прежде всего бактериальными) клетками. Главенство в этом вопросе бактерий кишечника объясняется их подавляющей многочисленностью, позицией на первичном рубеже обмена со средой и невозможностью жизни без этого обмена. Результаты обширных теоретических и клинических исследований уже сегодня могут стать основой профилактики и терапии некоторых незаразных пандемий современности. Однако научно вполне достижимый дальнейший масштабный успех в преодолении этих пандемий тормозится внешними причинами. Кишечная микробиота связывает здоровье людей с экологией планеты, с сельским хозяйством и пищевой промышленностью. Действия же международных корпораций направляются интересами не здравоохранения, а получения максимальной выгоды в минимальные сроки.

**Ключевые слова:** голобионт; хологеном; микробиота; микробиом; биоразнообразие; резистомы; вестернизация; энтеротип.

**Для цитирования:** Пальцын А.А. Кишечная микробиота. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 202—208.

**DOI:**

**Для корреспонденции:** Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 15.07.2018

Paltsyn A.A.

## Gut microbiota

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia  
Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 123995, Russia

Improving methods of genetic analysis and the work developed on this basis under the «Human Microbiome» international project presented a large amount of knowledge that has significantly changed ideas about the evolution of living nature and mechanisms underlying development of many diseases. People became aware of the fact that human health and diseases are largely determined by the interaction of the body's own cells with the microbial (primarily bacterial) cells inhabiting the body (primarily the intestine). The dominance of intestinal bacteria in this aspect is explained by their overwhelming multiplicity, position on the primary border of exchange with the environment, and the impossibility of life without this exchange. Results of extensive theoretical and clinical research already today can become a basis for prevention and treatment of some current non-infectious pandemics. However, although further, large-scale success in overcoming these pandemics is scientifically quite achievable, certain political reasons hamper it. Intestinal microbiota connects human health with the global ecology, agriculture, and the food industry while actions of governments and international corporations are driven by obtaining maximum benefits in the shortest possible time rather than interests of health care.

**Keywords:** golobiont; hologenom; microbiota; microbiome; biodiversity; resistomes; westernization; enterotype.

**For citation:** Paltsyn A.A. Gut's microbiota. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2018; 62(4): 202—208. (In Russian).

**DOI:**

**Corresponding author:** Paltsyn A.A., lrrp@mail.ru

**Financing.** The study has not sponsorship.

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

**Received** 15.07.2018

Наши пищевые вещества должны быть лечебным средством, а наши лечебные средства должны быть пищевыми веществами.  
Гиппократ (460—377 г. до н.э.)

Микробы — наиболее древняя, наиболее многочисленная, и вероятно, наиболее успешная форма жизни на Земле. Они принимают участие в эволюции и функции всех более сложных многоклеточных организмов. Кишечная микробиота — совокупность всех микробов: бактерий, грибов, простейших и вирусов, живущих внутри пищеварительного тракта человека и других живых существ, включая насекомых. В большинстве случаев речь идет о бактериях. В современных медико-биологических исследованиях изучение микробиоты — популярнейшая тема. Это объясняется тем, что в последние годы пришло осознание важнейшей роли микробиоты в здоровье и болезнях людей. А также тем, что вмешательство в организм здорового и больного человека через микробиоту сейчас представляется гораздо реалистичнее многих других медицинских технологий.

Сегодня мы все очевидцы и участники важного мировоззренческого события: вселения в наше сознание, образ жизни и деятельности нового представления об организме как экологическом сообществе. Прежние знания о микробах как о чем-то присутствующем в теле, влияющем на здоровье или безразличном для него стали недостаточными, наивными. Всё большее и разнообразное подтверждение приобретает идея, что микробы не просто присутствуют в нас, а являются нами, образуют нас, как и мы, образуя (в значительной мере) их, формируем нашим биомолекулярным комплексом с ними экологическую единицу. Эта единица называется голобионт, а сумма генов человека и обитающих в нем микробов образует гологеном.

Появилась обширная литература, развивающая теорию эволюции с учетом эволюционной роли гологенома [1]. Сегодня уже нельзя изучать и объяснять биологию животных и растений, игнорируя межгеномные связи голобионта. Такие суждения ненадежны, опасны большой вероятностью грубых ошибок. Значительность роли гологенома, не говоря уже о прочих моментах, обуславливается огромной сравнительно с млекопитающими скоростью геномных изменений микробов, быстрой сменой их поколений. Пример предельной интеграции «интересов» про- и эукариотов в голобионте с невозможностью жить друг без друга известен давно — это митохондрии и хлоропласты. Если забыть о стремительном нарастании неблагоприятных для сохранения жизни экологических изменений на Земле и допустить дальнейшее развитие биосферы, то можно предположить создание голобионтами дополнительных к митохондриям и хлоропластам примеров, внутриклеточного сожительства про- и эукариотов.

В качестве лирического отступления, обращаю внимание читателя на то, что в нашей теме присутствует нередкий в истории развития наук момент. Мудрые люди «старинны глубокой» высказывали суждения, соответствующие новейшим открытиям. Одно из таких суждений я привел в качестве эпиграфа, о другом, дошедшем из той же исторической эпохи, прочитал в статье А.Ц. Торосьяна [2]: у Эскулапа из трех дочерей — Терапии, Гигиены и Кулинарии — любимой была Кулинария.

В журнале «Nature» в 2010 г. [3] были опубликованы результаты работы большой международной группы ученых по секвенированию метагенома — всех, содержащихся в теле человека, микробных генов. Установили, что число микробных клеток приблизительно в 10 раз превышает число клеток человека, а по сумме генов мы уступаем нашему микробиому уже 100—200-кратно. Авторы отмечают, что их данные по Европейским метагеномам более чем на 70% совпадают с результатами исследований в Америке и Японии. В исследуемом материале 99,1% генов были бактериального происхождения, 0,1% — гены эукариотов и вирусов, остальные — гены археев. Среднее минимальное число бактериальных видов у человека, по данным этого исследования, 160. И многие из видов общие для разных людей. Однако количественное представительство отдельных видов у индивидуумов может различаться в 2200 раз. Достаточно часто обнаруживая связь продолжительной диеты с количественным представительством каких-то микробов стали, выделять, так называемые энтеротипы [4]. Например, *Prevotella* — энтеротип, характерный для насыщенной фруктами и овощами диеты с высоким содержанием клетчатки, а энтеротип *Bacteroides* формируется при обилии животного жира и белка [5]. Будучи относительно стабильными в отношении кратковременных изменений диеты, энтеротипы могут изменяться продолжительной пищевой программой [6, 7].

Исследование Qin с соавторами [3] и другие аналогичные, по цели, методу и результатам работы, изменяют представление о биологии и механизмах эволюции человека. Возникает вопрос о содержании личного в нашей личности. Все процессы человеческой жизни (морфологическое и функциональное развитие, рост, обучение, труд, творчество, развлеченция, любовь) осуществляются, наряду с генами *Homo sapiens*, гораздо большим количеством микробных генов. Сумма или, точнее, комплекс тех и других генов — гологеном — определяет анатомию, физиологию, иммунологию, патологию, барьер с внешней средой, интеллект, эстетику, пороки, рост, развитие, эволюцию нашего вида. Чрезвычайно активное сегодня изучение микробной составляющей гологенома — микробиома открыло его неотъемлемое участие в барьерной функции слизистой кишечника и кожи, в обеспечении «обу-

чения» и зрелой функции иммунной системы, в защите от патогенов и метаболизме ксенобиотиков [8]. Микробиом обеспечивает сопряжение питания с метаболизмом, экстракцию нутриентов, продукцию витаминов, приемлемое для млекопитающего преобразование растительных компонентов диеты, метаболизм липидов, образование короткоцепочечных жирных кислот и других метаболитов. Близость гологономов и энгеротипов, по-видимому, в какой-то мере определяет, известное уже тысячи лет сходство людей одной местности — земляков.

Микробная стимуляция регулирует развитие иммунной системы. Сегодня известно, что для благоприятного развития иммунологических отношений микроб—макроорганизм их «знакомство» должно произойти в раннем детском возрасте макроорганизма, пока существует, так называемое «окно возможности» [9]. Аналогичное временное «окно» есть у детей и для благоприятного формирования связей: микробиота—мозг [10]. Снижение антигенного разнообразия внешней и внутренней среды ведет к нарастанию случаев ранних воспалительных заболеваний — детских аллергических болезней и повышению риска воспалительных болезней в позднем возрасте [11]. В качестве одного из многих клинических подтверждений сказанного можно привести результаты обследования большой группы детей из Детройта [12]. Авторы начали работу с 835 детьми в первый год их жизни. До конечного результата (в возрасте 6—7 лет) удалось проследить 474 ребенка (57%). В первый год жизни дети жили с двумя или большим числом собак или кошек в доме. У этих детей в 6—7-летнем возрасте был снижен риск аллергической сенсибилизации ко многим аллергенам сравнительно с детьми, не имевшими в доме животных. В 2017 г. в США издана, написанная серьезными специалистами, научно-популярная книга по микробиому и здоровью детей с задиристым, но не безграмотным названием: «Грязь — это хорошо» («Dirt is Good»).

Микробиом каждого человека уникален. Однако есть и объединяющие всех характеристики. Это присутствие четырех главных типов: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroides* и сотен их видов [13]. А вот в соотношениях: количественных по типам, количественных и качественных по видам — нет двух одинаковых людей.

Непосредственная связь мозга и микробиоты была показана в исследовании Sudo с соавт. [14]. Они обнаружили, что в коре и гиппокампе безмикробных мышей содержание BDNF ниже, чем у нормальных животных. Безмикробные животные сильнее реагировали на стресс, судя по уровню кортикостерона и АКТГ.

Взаимодействие: кишечная микробиота — мозг осуществляется несколькими способами. Нервный путь — через вагус с возможностью передать в мозг анксиогенный или анксиолитический стимул [15]. Аfferентный противовоспалительный сигнал по вагусу в направлении

кишечник — мозг индуцирует эfferентный медиаторный ответ, например выделение ацетилхолина, его контакт с иммунными клетками и подавление воспаления [15]. Опосредованное вагусом влияние может распространяться на настроение и поведение. Гуморальный путь — связь и взаимовлияние кишечника и мозга посредством цитокинов и гормонов. Связь кишечная микробиота — мозг в высокой степени зависима от барьерной функции кишечника, при её нарушении развиваются воспалительные и дисрегуляторные процессы [8]. Наконец, кишечный микробиом производит биоактивные метаболиты (короткоцепочечные жирные кислоты, полифенолы), предшественники психотропных веществ — триптофан. Бактерии способны синтезировать многие нейромедиаторы, в том числе: соматостатин, ацетилхолин, прогестерон, дофамин, норадреналин. Они могут связываться с рецепторами хозяина интра- и экстра-интестинально (например, через порталный кровоток) в количествах, достаточных для системного ответа [16]. В качестве примера многочисленных клинических свидетельств связи кишечной микробиоты с неврологическими болезнями можно напомнить известный факт желудочно-кишечных расстройств и, в особенности запоров, предшествующих в течение многих лет развитию двигательных расстройств при болезни Паркинсона [17]. Исследуя микробиом в период выраженных неврологических проявлений этой болезни, авторы обнаружили избытие, в сравнении с контролем, бактерий группы *Enterobacteriaceae*, оно было положительно связано с постуральной нестабильностью и затрудненностью походки.

Не менее интересны в теоретическом и практическом отношении свидетельства того, что нейромедиаторы хозяина, продуцируемые, в частности, при стрессе, например, адреналин могут существенно ускорять рост бактерий *in vitro* и *in vivo* [16]. Прямое влияние мозга на экспрессию микробных генов в кишечнике дополняется и модулируется влиянием на перистальтику, секрецию и проницаемость кишечной стенки.

Микробиом человека определяется многими факторами и меняется в течение жизни. Основные факторы влияния на состав микробиома: наследственность, способ рождения (естественный, кесарево сечение), диета, возрастные изменения [18], патологические процессы в органах пищеварения [19].

Наиболее обширное поле медицинской деятельности представляет собой диета. Для микробиома этот фактор мощнее наследственности. С целью изучения связи здоровья и болезней человека с кишечным микробиомом была проведена статистический метаанализ результатов 2000 исследований в 8 клиниках [20]. Авторы стремились определить показатели здоровья и болезни в результатах анализа кишечных микробиомов человека. Знание таких признаков необходимо для диагностики, определения этиологии и способов восстановления здоровья. Работой

по проекту «Микробиом человека» был охарактеризован микробиом клинически здоровых горожан северной Америки [21]. Много выполнено исследований по отдельным заболеваниям. Но как раз обилие данных затрудняет вынесение практически значимых суждений (объем данных превышает аналитические возможности). Находят множество видов микробов при множестве болезней. В отношении почти каждого вида ещё нужно определить: обнаружение или обилие микробов — это причина или результат болезни. Выделить в этих условиях *специфические* связи микроба с болезнью сложно. Эти ограничения затрудняют однозначную клиническую диагностику по данным микробиома, затушевывают понимание механизма, которым обеспечивается благотворное или болезнетворное действие микробиома. При сформировавшемся сегодня ясном понимании связи микробиома и болезней и безусловной принципиальной возможности профилактических и лечебных влияний через микробиом, — практическое воплощение этой идеи остается в значительной мере не решением, а задачей, которую необходимо решить [18].

Уже умозрительно можно допустить, что микробиом кишечника зависит от диеты как фактора среды в коэволюции человека и кишечной микробиоты. В этой сфере наибольший интерес привлек фактор, так называемой вестернизации, т.е. влияния всё более распространяющейся городской и американизированной диеты. Её наиболее обсуждаемая особенность — большое содержание жира. Эта популярная тема исследований, в том числе и в рамках международного проекта «Human Microbiome». В качестве эталона сравнения многократно избиралась диета (менее жирная, насыщенная клетчаткой) сельских жителей, в частности охотников-собирателей из Танзании. Большое содержание волокон в их диете способствует развитию разрушителей волокон, в частности, рода *Firmicutes* производящего короткоцепочечные жирные кислоты: масляную, уксусную, пропионовую. Они — основной источник энергии для эпителия кишечника, регулируют иммунитет и обмен веществ, обеспечивают противовоспалительную и противоопухолевую защиту. Недостаток этих кислот часто связывают с такими тяжёлыми заболеваниями, как болезнь Крона и язвенный колит. В связи с этим волокна также называют пребиотиками.

В обзорах по проблеме [11, 22] подчеркивается, что при вестернизированной диете микробиом становится существенно беднее в отношении разнообразия видов. В статье Gupta и соавт. [23] приведены итоги ряда международных исследований влияния на состав микробиома условий жизни и питания людей. Самое большое разнообразие кишечной микробиоты найдено у наименее цивилизованных туземцев, питающихся подобно животным, за счет охоты и собирательства растительных продуктов. Биоразнообразие микробиома сельских жителей — уже

не охотников и собирателей, а животноводов и растениеводов — авторы оценили как высокое. Городские жители отличались минимальным биоразнообразием микробиома, по сути вестернизированным независимо от полушария, в котором расположен город. Для вестернизации характерно исчезновение видов, способных ферментировать волокна, расщеплять макромолекулы на малые (ключевые для хозяина) метаболиты. Заметно снижается способность расщеплять моно- и полисахариды. Развивается дисбиоз с утратой полезных и экспансией неблагоприятно влияющих на здоровье видов. Противопоставляемые дисбиозу приемы: дезинфекция, стерилизация, моющие средства и антибиотики оказываются малоэффективными, но многоаллергизирующими, а повышенная чистота порой вредит микробиому. Наряду с собственно бактериологическими неблагоприятными изменениями под словом дисбиоз часто имеются в виду загрязнения среды, нездоровая диета, *Bacteroides*, фастфуды, пищевые добавки, консерванты, эмульгаторы, усилители вкуса, красители, сладости, нарушения циркадных ритмов — т.е. распространение вестернизации с пищевого режима уже и на стиль жизни.

При общем оскудении вестернизированного микробиома идет «обогащение» генами метаболизма ксенобиотиков: нафталина, хлорсодержащих соединений органической химии, консервантов, ксилы, нефтепродуктов, пищевых консервантов — спутников коммерциализации пищи в индустриальных экономиках. Особо интересны для медицины так называемые «резистомы», вестерн-микробиомов — комплексы микробных генов, создающих устойчивость к антибиотикам [24]. Недостаточная ясность механизмов распространения резистом и даже теоретическая (не говоря уже о практической) беспомощность современной медицины в этом вопросе иллюстрируется работой международного коллектива ученых [25]. Они исследовали жителей индейской деревни в бассейне Амазонки, не имевших документированных контактов с «цивилизацией» больше 11 000 лет. Существенно большее, чем у «вестернов» разнообразие их микробиомов омрачалось, однако, находкой *резистом* к *синтетическим антибиотикам*.

Цивилизация (почти синоним вестернизации) уже нанесла невосстановимый ущерб макроэкологии Земли. Несомненно, что микроэкология человека, если этим словом обозначить микробиом, уже необратимо нарушена в отношении антибиотикоустойчивости. Вполне вероятно и невосполнимая потеря некоторых представителей нашего «доцивилизационного» микробиома.

Всеобщая связь всех явлений природы определяет печальную закономерность. Из живого мира нельзя изъять какого-либо вида без ущерба для того сообщества, которое пока осталось живым. Удаление вида, или даже гена нарушает сформированную эволюцией эффективность биологического сообщества в переработке незаменимых

ресурсов (пищи, газов, воды, тепла, света) и превращении этих ресурсов в биомассу. Результат — оскудение биоразнообразия Земли. Биоразнообразие прямо связано со стабильностью экосистемы [26]. К сожалению, принятая 193 странами (США не участвовали) «Конвенция о сохранении биологического разнообразия, устойчивом и равноправном его использовании» реально не выполняется и *устойчивость*, наблюдается не в сохранении, а в утрате биоразнообразия и падении стабильности экосистемы. Подтверждаю эти слова одним из катастрофически большого числа печальных сообщений об уменьшении численности или исчезновении видов растений и животных. Оно характеризует страну, рвущуюся к «прогрессу» — Китай [27]. За 50 лет из 252 охраняемых, как они пишут «ключевых», видов позвоночных исчезли: 47,7% млекопитающих, 28,8% амфибий и рептилий, 19,8% птиц. Самое действенное, подлинно радикальное вмешательство в здоровье человека было бы *лечение Планеты, сохранение её биоразнообразия*. Но человечество жадностью и глупостью закрыло этот путь. Поэтому все рассматриваемые в этой медицинской статье микробиом — опосредованные оздоровительные меры, по сути — паллиатив. Однако, я продолжаю писать статью, поскольку паллиатив, уступая, конечно, по мощности глобальным мерам, всё же пока ещё способен оказывать профилактическое и лечебное действие.

Сегодня имеется множество свидетельств того, что давление цивилизации на общее биоразнообразие, попутно «сжало» биоразнообразие кишечного микробиома человека и это воплотилось в широкое распространение многих неинфекционных заболеваний, в том числе: астмы, аллергических и воспалительных заболеваний кишечника, легких, диабета 1 и 2 типа, метаболического синдрома, депрессии. Часто события, определяющие риск этих заболеваний совершаются в раннем возрасте, а реализуются в форме болезни через десятилетия [28]. Эти авторы [28] предложили для обозначения отрицательного влияния современной экологической среды слова дисбиоз или жизнь в дистрессе. Имеется в виду комплекс происходящих неблагоприятных изменений среды, повреждающих все экосистемы, замещающих «зеленое пространство» «серым пространством», создающих условия, разрушающие физическое, ментальное и социальное здоровье с первого момента и до конца жизни. Совершившаяся «индустриальная революция», конечно повлиявшая на гены человека, оказала гораздо большее воздействие на гены микробиоты [29]. Результатом таких воздействий становится изменение системного и местного (в кишечнике) иммунного ответа, его губительный вклад в быстро нарастающую пандемию незаразных заболеваний [30].

Одним из влияний вестернизации на диету (с недостатком некоторых веществ и добавкой некоторых химических) стало существенное уменьшение или даже полное

исключение из неё цельных злаковых зерен. Цельные злаковые зерна, в противоположность очищенным злаковым зернам, содержат ингредиенты, необходимые и достаточные для микробиоты вследствие их устойчивости к перевариванию в верхней части желудочно-кишечного тракта. Это: крахмал и другие полисахариды, такие, как  $\beta$ -глюкан и арабиноксиланы, волокна, минералы, полифенолы, фитостеролы, витамины. Этот комплекс оказывает действие пребиотика: способствует размножению полезных бактерий: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и ингибируют рост патогенов: *Escherichia coli*, *Clostridium*. Пища, обогащенная цельными злаковыми зернами, предотвращает комплекс метаболических болезней: ожирение, дислипидемия, гипергликемия, инсулинорезистентность, диабет, гипертоническая болезнь [31].

Пища современных городских жителей содержит много добавок, улучшающих, по мнению торговцев и некоторых потребителей, вкус, а порой и маскирующих его, следы пестицидов, фталатов (вредных эфиров фталевой кислоты, которые сегодня могут содержаться даже в детских игрушках и сосках), консервантов — антисептиков. Термическая обработка (жарение), вызывает гликирование белков. Всё это ориентировано на вкус человека (часто вопреки его здоровью) и может грубо не соответствовать «вкусу» микроба. Показательна прямая пропорциональность увеличения потребления ультра обрабатываемых продуктов и ожирения детей в США [32]. Международный рынок «дисбактериотических» продуктов не контролируется [28]. Нездоровый образ жизни: алкоголь, малоподвижность, нарушения сна, циркадных ритмов, табак усиливают дисбиоз.

В создавшейся сверхстрой проблеме медицина входит в непримиримое противоречие с политикой и проигрывает схватку, поскольку движущая сила развития капитализма не гуманизм, а жадность. Уже много лет всему миру, очевидно, что современные эпидемии упоминавшихся незаразных болезней создаются транснациональными корпорациями по производству продуктов питания, розничной торговле и фаст-фудам, заполняющими мир прибыльными, ультра-обработанными продуктами, закусками, напитками. Так называемая, ультраобработка создает привлекательные, сверхприятные, дешевые, готовые к использованию пищевые продукты, высокоэнергетичные, плотные, жирные, сладкие или соленые и часто способствующие накоплению жира [33, 34]. Эта пища, появившись и распространившись в богатых странах, прежде всего в «эпицентре прогресса» США, теперь стремительно внедряется в страны со средним и низким уровнем благосостояния (поставки идут из богатых стран). Предыдущие две ссылки относятся к 2013 г., и у читателя может возникнуть вполне понятная и уместная надежда на положительные изменения в мировых тенденциях общественного питания в последние годы. К сожалению, этого нет, например, в статье этого года из

Новой Зеландии содержится не констатация, а лишь пожелание благоприятных изменений [35]. Гиганты пищевой индустрии, монополизируя рынки, и получая от этого сверхдоходы, «вливают» этими сверхдоходами на политиков [36] и даже на медицину [37].

К пищевым вредностям технический прогресс добавляет загрязнение воздуха, воды и почвы нефтепродуктами, тяжелыми металлами и другими непереносимыми участниками поздней цивилизации [8]. Синергичным результатом от совмещения перечисленных и не упомянутых здесь факторов стала распространяющаяся по Земле пандемия ментальных и соматических незаразных болезней [38]. Размах отрицательных тенденций постиндустриального развития лишает современного горожанина возможности сформировать благоприятный для здоровья микробиом. Нарушения микробиома вызывают быстрое увеличение число людей с аллергией на привычные и ценные продукты: клейковину, молоко, яйца. Отступленные инфекции в начале XX века сменилось в конце XX и начале XXI века наступлением аутоиммунных, аллергических, сердечно — сосудистых, метаболических, нейродегенеративных заболеваний, распространением депрессий и других психических расстройств. Этими бедствиями человечество «заплатило» за осознание роли кишечной микробиоты в здоровье и наиболее распространенных болезнях, в том числе нервных и психических, не связываемых раньше с пищеварением. Оказалось, что такие психологические характеристики, как восприятие боли, эмоции, познавательная способность, характер, стрессоустойчивость, социальное поведение, — регулируются кишечной микробиотой [39]. Конечно, существует и обратное действие: через психологические факторы на микробиоту. Выяснение деталей этих взаимосвязей перспективно в качестве мишеней для терапии.

Очень важным обстоятельством опосредованных микробиомом усилий по улучшению здоровья людей, является тот факт, что самые эффективные действия в этом направлении, по сути, и по результату совпадают с действиями, необходимыми для «лечения» Планеты. Создание продуктов растениеводства обеспечивается технологиями с гораздо меньшим выбросом парниковых газов и меньшей деградацией среды, нежели создание продуктов животноводства. Расчеты показывают, что к 2050 г. экспансия вредной, вестернизированной, богатой животными продуктами, диеты потребует увеличения на 80% выброса парниковых газов и увеличения на 740 млн гектаров площади пашни [40]. Это сравнимо с эквивалентным количеством пищи, достаточным для обеспечения здоровой Средиземноморской, вегетарианской и пескетарианской (растения, морепродукты, молоко, яйца) диетой. Кроме того, лес на месте пашни способствует сохранению биоразнообразия со всеми его положительными эффектами, включая психологические.

Кишечник, конечно, не единственная связь человека с биоразнообразием окружающего мира. Положительное воздействие на настроение и здоровье пребывания на «природе» (в лесу, в поле, на реке с естественными берегами) всем известно по личному опыту. Есть и экспериментальные доказательства этого факта. Ежедневное в течение недели пребывание в «зеленом пространстве» в течение 30 мин или больше, снижало в среднем на 7% уровень депрессии и на 9% кровяное давление [41]. Подобных сообщений, убеждающих в уже априорно принимаемом положении, в PubMed много. Однако актуальность проблемы сегодня сместилась и вместо «быть или не быть» на природе проблема может быть обозначена примерно так: как современному жителю Земли бывать на природе и не разрушать её? По моему мнению, такой возможности нет. Можно предложить лишь формальное решение-мечту. Люди должны вести себя так прилично и их должно быть так мало, а природы так много, чтобы она успевала восстанавливаться самостоятельно.

Всегда было понятно, что человек — элемент живой природы. Но в практической медицине это тысячи лет как бы было на втором плане «теорией». Врачи исследовали здоровье и болезни одного вида *Homo sapiens* в значительной мере изолированно, вне связи с другими видами живых существ Земли. Исключением были только взаимодействия с возбудителями инфекций и инвазий. Но и здесь взаимодействия рассматривались упрощенно: болезнетворность, иногда иммуногенность. Сегодня обширными молекулярно-биологическими и клиническими исследованиями по проблеме «микробиом человека» медицина вообще и, в частности, клиническая медицина стала частным, но очень важным разделом экологии. Рассмотрение многих, а может быть, и всех медицинских проблем вне экологических связей сегодня и невежественно и невозможно. Уже приобретенные в этой области знания потенциально весьма перспективны для профилактики и лечения современных неинфекционных пандемий. Однако реализация этого потенциала определяется экологической ситуацией на Земле, которая уже сегодня неблагоприятна и продолжает ухудшаться.

### Литература

(п.п.1; 3—18; 20—41 см. References)

2. Торосян А.Ц. Наследственная, естественная, приобретенная формы патологии и необходимость лечебного образа жизни. *Патогенез*. 2006; 4: 4-11.

19. Соловьева Н.В., Давидович Н.В., Бажукова Т.А., Агафонов В.М. Роль нарушений микрофлоры толстой кишки в механизмах повреждения печени при хронических гепатитах В и С. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 1: 92-8.

## References

1. Bordenstein, S.R.; Kevin T.R. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes». *PLoS Biol.* 2015; Aug; 13(8): e1002226.
2. Torosjan A.Ts. The natural, hereditary, got pathology and necessity of medical way of life. *Patogenez.* 2006; 4: 4-11. (in Russian)
3. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf K.S, Manichanh C et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010; Mar 4; 464(7285): 59-65.
4. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011; 473(7346): 174-80.
5. van de Guchte M, Blottiere HM, Dore J. Humans as holobionts: implications for prevention and therapy. *Microbiome.* 2018; May 1; 6(1): 81.
6. Knights D, Ward TL, McKinlay CE, Miller H, Gonzalez A, McDonald D et al. Rethinking «enterotypes» *Cell Host Microbe.* 2014; 16(4): 433-7.
7. Costea PI, Hildebrand F, Manimozhayan A, Backhed F, Blaser MJ, Bushman FD et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol.* 2018; 3(1): 8-16.
8. Prescott SL, Wegienka G, Logan AC, Katz DL. Dysbiotic drift and biopsychosocial medicine: how the microbiome links personal, public and planetary health. *Biopsychosoc Med.* 2018; May 3; 12:7.
9. Gensollen T., Iyer S.S., Kasper D.L., Blumberg R.S. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 2016; 352: 539-44.
10. Borre Y.E., O'Keefe G.W., Clarke G., Stanton C., Dinan T.G., Cryan J.F. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol. Med.* 2014; 20: 509-18.
11. Logan AC, Jacka FN, Prescott SL Immune-Microbiota Interactions: Dysbiosis as a Global Health Issue. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016; Feb; 16(2): 13.
12. Ownby DR, Johnson CC, Peterson EL. Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. *JAMA.* 2002; Aug 28; 288(8): 963-72.
13. Avershina E, Rudi K. Confusion about the species richness of human gut microbiota. *Benefic Microbes.* 2015; 6(5): 657-9.
14. N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol.* 2004; 558(Pt 1): 263-75.
15. Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 817: 115-33.
16. Foster J.A, Lyte M., Meyer E, Cryan J.F. Gut Microbiota and Brain Function: An Evolving Field in Neuroscience. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016; May; 19(5): pyv114.
17. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord.* 2015; 30: 350-8.
18. Cho I, Blaser M.J. The Human Microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012; Mar 13; 13(4): 260-70.
19. Solov'eva N.V., Davidovich N.V., Bazhukova T.A., Agafonov V.M. The role of gut microflora in mechanisms of liver damage in chronic hepatitis B and C. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2017; 1: 92-8. (In Russian)
20. Armour CR, Nayfach S, Pollard K, Sharpston TJ. A metagenomic meta-analysis reveals functional signatures of health and disease in the human gut microbiome. *bioRxiv.* 2018; 286419. 10.1101/286419.
21. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012; v 486, pages 207-214 (14 June) Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11234>.
22. Segata N. Gut microbiome: westernization and the disappearance of intestinal diversity. *Curr Biol.* 2015; 25(14): R611-3.
23. Gupta V. K, Paul S, Dutta C. Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1162.
24. Sommer M.O. Dantas G. Antibiotics and the resistant microbiome. *Curr. Opin. Microbiol.* 2011; 14: 556-63.
25. Clemente JC, Pehrsson EC, Blaser MJ, Sandhu K, Gao Z, Wang B et al. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci Adv.* 2015; Apr 3; 1(3). pii: e1500183.
26. Cardinale BJ, Duffy JE, Gonzalez A, Hooper DU, Perrings C, Venail P, et al. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature.* 2012; Jun 6; 486(7401): 59-67.
27. He J, Yan C, Holyoak M, Wan X, Ren G, Hou Y et al. Quantifying the effects of climate and anthropogenic change on regional species loss in China. *PLoS One.* 2018; Jul 25; 13(7):e0199735.
28. Prescott SL, Logan AC. Transforming Life: A Broad View of the Developmental Origins of Health and Disease Concept from an Ecological Justice Perspective. *Int J Environ Res Public Health.* 2016; 13(11):E1075.
29. Mancabelli L., Milani C., Lugli G. A., Turrone F., Ferrario C., van Sinderen D., et al. Meta-analysis of the human gut microbiome from urbanized and pre-agricultural populations. *Environ. Microbiol.* 2017; 19: 1379-90.
30. Statovci D, Aguilera M, MacSharry J, Melgar S The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. *Front Immunol.* 2017; Jul 28; 8: 838.
31. Gong L, Cao W, Chi H, Wang J, Zhang H, Liu J. et al. Whole cereal grains and potential health effects: Involvement of the gut microbiota. *Food Res Int.* 2018; Jan; 103: 84-102.
32. Skinner AC, Ravanbakht SN, Skelton JA, Perrin EM, Armstrong SC. Prevalence of obesity and severe obesity in US children, 1999-2016. *Pediatrics.* 2018.
33. Moodie R, Stuckler D, Monteiro C, Sheron N, Neal B, Thamarangsi T. et al. Profits and pandemics: prevention of harmful effects of tobacco, alcohol, and ultra-processed food and drink industries. *Lancet.* 2013; 381(9867): 670-9.
34. Monteiro CA, Moubarac JC, Cannon G, Ng SW, Popkin B Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. *Obes Rev.* 2013; Nov; 14 Suppl 2:21-8.
35. Delany L, Signal L, Thomson G International trade and investment law: a new framework for public health and the common good. *BMC Public Health.* 2018; May 8; 18(1): 602. doi: 10.1186/s12889-018-5486-6.
36. Clapp J, Scrinis G. Big food, nutritionism, and corporate power. *Globalizations.* 2017; 14: 578-95.
37. Leon KS, Ken I. Food fraud and the partnership for a 'healthier' America: a case study in state-corporate crime. *Crit Crim.* 2017.
38. Logan AC. Dysbiotic drift: mental health, environmental grey space, and microbiota. *J Physiol Anthropol.* 2015; 34: 23.
39. Shan Liang, Xiaoli Wu, Feng Jin Gut-Brain Psychology: Rethinking Psychology From the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front Integr Neurosci.* 2018; 12: 33.
40. Tilman D, Clark M. Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature.* 2014; 515(7528): 518-22.
41. Shanahan DF, Bush R, Gaston KJ, Lin BB, Dean J, Barber E et al. Health Benefits from Nature Experiences Depend on Dose. *Sci Rep.* 2016; Jun 23; 6: 28551

## Сведения об авторах:

Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО, лауреат Государственной премии СССР.



Кандалова О.В.<sup>1</sup>, Елистратова И.В.<sup>2,3</sup>, Иванченко О.Б.<sup>4</sup>, Гречко А.В.<sup>5</sup>, Морозов С.Г.<sup>3</sup>

## Микробиом кожи при atopическом дерматите у взрослых

<sup>1</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, 127473, г. Москва, Россия, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

<sup>2</sup> ФКУЗ «Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии РФ», 143915, Московская область, Балашиха, Россия, микрорайон Никольско-Архангельский, Вишняковское шоссе, вл. 101

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 115125, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (СПбПУ), Высшая школа биотехнологии и пищевых технологий, 194021, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Новороссийская, д. 50

<sup>5</sup> ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» Московская область, Россия, Солнечногорский район, деревня Лыткино, д. 777

Данный мини-обзор посвящен изучению роли микробиома кожи и, в частности, роли стафилококков в обострении atopического дерматита у взрослых людей. Были проанализированы предпосылки бактериальной контаминации кожи и роль факторов внешней среды. Представлены данные по влиянию *S. aureus* на разные звенья природного и адаптивного иммунитета за счет синтеза специфических регуляторных белков, протеолитических ферментов и гидролаз. Обозначены некоторые направления борьбы с бактериальной инфекцией для предупреждения обострения atopического дерматита у взрослых.

**Ключевые слова:** atopический дерматит, микробиом кожи, *S. aureus*.

**Для цитирования:** Кандалова О.В., Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Гречко А.В., Морозов С.Г. Микробиом кожи при atopическом дерматите у взрослых. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 209—214.

**DOI:**

**Для корреспонденции:** Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед наук, проф., член-корр. РАН, e-mail: biopharm@list.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 25.10.2018

Kandalova O.V.<sup>1</sup>, Elistratova I.V.<sup>2,3</sup>, Ivanchenko O.B.<sup>4</sup>, Grechko A.V.<sup>5</sup>, Morozov S.G.<sup>3</sup>

## Skin microbiome in adult atopic dermatitis

<sup>1</sup> A.I. Evdokimov Moscow State Medical and Dental University, 127473, Moscow, 20 Delegatskaya St.

<sup>2</sup> The Central military hospital of the National Guard of Russian Federation, Moscow region; Balashikha, Nikolo-Arkhangelskoe, 101 Vishnyakovskoye Sh.

<sup>3</sup> The Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow

<sup>4</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Graduate school of Biotechnology and Food Science, 194021, St-Petersburg, 50 Novorossiyskaya St.

<sup>5</sup> Federal scientific and clinical center of resuscitation and rehabilitation, Moscow region, Solnechnogorsk district, village Lytkino, d. 777

In this mini review we have analyzed the role of skin microbiome in the atopic dermatitis relapse in adults, in particular, a role of *S. aureus* in this process. The background for the skin bacterial contamination under the influence of environmental factors has been analyzed. We reviewed some *S. aureus* effects on the components of innate and adaptive immunity due to the secretion of specific regulatory proteins, a number of proteolytic enzymes, and some hydrolases. There were indicated some ways to eliminate the bacterial infection to prevent the atopic dermatitis relapse in adults

**Keywords:** atopic dermatitis, skin microbiome, *S. aureus*.

**For citation:** Kandalova O.V., Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Grechko A.V., Morozov S.G. Skin microbiome in adult atopic dermatitis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 209—214. (in Russian).

**DOI:**

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

**Acknowledgment.** This study has no a sponsorship.

**For correspondence:** Prof. Morozov S.G., e-mail: biopharm@list.ru

**Received** 25.10.2018

## Введение

Атопический дерматит (АтД) — это хроническое воспалительное заболевание кожи, являющееся большой социальной и медицинской проблемой для индустриальных стран: им страдают 15—30% детей и 2—40% взрослых (в зависимости от особенностей диагностики АтД у взрослых) [1—3]. В патогенезе АтД играет роль сочетание генетических нарушений, негативных факторов окружающей среды, дефектов барьерной функции кожи, патологии иммунной системы и контаминации кожи патогенными микроорганизмами (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Candida spp.*, *Malassezia spp.* и т.д.), выделяющими широкий спектр ферментов, включая протеазы [4].

Непосредственный контакт с внешней средой (пыль, клещи, микроскопические плесневые грибы, химические вещества, аллергены) часто приводит к повреждению эпидермиса и делает его доступным для колонизации микробами. Аллергены, плесневые грибы, клещи домашней пыли секретируют протеазы, активирующие рецепторы PAR-2 (Protease Activated Receptor-2) нервных волокон и кератиноцитов, что вызывает секрецию интерлейкинов (IL-6, IL-8) и других цитокинов кератиноцитами, что приводит к нарушению межклеточных контактов корнеоцитов. Плотные межклеточные контакты также повреждаются аллергеном DerF1 клещей. Аллергены могут активировать рецепторы PRRs (Pattern Recognition Receptors) клеток иммунной системы кожи, что является «сигналом тревоги» и приводит к активации аллергического ответа [5].

Один квадратный сантиметр кожи может содержать до 1 млн микроорганизмов; в состав микробиоценоза (микробиоты) кожи входят микроскопические плесневые грибы, клещи, вирусы, бактерии и т.д. [6]. Сообщество бактерий кожи (микробиом) существует в виде биопленок, внедренных в экстраклеточный матрикс, с хорошо развитой системой коммуникации, что позволяет бактериям быть устойчивыми к эндогенным антимикробным пептидам и другим факторам антимикробной защиты [7]. Бактерии, постоянно колонизирующие кожу здорового человека, вносят положительный вклад в поддержание локального и системного иммунитета, тогда как изменение в составе микроорганизмов может приводить к развитию заболеваний.

В обзоре обсуждается роль микробной контаминации кожи в развитии и обострении атопического дерматита у взрослых людей.

*Роль стафилококков в развитии атопического дерматита.* При анализе публикаций по составу микробиома кожи становится очевидно, что в силу разных причин в настоящее время нет возможности точно установить абсолютно все виды бактерий, ко-

лонизирующих кожу, хотя таких работ много. Анализ микробиома в смывах кожи локтевой ямки, межлопаточной области и области за ушной раковиной людей выявил существенное различие между больными АтД и здоровыми лицами. Из выделенных 56 видов бактерий наиболее часто обнаруживают пять: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pseudogenitalium* и *Lawsonella clevelandensis*, реже: *Staphylococcus hominis*, *Salmonella infantis*, *Fascioides magna*, *Moraxella osloensis*, *Micrococcus luteus*. В 77% случаев в коже больных АтД обнаруживают *Cryptococcus albidus var. albidus*, который у здоровых людей встречается только в 37% случаев. Состав микроорганизмов может отражать тяжесть течения АтД. Бактерии синтезируют специфический спектр протеаз, влияющих на барьерную функцию кожи [8].

В состав микробиома кожи здоровых людей обычно входит *S. epidermidis*, а в поврежденных областях кожи при АтД доминирует *S. aureus*: он обнаружен у 90% больных АтД, тогда как у здоровых — только в 20%. У 44% больных АтД *S. aureus* обнаружен на участках здоровой кожи, примыкающих к местам поражений. При этом у большинства больных АтД *S. aureus* обнаружен также в передней части носовой полости [9].

Резидентные бактерии кожи модулируют иммунный ответ, как природный, так и адаптивный. *S. epidermidis* активирует Т-лимфоциты, синтезирующие IL-17A и IFN-γ (интерферон-гамма) [10]. Присутствие патогенных микроорганизмов поддерживает хроническое воспаление в коже. Интенсивное лечение АтД приводит к реколонизации и выраженному разнообразию микробного сообщества [11].

У больных АтД *S. aureus* чаще обнаруживают гены, кодирующие патогенные белки. У 22% больных АтД выделены стафилококки, мутантные по дополнительному гену регулятору *agr* (*accessory gene regulator*), резистентные к метициллину. У 93% больных АтД стафилококки экспрессируют ген *icaD* и в 12,5% — ген *aar*, имеющие отношение к формированию биопленок и к развитию воспалительного процесса и чувство зуда [12, 13]. У больных АтД *S. aureus* часто экспрессируют гены *ukE*, *lukD*, *splA*, *splB*, *ssl8*, *sasG*, тогда как ген *CC30* чаще выявлялся у больных атопией без поражения кожи [14].

Контаминация *S. aureus* рогового слоя кожи больных АтД приводит к снижению экспрессии кератина-10 и маркеров терминальной дифференцировки кератиноцитов — кератинов-1, -10, лорикрина и филагрина; но уровень экспрессии кератинов-5 и -14 в базальном слое кожи не изменяется [15]. Снижение уровня экспрессии филагрина способствует колонизации *S. aureus* в эпидермисе [16]. Даже в неповреж-

денных участках кожи больных АтД выявлены нарушения терминальной дифференцировки кератиноцитов и активация клеток локальной иммунной системы кожи [17]. Уровень кератинов-4, -10, десмоглеина-1 и десмоколина-1 снижается под влиянием IL-4 и IL-13 при АтД [18].

Патогенные свойства стафилококков определяют секретируемые ими белки. Стафилококки синтезируют 4 гемолизина, лейкоцидины, белок А, 8 термостабильных энтеротоксинов, липазу (триглицерид эстеразу), тейхоевые кислоты (активаторы системы комплемента и калликреина), гиалуронидазу, лецитиназу, плазмокоагулазу, фибринолизин, ДНКазу, каталазу,  $\beta$ -лактамазу, белок, связывающий пенициллин и т.д. [19]. Секретируемая стафилококками липотейхоевая кислота ингибирует дифференцировку кератиноцитов через р63-зависимый сигнальный путь. Коагулаза стафилококков играет роль в развитии экзематозной реакции. Негативные по коагулазе *S. epidermidis* и *S. hominis* (характерны для здоровых людей и редко выделяются от больных АтД) также синтезируют антимикробные пептиды против *S. aureus* [20]. Кроме того, *S. aureus* секретируют везикулы, содержащие более 60 активных белков, в том числе  $\gamma$ - и  $\delta$ -гемолизины, лейкоцидин D и др., вызывающие апоптоз клеток человека [21]. Комбинированный эффект  $\gamma$ -гемолизина и лейкоцидина стафилококков обуславливает образование NETs (neutrophil extracellular trap) нейтрофилами, которые способствуют выживанию сформированных стафилококками биопленок [22].

Повышенная секреция  $\alpha$ -гемолизина ( $\alpha$ -токсина) *S. aureus* в виде экстраклеточных везикул вызывает гибель кератиноцитов и некроз кожи, что коррелирует с тяжестью течения АтД. Проникновение  $\alpha$ -гемолизина в глубокие слои дермы облегчает секретируемая *S. aureus* металлопротеиназа MMP-10 с порогформирующей активностью;  $\alpha$ -гемолизин также способствует встраиванию вируса простого герпеса 1 в кератиноциты, что способствует микст-инфекции. Сублитическая концентрация  $\alpha$ -гемолизина у больных АтД вызывает пролиферацию CD4<sup>+</sup>T клеток и повышенный синтез IFN- $\gamma$ , в сигнальный путь входит фактор транскрипции t-bet. Стафилококковый  $\alpha$ -гемолизин также активирует сигнальный путь Notch, который приводит к нарушению активности периваскулярных клеток и эндотелия, в нём задействован рецептор ADAM10 (A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 10). У больных АтД гибель клеток под действием  $\alpha$ -гемолизина выше, чем у здоровых. Дифференцированные кератиноциты в норме устойчивы к индукции апоптоза, однако, под действием Th2 цитокинов повышается апоптогенный потенциал  $\alpha$ -гемолизина в отношении кератиноцитов; в сигнальный путь входит STAT6 [23].

Сублитическая концентрация стафилококкового  $\alpha$ -гемолизина в коже больных АтД вызывает повышение синтеза хемокинов MDC/CCL22 и IP-10/CXCL10 макрофагами. Супернатант от этих макрофагов вызывает миграцию CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов в кожу за счет активации рецепторов CXCR3 хемокинами CXCL10 [24].

Стафилококковый  $\beta$ -гемолизин — это сфингомиелиназа, катализирующая гидролиз сфингомиелина с образованием церамида. Изменение состава сфинголипидов в роговом слое кожи характерно для инфицирования *S. aureus*. Нормальное распределение комплексных церамидов кожи препятствует формированию биопленок стафилококками, но при изменении состава церамидов под действием бактериальной сфингомиелиназы стафилококки получают возможность внедриться в глубокие слои дермы и сформировать биопленки [25].

Клетки природного иммунитета IL2C (group 2 Innate Lymphoid Cells) участвуют в поддержании противоинфекционного иммунитета, аллергии, заживлении ран. Часть из них экспрессирует молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса, что позволяет им презентировать антигенные пептиды T-лимфоцитам и амплифицировать адаптивный иммунный ответ. В коже больных АтД под действием *S. aureus* цитокин TSLP (thymic stromal lymphopoietin) повышают экспрессию рецепторов CD1a на IL2C клетках, что позволяет им презентировать полноценные белковые антигены T-клеткам [26].

Суперантигены стафилококков — это семейство, состоящее как минимум из 26 секретируемых протеинов с уникальной способностью активировать вариабельную  $\beta$ -цепь антиген-специфического рецептора T-лимфоцитов (T Cell Recceptor). В эту группу, в частности, входят  $\beta$ -энтеротоксин и энтеротоксиноподобный токсин X, который способен связывать нейтрофилы и влиять на IgG-зависимый фагоцитоз [27]. Кроме того, суперантигеном является стафилококковый белок А — это олигомерный секретируемый протеин с двумя сайтами связывания иммуноглобулинов (Ig), один из которых связывает Fc домен Ig, а второй — последовательность на Fab домене Ig, кодируемую VIII-родственными генами. Сайт связывания Fab имеет отношение к активации антиген-специфического рецептора B-лимфоцитов — BCR (B Cell Recceptor). Стафилококковый суперантиген обуславливает иммунные реакции кожи при АтД [28].

В коже больных АтД после стимуляции стафилококковым суперантигеном снижается соотношение CCR6<sup>+</sup> и CCR6<sup>-</sup> субпопуляций регуляторных CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T-клеток, что приводит к повышению синтеза IL-5 и уменьшению синтеза IL-10 по сравнению со здоровыми донорами; у здоровых лю-

дей суперантиген повышает это соотношение. Хемо-таксис регуляторных Т-клеток в кожу больных АтД повышен после стимуляции стафилококковым супер-антигеном, что усиливает воспаление в коже [5].

В коже *S. aureus* активирует IL-17-продуцирующие  $\gamma\delta$ CD4<sup>+</sup>Т-клетки за счет сигнального пути IL-36R/MyD88 [29]. Интерлейкины IL-19, IL-20, IL-24 ассоциированы с воспалением в коже при АтД, они поддерживают жизнедеятельность *S. aureus* за счет снижения активности IL-1 $\beta$  и IL-17A. При этом рецептор IL-17RA способствует защите кожи от аллергической реакции и воспаления [30].

Колонизация кожи *S. aureus* приводит к активации эозинофилов через рецепторы PAF (Platelet-Activating Factor) и CD48, последний также участвует в стимуляции тучных клеток. Одновременно эозинофилы продуцируют супероксидные радикалы, секретируют фактор роста эндотелия сосудов VEGF, фактор некроза опухолей TNF- $\alpha$ , IL-9, IL-1 $\beta$ , IL-17A, ростовой фактор тромбоцитов PDGF- $\beta$ , основной фактор роста фибробластов FGF, а также экспрессируют рецепторы TNF-R, IL-2R [31]. Гибель эозинофилов может быть вызвана воздействием литической концентрации  $\alpha$ -гемолизина стафилококков [32].

*Противомикробные факторы защиты при атопическом дерматите.* В настоящее время рассматривается ведущая роль кератиноцитов в регулировании клеток иммунной системы кожи в защите от *S. aureus*. Это происходит за счет синтеза цитокинов, экспрессии рецепторов и активации сигнальных путей клеток в ответ на стимуляцию патогенами, лигандами TLR (Toll Like Receptors) или цитокинами [18].

Кератиноциты, клетки потовых желез, клетки иммунной системы кожи секретируют антимикробные пептиды (AMP), обладающие защитной функцией, они работают как эндогенные антибиотики и могут действовать статически на бактерии, вирусы, грибы. AMP, в частности, дефенсины и кателицидин, обладают также иммуномодулирующей активностью. При АтД функциональная активность AMP снижена, что позволяет бактериальным белкам инициировать развитие аллергической реакции. AMP, синтезируемые резидентными бактериями кожи (*S. epidermidis*, *S. hominis* и т.д.), являются специфичными для определенных линий бактерий, выборочно убивают *S. aureus*, работают синергично с эндогенными AMP человека (LL-37, RNase7, HBD-2). У больных АтД активность нормальной резидентной микрофлоры подавлена, а концентрация в коже AMP разного происхождения снижена [21].

Антимикробный пептид человека LL-37, кроме собственно антимикробных функций, ингибирует продукцию цитокинов TSLP, хемокинов

CCL5/RANTES, IP-10/CXCL10 и IL-18/CXCL8, которые индуцируются в ответ на dsРНК бактерий. LL-37 снижает уровни хемокинов CXCL10 и CCL5, но повышает уровень CXCL8 в ответ на TNF- $\alpha$  или IFN- $\gamma$ . Модуляция провоспалительного ответа кератиноцитов LL-37 в ответ на dsРНК предполагает новую роль LL-37 в воспалении кожи, в том числе супрессирует TSLP-ассоциированные проявления при АтД [33]. Непатогенные бактерии, колонизирующие кожу человека, ослабляют проявления АтД за счет индукции дендритных клеток к синтезу IL-10 и активации регуляторных Т-клеток.

Мутантные штаммы стафилококков могут персистировать в кератиноцитах, вызывать аутофагию, которая способствует деградации инфламмасом, но при этом избегать активации каспазы-3 и активации инфламмасом [34].

Фагоцитарная активность нейтрофилов вносит существенный вклад в антибактериальную защиту кожи. В ответ на взаимодействие патогенов различного происхождения с рецепторами TLR происходит активация клеток природного иммунитета. У больных АтД наблюдается сниженная фагоцитарная активность в отношении бактерий и снижен их внутриклеточный киллинг [35].

Учитывая установленную взаимосвязь между микробиотой кишечника и микробиотой кожи и их роль в патогенезе АтД [36], в настоящее время активно пропагандируется приём пребиотиков, пробиотиков и синбиотиков в комплексном лечении АтД. Это приводит к улучшению клинической картины, повышению качества жизни пациентов [37]. В клеточном инфильтрате при АтД преобладают Т-лимфоциты, которые способны индуцировать апоптоз кератиноцитов. *In vitro* показано, что пробиотики *Bifidobacterium infantis* защищают клетки HaCaT от апоптоза, индуцированного активированными фитогемаггүтином Т-лимфоцитами, секретирующими IFN- $\gamma$  и лиганд апоптоза CD95L. Синтезированный Т-лимфоцитами IFN- $\gamma$  вызывает апоптоз кератиноцитов. Экстракт бифидобактерий препятствует пролиферации Т-лимфоцитов, индуцированной анти-CD3/CD28 антителами или митогенами. *In vivo* положительный эффект бифидобактерий достигается при их колонизации в желудочно-кишечном тракте [38].

## Заключение

Атопический дерматит характеризуется многочисленными нарушениями со стороны иммунной системы, изменениями в барьерной функции кожи, контакцией кожи патогенными бактериями (*S. aureus* и др.), экспрессирующими измененный геном, сниже-

нием уровня защитных белков в коже и т.д. В обзоре анализируется роль стафилококков в инициации и координации этих нарушений. Прежде всего, надо отметить, что колонизация кожи стафилококками не происходит при нормальном состоянии защитных механизмов кожи, то есть первично имеются предпосылки для формирования биопленок *S. aureus*. Надо подчеркнуть тот факт, что стафилококки продуцируют сфингомелиназу, основной задачей которой является изменение состава комплексных сфинголипидов кожи, что оказывает влияние на физические свойства кожи. Колонизации *S. aureus* также способствуют факторы окружающей среды: протеолитическая активность присуща аллергенам, клещам домашней пыли и т.д., что обуславливает активацию рецепторов PRR и развитию локальной воспалительной реакции, на фоне которой внедрение стафилококков в эпидермис значительно облегчается. Таким образом, предпосылкой обострения АТД, сопряженного с бактериальной контаминацией кожи, могут быть негативные изменения окружающей среды.

Успешная колонизации *S. aureus* в коже взрослого человека приведет к обострению АТД только в том случае, если имеются и другие предпосылки, в том числе нарушения природного и адаптивного иммунитета. Активность нейтрофилов и других фагоцитов на первом этапе контакта со стафилококками имеет определяющее значение, так как у нейтрофилов есть огромный арсенал возможностей для борьбы с инфекцией — это, прежде всего, «кислородный взрыв», сопровождаемый генерацией супероксидного аниона, затем направленный выброс других реактивных метаболитов кислорода и азота, далее происходит секреция протеолитических ферментов из гранул нейтрофилов и т.д. В подавляющем большинстве случаев это заканчивается полной элиминацией патогена. Однако у больных АТД имеются многочисленный варианты поломки природного иммунитета, в том числе часто снижена функциональная активность фагоцитов. В этом случае у человека начинают активно функционировать все звенья адаптивного иммунитета. На это стафилококки уже вполне профессионально отвечают синтезом многочисленных белков, нарушающих взаимодействие клеток иммунной системы. Наиболее значимый ущерб наносят суперантигены, которых у стафилококков на данный момент открыто не менее 26; они не только активируют Т-лимфоциты через TCR в отсутствие ко-стимуляторных сигналов (что вызывает активационно-индуцированный апоптоз), но и стимулируют поликлональную активацию В-клеток, что, естественно, препятствует синтезу специфических антител. Кроме того, стафилококки секретируют многочисленные протеазы, липазы, эстеразы и другие ферменты, прямо или опосредованно повреж-

дающие другие звенья адаптивного иммунитета. Экспрессия ряда генов и синтез специфических белков позволяет клеткам *S. aureus* быть резистентными к эндогенным антимикробным пептидам человека, к антибиотикам и т.д. Таким образом, на этапе сформированной биопленки, когда произошло внедрение *S. aureus* в глубокие слои дермы, вызвав активацию локальной иммунной системы и хемотаксис Т-клеток, продуцирующих провоспалительные и другие цитокины, обострение АТД уже невозможно избежать. Тем не менее, профилактика контаминации кожи различными патогенами, нормализация микробиоты кишечника, борьба со стрессом и поддержание нормального метаболизма позволяют открывать новые пути борьбы с обострениями АТД.

## References

1. Megna M., Patruno C., Balato A., Napolitano M., Balato N. Adult atopic dermatitis: less certainty, more challenges. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2017; 27: 276-7.
2. Silvestre-Salvador J., Romero-Perez D., Encabo-Duran B. Atopic dermatitis in adults: a diagnostic challenge. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2017; 27: 78-88.
3. Weidinger S., Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet.* 2016; 387: 1109-22.
4. Malik K., Heitmiller K., Czarnowicki T. An update on the pathophysiology of atopic dermatitis. *Dermatol. Clin.* 2017; 35(3): 317-26.
5. Knaysi G., Smith A., Wilson J., Wisniewski J. The skin as a route of allergen exposure: Part II. Allergens and role of the microbiome and environmental exposures. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2017; 17(1): 7-9.
6. Weyrich L., Dixit S., Farrer A., Cooper A., Cooper A. The skin microbiome: Associations between altered microbial communities and disease. *Australas J. Dermatol.* 2015; 56(4): 268-74.
7. Kong H., Segre J. The molecular revolution in cutaneous biology: Investigating the skin microbiome. *J. Invest. Dermatol.* 2017; 137(5): e119-e122.
8. Francuzik W., Franke K., Schumann R., Heine G., Worm M. Propionibacterium acnes abundance correlates inversely with Staphylococcus aureus: Data from atopic dermatitis skin microbiome. *Acta Derm. Venereol.* 2018; 98(5): 490-5.
9. Wrobel J., Tomczak H., Jenerowicz D., Czarnicka-Operacz M. Skin and nasal vestibule colonization by Staphylococcus aureus and its susceptibility to drugs in atopic dermatitis patients. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2018; 25(2): 334-7.
10. Nakamizo S., Egawa G., Honda T., Nakajima S., Belkaid Y., Kabashima K. Commensal bacteria and cutaneous immunity. *Semin. Immunopathol.* 2015; 37(1): 73-80.
11. Salava A., Lauerma A. Role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Clin. Transl. Allergy.* 2014; 4: 33-8.
12. Allen H. Vaze N., Choi C., Hailu T., Tulbert B., Cusack C., Joshi S. The presence and impact of biofilm producing staphylococci in atopic dermatitis. *JAMA Dermatol.* 2014; 150(3): 260-5.
13. Gonzalez T., Biagini Myers J., Herr A., Khurana Hershey G. Staphylococcal biofilms in atopic dermatitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2017; 17(12): 81-100.

14. Rojo A., Aguinaga A., Monecke S., Yuste J., Gastaminza G., Espana A. Staphylococcus aureus genomic pattern and atopic dermatitis: May factors other than superantigens be involved? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 33(4): 651-8.
15. Son E., Kim H., Park T., Shin K., Bae I., Lim K. et al. Staphylococcus aureus inhibits terminal differentiation of normal human keratinocytes by stimulating interleukin-6 secretion. *J. Dermatol. Sci.* 2014; 74(1): 64-71.
16. van Drongelen V., Haisma E., Out-Luiting J., Nibbering P., El Ghalbzouri A. Reduced filaggrin expression is accompanied by increased Staphylococcus aureus colonization of epidermal skin models. *Clin. Exp. Allergy.* 2014; 44(12): 1515-24.
17. Bitschar K., Wolz C., Krismer B., Peschel A., Schitteck B. Keratinocytes as sensors and central players in the immune defense against Staphylococcus aureus in the skin. *J. Dermatol. Sci.* 2017; 87(3): 215-20.
18. Totsuka A., Omori-Miyake M., Kawashima M., Yagi J., Tsunemi Y. Expression of keratin 1, keratin 10, desmoglein 1 and desmocollin 1 in the epidermis: Possible downregulation by interleukin-4 and interleukin-13 in atopic dermatitis. *Eur. J. Dermatol.* 2017; 27(3): 247-53.
19. Geoghegan J., Irvine A., Foster T. Staphylococcus aureus and atopic dermatitis: A complex and evolving relationship. *Trends Microbiol.* 2018; 26(6): 484-97.
20. Nakatsuji T., Chen T., Narala S., Chun K., Two A., Yun T. et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against Staphylococcus aureus and are deficient in atopic dermatitis. *Sci. Transl. Med.* 2017; 9(378): 45-67.
21. Jeon H., Oh M., Jun S., Kim S., Choi C., Kwon H. et al. Variation among Staphylococcus aureus membrane vesicle proteomes affects cytotoxicity of host cells. *Microb. Pathog.* 2016; 93: 185-93.
22. Bhattacharya M., Berends E., Chan R., Schwab E., Roy S., Sen C. et al. Staphylococcus aureus biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018; 115(28): 7416-21.
23. Hong S., Choi E., Min T., Kim J., Kim M., Jeon S. et al. An important role of  $\alpha$ -hemolysin in extracellular vesicles on the development of atopic dermatitis induced by Staphylococcus aureus. *PLoS One.* 2014; 9(7): e100499.
24. Kasraie S., Niebuhr M., Kopfnagel V., Dittrich-Breiholz O., Kracht M., Werfel T. Macrophages from patients with atopic dermatitis show a reduced CXCL10 expression in response to staphylococcal  $\alpha$ -toxin. *Allergy.* 2012; 67(1): 41-9.
25. Cleary J., Lipsky Z., Kim M., Marques C., German G. Heterogeneous ceramide distributions alter spatially resolved growth of Staphylococcus aureus on human stratum corneum. *J. R. Soc. Interface.* 2018; 15(141): 185-94.
26. Hardman C., Chen Y., Salimi M., Jarrett R., Johnson D., Jarvinen V. et al. CD1a presentation of endogenous antigens by group 2 innate lymphoid cells. *Sci. Immunol.* 2017; 2(18): 31-60.
27. Tuffs S., James D., Bestebroer J., Richards A., Goncheva M., O'Shea M. et al. The Staphylococcus aureus superantigen SEIX is a bifunctional toxin that inhibits neutrophil function. *PLoS Pathog.* 2017; 13(9): e1006461.
28. Ulloa-Morales A., Goodyear C., Silverman G. Essential domain-dependent roles within soluble IgG for in vivo superantigen properties of staphylococcal protein A: Resolving the B-cell superantigen paradox. *Front. Immunol.* 2018; 9(2011): 36-48.
29. Liu H., Archer N., Dillen C., Wang Y., Ashbaugh A., Ortines R. et al. Staphylococcus aureus epicutaneous exposure drives skin inflammation via IL-36-mediated T cell responses. *Cell. Host Microbe.* 2017; 22(5): 653-66.
30. Floudas A., Saunders S., Moran T., Schwartz C., Hams E., Fitzgerald D. et al. IL-17 Receptor A maintains and protects the skin barrier to prevent allergic skin inflammation. *J. Immunol.* 2017; 199(2): 707-17.
31. Hosoki K., Nakamura A., Nagao M., Hiraguchi Y., Tanida H., Tokuda R. et al. Staphylococcus aureus directly activates eosinophils via platelet-activating factor receptor. *J. Leukoc. Biol.* 2012; 92(2): 333-41.
32. Prince L., Graham K., Connolly J., Anwar S., Ridley R., Sabroe I. et al. Staphylococcus aureus induces eosinophil cell death mediated by  $\alpha$ -hemolysin. *PLoS One.* 2012; 7(2): e31506.
33. Brunner P., Emerson R., Tipton C., Garcet S., Khatri S., Coats I. et al. Nonlesional atopic dermatitis skin shares similar T-cell clones with lesional tissues. *Allergy.* 2017; 72(12): 2017-25.
34. Soong G., Paulino F., Wachtel S., Parker D., Wickersham M., Zhang D. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus adaptation to human keratinocytes. *MBio.* 2015; 6(2): e00289.
35. Fyhrquist N., Salava A., Auvinen P., Lauerma A. Skin Biomes. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2016; 16(5): 40-56.
36. Salem I., Ramser A., Isham N., Ghannoum M. The gut microbiome as a major regulator of the gut skin axis. *Front. Microbiol.* 2018; 9(1459): 56-70.
37. Notay M., Foolad N., Vaughn A., Sivamani R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics for the treatment and prevention of adult dermatological diseases. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2017; 18(6): 721-32.
38. Dylus E., Buda B., Gorska-Fraczek S., Brzozowska E., Gamian A. Surface proteins of bacteria of the genus Bifidobacterium. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online).* 2013; 67: 402-12.

### Сведения об авторах:

Кандалова Ольга Вадимовна, канд. биол. наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный медицинский стоматологический университет им. А. И. Евдокимова» Минздрава России, каф. кожных и венерических болезней, e-mail: olga\_kandalova@inbox.ru;

Елистратова Ирина Владимировна, канд. мед. наук, врач дерматовенеролог, ФКУЗ «Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии РФ»;

Иванченко Ольга Борисовна, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Высшая школа биотехнологии и пищевых технологий, канд. биол. наук, доцент, e-mail: obivanchenko@yandex.ru;

Гречко Андрей Вячеславович, доктор мед. наук, проф., директор ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»;

Морозов Сергей Георгиевич, член-корр/ РАН, директор ФГБНУ НИИОПП, e-mail: sergey\_moroz@list.ru

© Хугаева В.К., Ардасенов А.В., 2018  
УДК 616-092

Хугаева В.К., Ардасенов А.В.

## Сравнительный анализ возможностей и недостатков методов биомикроскопии и лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) при исследовании микроциркуляторного русла кожи

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

В статье анализируются преимущества и недостатки методов лазерной доплеровской флоуметрии и биомикроскопии при изучении микроциркуляции в кровеносных и лимфатических сосудах кожи и др. органов. На конкретных примерах показаны широкие недостаточно используемые возможности биомикроскопии.

**Ключевые слова:** микроциркуляция; кожа; методы; биомикроскопия; лазерная доплеровская флоуметрия.

**Для цитирования:** Хугаева В.К., Ардасенов А.В. Сравнительный анализ возможностей и недостатков методов биомикроскопии и лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) при исследовании микроциркуляторного русла кожи. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 215—218.

DOI:

**Для корреспонденции:** Хугаева Валентина Каргоевна, e-mail: vhugaeva@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.08.2018

Khugaeva V.K., Ardasenov A.V.

## Comparing the strengths and shortcomings of biomicroscopy and laser Doppler flowmetry (LDF) in the study of skin microcirculation

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

The article analyzed merits and demerits of laser Doppler flowmetry and biomicroscopy in studying microcirculation in blood and lymphatic microvessels of the skin and other organs. Specific examples show wide, underutilized potentialities of biomicroscopy.

**Keywords:** microcirculation; skin; methods; biomicroscopy; laser Doppler flowmetry

**For citation:** Khugaeva V.K., Ardasenov A.V. [Comparative analysis of opportunities and disadvantages of biomicroscopic method and laser Doppler flowmetry (LDF) in the study of the skin micro-circulatory body]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2018; 62(4): 215—218. (In Russian).

DOI:

**For correspondence:** Khugaeva Valentina Kargoevna, e-mail: vhugaeva@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

Received 25.08.2018

### Введение

Методы прижизненного изучения микроциркуляторного (МЦ) русла кожи можно разделить на 2 группы: прямые методы, осуществляемые с помощью биомикроскопии и косвенные, не позволяющие непосредственно наблюдать за микрососудами (МС).

В первом случае возможна регистрация структуры и функции не только различных параметров группы микрососудов в динамике (внутрисосудистое давление, изменение диаметра, скорость кровотока, реологические свойства крови и лимфы, кровенаполнение, плазматизация, моторика лимфатических микрососу-

дов и др.) с помощью фото-, кино-, видеосъемки, а также специальной аппаратуры, но и изменения, возникающие при этом в окружающих их тканях, например, состояние тучных клеток, дегрануляция которых резко изменяет микрогемодинамику, сосудистую проницаемость. Прямые методы позволяют характеризовать не только морфометрические изменения микрососудов, эндотелия и гладкомышечных клеток стенки, но и регистрировать их электрическую активность, определять содержание биологически активных веществ в клетках периваскулярного пространства, паренхимы различных органов.

Однако, прямые методы исследования МЦ сложны и трудоемки, требуют создания специальной аппаратуры, которую проектируют сами исследователи вследствие отсутствия серийных заводских образцов.

Косвенные методы изучения МЦ кожи и других органов преимущественно характеризуют суммарное среднее состояние МС в определенном объеме ткани. Главное достоинство их заключается в том, что они являются неинвазивными методами и это преимущество позволяет широко использовать их в клинической практике. Большим недостатком косвенных методов изучения МЦ кожи и других органов является сложность интерпретации полученных результатов при изучении механизмов, лежащих в основе патологического процесса, профилактики и терапии. Например, использование любого косвенного метода для оценки состояния кровотока — лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), ультразвуковой (УЗДГ), полярографии, реографии не позволяет при обнаружении увеличения скорости кровотока, показателя микроциркуляции (ПМЦ) и т.д. судить о состоянии МЦ в исследуемой области, так как возможно шунтирование кровотока, минуя капиллярное русло, что влечет за собой нарушение транскапиллярного обмена и трофического обеспечения тканей.

За последние десятилетия резко возросло количество работ, посвященных изучению МЦ в различных органах и тканях, выполненных с помощью метода ЛДФ. По ключевым словам «кожа» и «микроциркуляция» за последние 5 лет в базах научных данных можно найти более 5000 научных работ, выполненных с помощью метода ЛДФ. Из этого числа биомикроскопические исследования не превышают 20 работ. Положительно оценивая внедрение ЛДФ в экспериментальную и особенно в клиническую медицину, что явилось одним из наиболее важных научных достижений за последние десятилетия, хотелось бы обратить внимание и на слабые стороны ЛДФ, которые в определенных случаях не могут заменить прямого наблюдения за микрогемодинамикой и микролимфоциркуляцией в органах и тканях. В ряде исследований имеет место извращение реально существующих закономерностей.

*Цель работы* — сравнительное изучение микроциркуляции кожи с помощью биомикроскопического метода и метода ЛДФ в норме и патологии, для оценки сильных и слабых сторон этих методов исследования.

## Методика

Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Эксперименты проводили на 60 белых беспородных крысах-самцах массой 150—450 г в условиях наркоза (хлоралгидрат 0,6 г/кг массы, внутривенно). Биомикроскопию подкожной жировой клетчатки (ПЖК) на спине крысы осуществляли с помощью разработанного нами метода, основанного на использовании световолоконной оптики и вживленной камеры [1]. Биомикроскопия проводилась на микроскопе ЛЮМАМ Р-1 и сопровождалась микрофото- и микровидеосъемкой с использованием микрофотонасадки МФН-10 с фотоаппаратом «Зоркий-4» и видеокамерой Panasonic F 250 (Япония) с видеокассетой S-VHS [2]. УФ облучение поверхности кожи осуществляли с помощью установки с вмонтированной лампой ДРШ-250. ЛДФ микрососудов кожи, включая МС ПЖК, осуществляли с помощью прибора ЛАКК-01 НПП «ЛАЗМА» (Россия) и прибора ALF-21 (США). Регистрация показателя микроциркуляции (ПМЦ) в условных единицах проводилась в центре зоны облучения в течение 10—30 м. Зондируемый объем ткани 1 мм<sup>3</sup> [2]. Поскольку выборки подчинялись законам нормального распределения, статистическую обработку данных проводили с использованием t критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

В контроле ПМЦ на коже спины крысы находилась в состоянии постоянного изменения около средней величины, которую принимали за  $100 \pm 3\%$ . Колебания ПМЦ соответствуют периодическим изменениям вазомоторной активности микрососудов (вазомоция).

Закупорка узкого капилляра более крупным лейкоцитом сопровождалась остановкой кровотока на короткое время, необходимое для деформации и продвижения лейкоцита по капилляру, что прекрасно видно при биомикроскопии. При ЛДФ исключение отдельного капилляра или группы капилляров из кровотока может пройти незамеченным, поскольку в капиллярах небольшое количество клеток и ЛДФ подобное перераспределение кровотока не отмечает. Подобное явление можно наблюдать только при биомикроскопии.



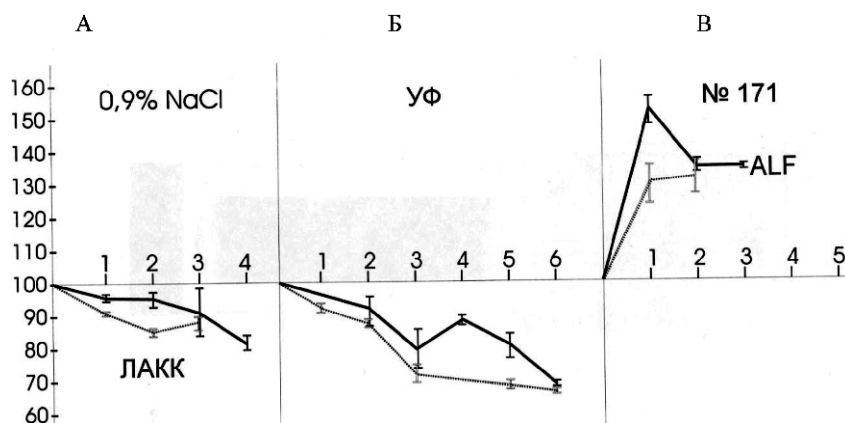
ЛДФ не обнаружит резкого увеличения лейкоцитов и лейкоцитарных тромбов в ответ на внутривенное введение физиологического раствора. Однако лейкоцитарные тромбы могут вызвать нарушение локального кровотока. Лейкоцитарный тромб легко устраним при применении препарата на основе ацетилсалициловой кислоты, но даже уловить подобное нарушение микроциркуляции с помощью ЛДФ невозможно. Биомикроскопия позволяет это быстро сделать при наблюдении за МЦ ногтевого ложа у постели больного.

Незначительное смещение лазерного пучка или положение пациента при ЛДФ может существенно изменить значение ПМЦ. Например, в соседних участках кожи при расстоянии менее 1 мм ПМЦ в одной точке  $6,38 \pm 0,06$ , во второй  $7,85 \pm 0,04$  ( $p < 0,001$ ), то есть имеет место статистически значимое различие кровотока между соседними участками. В случае изучения какого-либо лекарственного препарата и получения завышенного значения ПМЦ можно думать о его эффективности в плане увеличения капиллярного кровотока, который не изменялся. При смещении область зондирования могла обладать другой плотностью МС, что существенно изменило ПМЦ. Вторая причина различия показаний может быть связана с неизбежным изменением угла, под которым направляется лазерный пучок к поверхности, смещающейся в процессе дыхания коже, имеющей неровную поверхность. Наиболее значительное смещение ПМЦ может быть после временного прерывания регистрации ПМЦ в связи с необходимостью проведения манипуляций (введение препарата пациенту или при динамическом длительном наблюдении в течение нескольких дней, месяца). Статистически значимые результаты в подобных случаях возможно получить лишь при значительных изменениях МЦ кожи от момента стагирования до восстановления кровотока.

Биомикроскопический метод позволяет с помощью микрофото- и микровидеосъемки зафиксировать изменения микрососудистого русла, что позволит позднее использовать этот результат в дальнейших исследованиях.

На рис. А представлены данные влияния изотонического раствора хлорида натрия — наиболее часто используемого растворителя лекарственных средств, на ПМЦ в коже спины крысы. По данным ЛДФ, скорость капиллярного кровотока в коже постепенно снижается на 4—17% в течение 20 мин, а по данным биомикроскопии сосудов ПЖК, наоборот, увеличивается на протяжении 15—30 мин после введения раствора. Различия объясняются значительным снижением показателя гематокрита и числа эритроцитов при гемодилюции вызванной растворителем. По-видимому, вклад числа эритроцитов по сравнению с увеличением скорости кровотока в ответ на введение раствора играет большую значимость для подсчета лазерных отражений от эритроцитов для результирующего значения при использовании ЛДФ. На самом деле использование любого растворителя, всегда вызывающего гемодилюцию на фоне снижения гематокрита, будет увеличивать скорость кровотока. Обнаруженное несоответствие данных ЛДФ биомикроскопическим необходимо учитывать при использовании кровезамещающих растворов, скрининга новых лекарственных средств при изучении скорости кровотока в МС с помощью приборов основанных на ЛДФ.

Другой пример на рис. Б показывает снижение ПМЦ при УФ облучении кожи спины крысы в течение 10 минут на площади  $78,5 \text{ мм}^2$ . ПМЦ снижается максимально на 33% в течение 30 мин в 90% опытов с облучением. В 10% экспериментов ПМЦ не меняется, а в отдельных случаях увеличивается. Только биомикроскопическое изучение МЦ кожи в области УФ облучения позволило объяснить причи-



Влияние 0,9% NaCl, УФ облучения кожи спины крысы и пептида №171 (лимфостимулятор 40,0 мкг/кг в/бр.) на показатель микроциркуляции (ПМЦ) по данным ЛДФ. Чёрная сплошная линия — показания прибора ALF-21, серый пунктир — показания прибора ЛАКК-01. По оси абсцисс: интервалы времени по 5 мин. По оси ординат: ПМЦ в %.

ну подобного явления. Оказалось, что нарушения МЦ зависели от наличия лимфатических микрососудов в той или иной области воздействия УФ. В кровеносных сосудах, расположенных рядом или вдоль лимфатических микрососудов кровотоков не нарушался, что создавало мозаичность нарушения МЦ на всей площади облучения.

Обнаружение протективной роли лимфатической системы в сохранении МЦ при УФ воспалении кожи позволило предположить положительное действие стимуляторов лимфотока. На рис. В показано увеличение ПМЦ по данным ЛДФ при использовании лимфостимулятора, который, несмотря на использование в качестве его растворителя физиологического раствора, увеличивал капиллярный кровоток в МС кожи (ПЖК). Гемодилюция, вызываемая растворителем, нивелировалась действием лимфостимулятора. Два разных прибора (ЛАКК-1 и ALF-2.1), основанных на ЛДФ, регистрирующих капиллярную скорость кровотока в МС кожи показали одинаковую направленность изменения ПМЦ.

Таким образом, приведенные примеры показывают, какие большие возможности открываются перед экспериментатором, использующим комплексное изу-

чение любой медицинской проблемы с помощью прижизненного изучения микроциркуляции в сочетании с ЛДФ.

### Литература

1. Ардасенов А.В., Хугаева В.К., Александров П.Н., Коваленко В.С. Метод прижизненного изучения микроциркуляции в подкожной жировой клетчатке крысы с помощью вживленной камеры. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2003; 47(3): 1-5.
2. Ардасенов А.В., Хугаева В.К., Александров П.Н. *Микроциркуляторное русло кожи в условиях воспаления и коррекции методом лимфостимуляции*. М.; Научный мир, 2004. 14

### References

1. Ardasenov AV, Khugaeva V.K., Aleksandrov PN, Kovalenko V.S. The method of in vivo study of microcirculation in the subcutaneous adipose tissue of the rat using the implanted chamber. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2003; 47 (3): 1-5. (in Russian)
2. Ardasenov A.V., Khugaeva V.K., Aleksandrov P.N. *Microcirculatory bed of the skin in conditions of inflammation and correction method of lymph stimulation*. Moscow; Scientific world, 2004. (in Russian)

### Сведения об авторах:

Хугаева Валентина Каргоевна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП;

Ардасенов Алан Валерьевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП.

Вирюс Э.Д., Иванов А.В., Булгакова П.О., Кубатиев А.А.

## Некоторые методические особенности целевой протеомики, основанной на применении жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии с регистрацией селективных переходов

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

Статья знакомит читателя с некоторыми методическими аспектами и этапами планирования эксперимента при использовании жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии с регистрацией селективных переходов в целевой протеомике. Особое внимание уделяется критерию выбора пептида, используемого в качестве суррогатного аналита определяемого белка. Детально описываются подходы к выбору селективных переходов для селективного детектирования пептидов.

**Ключевые слова:** целевая протеомика, ВЭЖХ-МС/МС, регистрация селективных переходов.

**Для цитирования:** Вирюс Э.Д., Иванов А.В., Булгакова П.О., Кубатиев А.А. О некоторых особенностях целевой протеомики, основанной на применении жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии с регистрацией селективных переходов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 219—222.  
DOI:

**Для корреспонденции:** Вирюс Эдуард Даниэлевич, edwardvirus@yandex.ru

**Финансирование.** Публикация подготовлена в рамках программы ФНИ государственных академий наук на 2013-2020 (№ 0520-2014-0029)

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.10.2018

Virus E.D., Ivanov A.V., Bulgakova P.O., Kubatiev A.A.

## Some features of targeted proteomics based on the use of HPLC-MS/MS with the registration of selective transitions

The Institute of General Pathology and Pathophysiology 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315

This article introduces the reader to some methodological aspects of an experiment using HPLC-MS/MS with the registration of selective transitions in the targeted proteomics. Special attention is paid to the selection criterion of a peptide used as a surrogate analyte of the protein to be determined. The approaches to the selection of selective transitions for the selective detection of peptides are described in detail.

**Keywords:** targeted proteomics, HPLC-MS/MS, SRM.

**For citation:** Virus E.D., Ivanov A.V., Bulgakova P.O., Kubatiev A.A. [Some features of targeted proteomics based on the use of HPLC-MS/MS with the registration of selective transitions]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 219—222 (in Russian)  
DOI:

**For correspondence:** Virus Edward, edwardvirus@yandex.ru

**Funding.** The publication was prepared in the framework of the FNI program of state academies of sciences for 2013

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

Received 05.10.2018

## Введение

В протеомных исследованиях, основанных на применении жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии с регистрацией селективных переходов (ВЭЖХ-МС/МС-SRM), в качестве целевых компонентов выступают пептиды. Другими словами, исследователи детектируют не искомые белки, а пептиды, которые являются характеристическими структурными фрагментами этих белков. Таким образом, протеомные исследования с применением ВЭЖХ-МС/МС-SRM всегда включают в себя 4 основных стадии. На 1-й стадии происходит выбор белков, укрепляющих или опровергающих гипотезы, выдвигаемые исследователями в результате многолетних клинических испытаний. На 2-й стадии теоретически оценивают каждый пептид, который будет «представлять» белок, выбранный для исследований. На 3-й стадии приступают к «селекции» переходов. Оптимальные переходы должны обеспечивать одновременно высокую чувствительность и селективность определения искомых пептидов. На этой стадии оптимизируют методы пробоподготовки, условия хроматографического разделения или ионизации пептидов. На 4-й стадии приступают к валидации выбранных переходов при анализе реальных биологических объектов.

### *Первая стадия*

На 1-й стадии у исследователя есть гипотеза, которую необходимо проверить. Здесь, например, выбор белков может быть основан на изучении течения разнообразных патологических процессов. На этой стадии исследователь использует предварительные результаты, представленные в литературе или полученные ранее в ходе «крупномасштабных» протеомных исследований. Бесспорно, основной целью протеомики является, прежде всего, исследование всего протеома в одном эксперименте. Однако только при строгой количественной валидации с применением ВЭЖХ-МС/МС-SRM можно получить окончательное и однозначное подтверждение выводов глобальной протеомики.

### *Вторая стадия*

На 2-й стадии для каждого выбранного белка выбирают пептид, полученный после трипсинолиза вышеупомянутого белка. Пептиды, полученные с использованием трипсина, удовлетворительно определяются методом ВЭЖХ-МС/МС-SRM, так как они обычно содержат от 8 до 25 аминокислот. Таким образом, не возникает сложностей с ограниченным диапазоном сканирования квадрупольных масс-спектрометров [1]. Выбранные пептиды должны отвечать очень строгим критериям: иметь уникальную аминокислотную последовательность, ассоциированную только с интересующим исследователя белком; воспроизводимо и устойчиво детектироваться в каждом анализе; иметь высокое сечение ионизации. Чтобы установить «уникальность» аминокислотной последовательности пептида все чаще прибегают к компьютерным программам [2], моделирующим трипсинолиз белков. Кроме того, должна быть достигнута высокая и воспроизводимая степень трипсинолиза белков. Последним, но очень важным фактором является эффективность хроматографического разделения пептидов. Гидрофильные пептиды слабо удерживаются в колонках с неподвижными фазами C<sub>18</sub>. С другой стороны расширение хроматографических пиков гидрофобных пептидов является частым явлением. Существует 2 основных подхода при выборе детектируемых пептидов. 1-й подход основан на использовании существующих экспериментальных данных. В этом случае используют данные о пептидах, компилируемые в больших базах данных. К этим базам данных относятся PeptideAtlas [3], GPMDB [4], Pride [5], ProteomicsDB [6] и другие. Здесь при выборе детектируемого пептида учитывают частоту, с которой его наблюдают в различных экспериментах. В нескольких базах данных каждому пептиду присваивается рейтинг. По этому рейтингу можно судить, насколько часто он наблюдается в протеомных экспериментах. Однако многие менее распространенные белки отсутствуют в базах данных. Поэтому при отсутствии экспериментальных данных используют 2-й подход, основанный на применении вычислительных методов. Большинство используемых вычислительных методов позволяют предсказать продукты трипсинолиза белков. Некоторые вычислительные комплексы предсказывают физико-химические свойства пептидов. На основе этих методов разработаны мощные компьютерные программы. К ним относятся: ESPredictor [7], PeptideSieve [8], PepFly [9], STEPP [10], Peptide detectability predictor [11], PeptideMass [12] и др. При выборе пептида также важно установить насколько эффективно он будет детектироваться. К примеру, для пептидов с короткой аминокислотной последовательностью или с пролиновым остатком характерен высокий отклик. Такие пептиды должны быть первыми кандидатами при использовании ВЭЖХ-МС/МС-SRM. К сожалению, существующие программы не могут с высокой вероятностью предсказать, с каким откликом будет детектироваться тот или иной выбранный пептид. Кроме того, необходимо обратить внимание на возможные химические модификации аминокислот, находящихся в составе пептидов. В этом случае пептиды различных форм будут присутствовать в анализируемой смеси, что может привести к искажению результатов количествен-

ного определения. К этим модификациям относятся алкилирование цистеина, окисление метионина, дезаминирование аспарагина, N-концевая циклизация глутаминовой кислоты. К подобным искажениям результатов количественного определения могут привести посттрансляционные модификации пептидов (гликозилирование, фосфорилирование, и т.д.). Обычно достаточно от 2 до 3 пептидов для идентификации одного белка. Для валидации способа количественного определения белка, как правило, достаточно одного пептида. Важно подчеркнуть, что для количественного определения белков, существующих в различных изоформах, необходимо выбрать пептиды, охватывающие неизменные и аберрантные участки белков.

### *Третья стадия*

После выбора пептидов приступают к выбору оптимальных переходов. Здесь основными критериями выбора является эффективность столкновительной диссоциации и селективность детектирования фрагментного иона. Чувствительность анализа определяется интенсивностью фрагментного иона, полученного в результате диссоциации, индуцированной соударениями, иона-предшественника выбранного пептида. В свою очередь селективность определения будет ассоциирована с интерференциями, вызванными веществами с близкими временами удерживания и отношениями массы к заряду ионов-предшественников с определяемыми пептидами. Обычно довольствуются двумя или тремя переходами для мониторинга выбранных реакций. При отсутствии стандартных образцов пептидов выбор оптимальных переходов возможен только после проведения предварительных поисковых экспериментов. Это не исключает обращение к данным (МС-МС спектрам), полученным с использованием ионных ловушек или гибридных масс-спектрометров и хранящимся в репозиториях (хранилища данных о белках и пептидах). К таким репозиториям можно отнести GPMDB и PeptideAtlas. Недавно появился SRMAtlas [13], в котором хранятся оптимальные переходы для большого числа пептидов. Обращаясь к репозиториям, следует помнить, что интенсивность фрагментного иона будет зависеть от используемого типа масс-спектрометра и условий диссоциации, индуцированной соударениями. Если исследуемый пептид отсутствует в репозитории, исследователи пытаются самостоятельно рассчитать отношение массы к заряду фрагментного иона пептида. Как правило, для повышения селективности определения, исследователи стремятся использовать фрагментные ионы с  $m/z$  больше чем у иона-предшественника. Другими словами в качестве ионов-предшественников стремятся использовать многозарядные

ионы. Несмотря на высокую селективность, достигаемую масс-спектрометрами с тройным квадрупольным масс-анализатором, пригодность каждого выбранного перехода (для каждого исследуемого пептида) должна быть оценена с точки зрения анализа реальных биологических образцов. На этой стадии необходимо провести оценку мешающего влияния фрагментных ионов коэлюирующих веществ. Для этого исследуют масс-хроматограммы реальных образцов для выбранных переходов, используя изотопно меченые пептиды. Они, как правило, коэлюируют с немечеными изотопмерами. Обычно пептиды, выбранные в качестве образцов сравнения, метят инкорпорированием [ $^{13}\text{C}_6$  $^{15}\text{N}_2$ ]лизина или [ $^{13}\text{C}_6$  $^{15}\text{N}_4$ ]аргинина. В конечном счете, это будет зависеть от детектируемого пептида. Меченые пептиды добавляют непосредственно после трипсинолиза. Использование меченых пептидов позволяет оценить влияние интерференций на количественное определение и выяснить, насколько адекватно выбран переход. Подобный подход позволяет также установить предел обнаружения. После выбора оптимальных переходов приступают к поиску оптимальных условий, для улучшения пределов детектирования. Большую помощь в оптимизации оказывает построение зависимостей интенсивностей фрагментных ионов от энергии соударений.

### *Четвертая стадия*

Процедура валидации разработанного способа детектирования пептидов предполагает установление линейности и предела количественного определения, зависящих от матричных эффектов и состава пробы. Самый простой и надежный способ установления этих аналитических характеристик при использовании регистрации селективных переходов осуществляется добавлением одинаковых количеств изотопно-меченых пептидов в анализируемые образцы и построением градуировочных зависимостей. Другими словами, последовательно разбавляя пробу, в нее добавляют одинаковое количество внутреннего стандарта. В этом случае желательно, чтобы исходная концентрация внутренних стандартов незначительно отличалась от концентрации эндогенных пептидов в исследуемом объекте при нормальном состоянии. Однако этому подходу можно отдавать предпочтение только в том случае, если концентрация эндогенных пептидов намного выше предела детектирования. В тех случаях, когда концентрация определяемых веществ только в несколько раз выше предела детектирования, разбавленную в 10—50 раз пробу используют в качестве холостой. Эту «холостую» пробу используют в дальнейшем для приготовления градуировочных смесей, добавляя разные количества определяемых пептидов в конечный экстракт. Расчет количест-

ва определяемых пептидов основан на отношении площадей хроматографических пиков эндогенных и изотопно-меченых пептидов. Коэлюирование изотопно-меченых пептидов и их эндогенных аналогов является дополнительным подтверждением правильности идентификации определяемых пептидов.

### Заключение

ВЭЖХ-МС/МС-SRM благодаря своей высокой чувствительности и селективности идеально подходит для решения задач количественной протеомики. Большие базы данных масс-спектров пептидов позволяют генерировать множество переходов. Их можно успешно использовать для установления различий в содержании белков в здоровом и больном состоянии организма.

### Литература

1. Вирюс Э.Д., Иванов А.В., Лузянин Б.П., Пальцын А.А., Кубатиев А.А. Масс-спектрометрия в биологии и медицине XXI века. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 57(4): 68-75.
2. [http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/) Дата обращения 19.10.2018
3. <http://www.peptideatlas.org/> Дата обращения 19.10.2018
4. <http://gpmdb.thegpm.org/> Дата обращения 19.10.2018
5. <http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/> Дата обращения 19.10.2018
6. <https://www.proteomicsdb.org/> Дата обращения 19.10.2018
7. <http://www.broadinstitute.org/cancer/software/gene-pattern/modules/ESPPredictor.html> Дата обращения 19.10.2018
8. <https://www.systemsbiology.org/peptidesieve> Дата обращения 19.10.2018
9. <http://www.agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/index.cgi> Дата обращения 19.10.2018

### Сведения об авторах:

*Вирюс Эдуард Даниэлевич*, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. функциональной ангиопротеомики и метабономики НИИОПП

*Иванов Александр Владимирович*, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови НИИОПП.

*Булакова Полина Олеговна*, мл. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови НИИОПП.

*Кубатиев Аслан Амирханович*, академик РАН, доктор мед. наук, проф., науч. руководитель НИИОПП.

10. <http://cbb.pnnl.gov/portal/software/stepp.html> Дата обращения 19.10.2018

11. <http://darwin.informatics.indiana.edu/applications/PeptideDetectabilityPredictor/> Дата обращения 19.10.2018

12. [http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/) Дата обращения 19.10.2018

13. <http://www.srmatlas.org/> Дата обращения 19.10.2018

### References

1. Вирюс Э.Д., Иванов А.В., Лузянин Б.П., Пальцын А.А., Кубатиев А.А. Масс-спектрометрия в биологии и медицине XXI века. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 57(4): 68-75.
2. [http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/) Дата обращения 19.10.2018
3. <http://www.peptideatlas.org/> Дата обращения 19.10.2018
4. <http://gpmdb.thegpm.org/> Дата обращения 19.10.2018
5. <http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/> Дата обращения 19.10.2018
6. <https://www.proteomicsdb.org/> Дата обращения 19.10.2018
7. <http://www.broadinstitute.org/cancer/software/gene-pattern/modules/ESPPredictor.html> Дата обращения 19.10.2018
8. <https://www.systemsbiology.org/peptidesieve> Дата обращения 19.10.2018
9. <http://www.agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/index.cgi> Дата обращения 19.10.2018
10. <http://cbb.pnnl.gov/portal/software/stepp.html> Дата обращения 19.10.2018
11. <http://darwin.informatics.indiana.edu/applications/PeptideDetectabilityPredictor/> Дата обращения 19.10.2018
12. [http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/) Дата обращения 19.10.2018

Каба С.И., Соколовская А.А.

## Детекция наночастиц серебра во внутриклеточном пространстве с помощью проточной цитометрии

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

Продемонстрировано обнаружение наночастиц серебра во внутриклеточном пространстве с помощью проточной цитофлуориметрии. В эндотелиальных клетках линии EA.hy926, инкубированных в растворе, содержащем 2 мкг/мл наносеребра, измеряли боковое светорассеяние. По сравнению с контрольными образцами этот параметр возрастал, в то время как прочие значимые характеристики не изменялись. Это подтверждает чувствительность метода к изменившемуся состоянию клеток и указывает на поглощение наночастиц серебра клетками при концентрации ниже токсической.

**Ключевые слова:** наночастицы серебра; проточная цитофлуориметрия.

**Для цитирования:** Каба С.И., Соколовская А.А. Детекция наночастиц серебра во внутриклеточном пространстве с помощью проточной цитометрии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62 (4): 223—226.

**DOI:**

**Для корреспонденции:** Каба Саид Ибрагимович, e-mail: said.kaba@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 20.08.2018

Kaba S.I., Sokolovskaya A.A.

## Detection of intracellular silver nanoparticles using flow cytometry

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

The study demonstrated a possibility for detection of intracellular silver nanoparticles using flow cytometry. The parameter used in this work, side scattering, was measured in EA.hy926 endothelial cells incubated in a 2 µg/ml silver nanoparticle solution. This parameter was increased compared to control samples. Therefore, this technique was sensitive to changes in the cell status and suggested the cell uptake of the particles under the subtoxic conditions.

**Keywords:** silver nanoparticles; flow cytometry.

**For citation:** Kaba S.I., Sokolovskaya A.A. [Detection of intracellular silver nanoparticles using flow cytometry]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 223—226 (In Russian)

**DOI:**

**For correspondence:** Kaba Said Ibragimovich, e-mail: said.kaba@gmail.com.

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

**Received** 20.08.2018

### Введение

Взаимодействие наноразмерных частиц (НЧ) с живыми организмами представляет собой важный предмет изучения ввиду всё возрастающего применения таких материалов в биомедицинских исследованиях [1]. Влияние широко применяемых наночастиц серебра (НЧС) на жизнедеятельность клеток в значительной мере зависит от того, попадают ли они во внутриклеточное пространство. Было неоднократно показано, что НЧС мо-

гут высвобождать ионы серебра, находясь внутри клеточных органелл, особенно при попадании в лизосомы [2, 3]. Вследствие этого проникновение наночастиц в клетки остаётся важным вопросом для изучения.

В литературе имеются сведения о том, что у клеток, содержащих НЧ, заметно возрастает боковое светорассеяние, характеризующее изменения гранулярности клеток [4, 5]. Исследование параметров рассеяния клеток с помощью цитометрии может быть разумной альтерна-

тивной высокочувствительным, но трудоёмким и дорогостоящим методом детекции НЧ в клетках, традиционно используемым в исследовательской практике [6] в тех случаях, когда требуется подтвердить неспецифические изменения внутриклеточного содержимого. Данный подход всё ещё требует доработки, так как в нем не учитываются возможные патоморфологические изменения клеток, не связанные с поглощением частиц, в частности, уменьшение размеров в ходе развития апоптоза. Однако, если прямое рассеяние от клеток (параметр, характеризующий размеры клеток) и общая жизнеспособность не меняются, то можно предположить, что изменение гранулярности обусловлено именно агрегатами наночастиц, а не является патоморфологическим признаком, присущим апоптозу.

*Цель данного исследования* — выявление агрегатов НЧС в эндотелиальных клетках человека в эксперименте *in vitro* с использованием характеристик рассеяния. В ходе работы выполнялись следующие задачи:

- осуществляли контроль жизнеспособности клеток с помощью метода исключения флуоресцентного красителя пропидия иодида (ПИ) с детекцией с помощью проточной цитофлуориметрии;
- устанавливали поглощение НЧС клетками при нетоксической концентрации частиц, измеряя их параметры рассеяния с помощью проточной цитофлуориметрии.

## Методика

*Инкубация клеток с наночастицами.* Препарат НЧС получен с помощью биохимического синтеза в водном растворе [7]. Раствор содержал 1 ммоль/л наночастиц и 3 ммоль/л аэрозоля-ОТ (АОТ) в качестве стабилизатора.

В качестве клеточной модели использовались эндотелициты человека линии EA.hy926. Питательная среда: DMEM с добавлением 10% бычьей сыворотки, смеси заменимых аминокислот, добавки НАТ и 50 мкг/мл гентамицина (все компоненты — «Thermo Fisher Scientific», США). Клетки инкубировали при 37°C в увлажнённой атмосфере 5%-ного углекислого газа в инкубаторе «New Brunswick Galaxy 48 R» («Erpendorf», Германия). Культивирование проводили во флаконах площадью 75 см<sup>2</sup>, пассажи выполнялись каждые 48 ч, число клеток в начале каждого пассажа во флаконе составляло 500 тыс.

Клетки отделяли от флакона с помощью 0,05%-ного раствора трипсина в 0,53 ммоль/л ЭДТА («ПанЭко», Россия), отмывали и ресуспендировали в свежей среде DMEM. Подсчёт общей концентрации клеток, концентраций живых и мёртвых клеток в суспензии выполняли в автоматическом счётчике клеток «Countess» («Thermo Fisher Scientific»), применяя окрашивание

клеток 0,4%-ным раствором трипанового синего. Затем суспензию клеток доводили до концентрации  $3 \times 10^4$  кл/мл и вносили по 1 мл суспензии в 24-луночный культуральный планшет. Перед внесением НЧС клетки инкубировали в планшете 40 ч, перед использованием проверяли степень покрытия лунок клеточным монослоем с помощью световой микроскопии.

В подготовленные планшеты с клетками вносили препарат НЧС до массовых концентраций 2, 4 и 6 мкг/мл (разбавление раствора НЧС в среде соответственно в 54, 27 и 18 раз). В качестве контроля токсичности стабилизатора использовали раствор АОТ концентрацией 3 ммоль/л, его разбавления соответствовали разбавлениям раствора НЧС. В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду в тех же разбавлениях. Клетки с внесёнными препаратами инкубировали 24 ч.

*Цитометрические измерения.* После инкубации клетки открепляли от планшета с помощью раствора трипсина в ЭДТА, дважды отмывали в 2 мл фосфатно-солевого буфера («Эко-Сервис», Россия) и ресуспендировали в 100 мкл свежего буфера. Затем в суспензию вносили раствор ПИ в фосфатно-солевом буфере («Miltenyi Biotec», Германия) до концентрации 2 мкг/мл, перемешивали и оставляли инкубировать в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут. Окрашенные таким образом клетки анализировали на проточном цитометре «FACSCalibur» («BD Biosciences», США). Детектировали сигнал по каналу FL2, а также прямое (FSC) и боковое (SSC) светорассеяние. Число клеток для анализа составляло по 10 000 на образце. Дальнейшую обработку и визуализацию полученных данных проводили с помощью программного обеспечения «Flowing software» версии 2.5.1 (Университет Турку, Финляндия).

## Результаты и обсуждение

После инкубации клеток с НЧС и АОТ определяли долю клеток, окрашенных ПИ, и изменения бокового светорассеяния. На основании флуоресцентного сигнала по каналу FL2 в качестве субтоксической была выбрана концентрация наносеребра 2 мкг/мл. Боковое рассеяние SSC от клеток, инкубированных с НЧС, увеличилось (рис. 1, в; рис. 2), чего не наблюдалось в контроле АОТ (сравнения проводили с контролем воды). При этом прямое светорассеяние FSC оставалось неизменным во всех образцах клеточной суспензии при субтоксической дозе препаратов, что свидетельствует об отсутствии изменений в размерах клеток.

Таким образом, возрастание значения SSC при прочих неизменных параметрах подтверждает поглощение НЧС клетками без заметного влияния на биологические



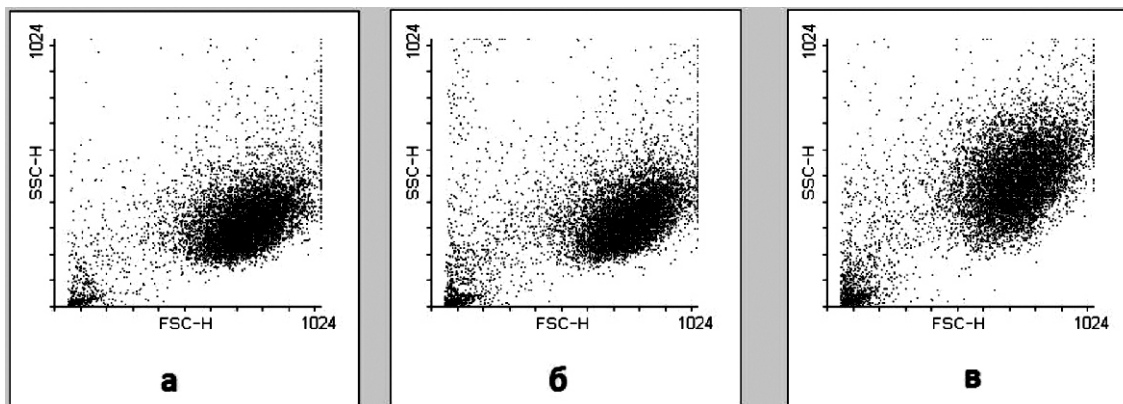


Рис. 1. Двумерная диаграмма светорассеяния клеток EA.hy926: а — контроль (дистиллированная вода); б — с аэрозолем-ОТ; в — с наночастицами серебра (2 мкг/мл). Обозначения: FSC — прямое светорассеяние; SSC — боковое светорассеяние.

процессы в клетке. Сравнение бокового рассеяния от образцов клеток, инкубированных с НЧС разных концентраций, показывает, что рассеяние не изменялось. Это может быть связано с тем, что диапазон концентраций, используемый в данной работе, является слишком узким, т.е. «разрешающая способность» проточной цитофлуориметрии в этом случае оказывается недостаточной, чтобы достоверно различить клетки с различным содержанием частиц. В пользу этого вывода свидетельствуют данные литературы, в соответствии с которыми концентрации исследуемых наноматериалов имели гораздо больший диапазон. В нашем случае увеличение диапазона было ограничено собственной цитотоксичностью АОТ [8].

### Заключение

Измерения в рамках проточной цитометрии позволяют провести качественную детекцию наночастиц серебра при исследовании их биологических эффектов. Кроме того, данные указывают на то, что наносеребро присутствовало в клетках после 24-часовой инкубации и при концентрациях частиц ниже токсической.

### Список литературы (п.п. 2, 5—8 см. References)

1. Сарапульцев А.П., Ремпель С.В., Кузнецова Ю.В., Сарапульцев Г.П. Взаимодействие наночастиц с биологическими объектами (обзор). *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2016; (3): 97-111. DOI:10.22138/2500-0918-2016-15-3-97-111
6. Гендиксон О.Д., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б., Попов В.О. Методы детекции и идентификации техногенных наночастиц. *Биофизика*. 2011; 56(6): 965-994.
7. Егорова Е.М., Сосенкова Л.С. Способ получения водных растворов наночастиц серебра с природным восстановителем. Патент RU2618270C1. 2016.

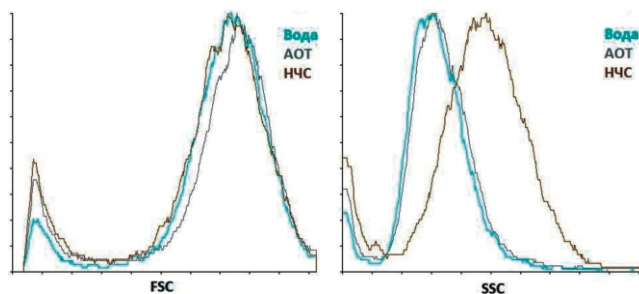


Рис. 2. Наложение гистограмм прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния клеток EA.hy926, обработанных НЧС (2 мкг/мл) и контрольными растворами.

### References

1. Sarapultsev A.P., Rempel S.V., Kuznetsova Ju.V., Sarapultsev G.P. [Nanoparticle's interactions with biological objects (the review)]. *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki. [Journal of Ural Medical Academic Science]*. 2016; (3): 97-111. DOI:10.22138/2500-0918-2016-15-3-97-111 (in Russian)
2. Singh RP, Ramarao P. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 2012; 213(2): 249-259. DOI:10.1016/j.toxlet.2012.07.009
3. Milic M., Leitinger G., Pavi I., Zebi M. Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells. *J. Appl. Toxicol.* 2014; DOI:10.1002/jat.3081
4. Suzuki H., Toyooka T., Ibuki Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ. Sci. Technol.* 2007; 41(8): 3018-3024. DOI:10.1021/es0625632
5. Zucker R.M., Massaro E.J., Sanders K.M., Degn L.L., Boyes W.K. Detection of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytom. Part A*. 2010; 77A(7): 677-685. DOI:10.1002/cyto.a.20927
6. Hendrickson O.D., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Popov V.O. [Methods of Detection and Identification of Manufactured Nanoparticles]. *Биофизика. [Biophysics]*. 2011; 56(6): 965-994. (in Russian)
7. Egorova EM, Sosenkova LS. [Method of producing solvent solutions of nanoparticles of silver with natural restorator]. Patent RU2618270C1. 2016. (in Russian)
8. Egorova E.M., Kaba S.I., Tlupova S.A. Assessment of the Cytotoxicity of Silver Nanoparticles with Different Surface Charge. In: Bartul Z., Trenor J., eds. *Advances in Nanotechnology*. New York: Nova Science Publishers, 2016. 25-48.

**Сведения об авторах**

*Каба Саид Ибрагимович* — научный сотрудник лаборатории нанопатологии и биомедицинских нанотехнологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт патологии и патофизиологии»

*Соколовская Алиса Анатольевна* — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ «Научно-исследовательский институт патологии и патофизиологии»

Шойбонов Б.Б.<sup>1</sup>, Драпкина О.М.<sup>1</sup>, Елиашевич С.О.<sup>1</sup>, Лавренова Е.А.<sup>1</sup>, Федорович А.А.<sup>1</sup>,  
Сухинина Н.Ю.<sup>1</sup>, Толпыго С.М.<sup>2</sup>, Григорьева Д.В.<sup>3</sup>, Баронец В.Ю.<sup>4</sup>, Панченко Л.Ф.<sup>4,5</sup>, Кубатиев А.А.<sup>5</sup>

## Скрининг-тест для определения множественно-модифицированных липопротеинов низкой плотности — маркера субклинического атеросклероза

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России, 101990, Москва, Петроверигский пер., д.10, стр. 3

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им П.К. Анохина», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>3</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» Минздрава России, 101000, г. Москва, Россия, ул. Покровка, д. 22-А

<sup>4</sup> Национальный научный центр наркологии — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России, 119002, г. Москва, Россия, М. Могилевский пер., д. 3

<sup>5</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Разработан скрининг-тест для определения множественно-модифицированных липопротеинов низкой плотности (ммЛПНП) в сыворотке крови для рутинных исследований. Инкубация сыворотки в буфере, содержащем 9,1% поливинилпирролидона 35000 (ПВП-35) приводит к полной агрегации ммЛПНП. Патогенность выделенных ммЛПНП подтверждена в тестах связывания системы комплемента и литической активности *in vitro*, а также в тесте сосудистой дистонии у крыс *in vivo*. Предлагаемый способ отличается высокой производительностью и низкой себестоимостью. Метод включает 2 операции — смешивание сыворотки с раствором 10% ПВП-35 в 96-луночных иммунологических планшетах, инкубация в течение 10 мин при комнатной температуре и турбидиметрия при 450 нм на ИФА-ридере. Проведены исследования взаимосвязи концентрации ммЛПНП в сыворотке крови и толщины комплекса интима-медиа по данным ультразвукового дуплексного сканирования сонных артерий у 78 человек с низким сердечно-сосудистым (SCORE <1%) и низким кардио-метаболическим рисками (СМДС 0-1). Из всех фракций липидного спектра крови ммЛПНП показали самый высокий коэффициент корреляции с показателями субклинического атеросклероза, что подтверждает высокий атерогенный потенциал ммЛПНП.

**Ключевые слова:** множественно-модифицированный липопротеин низкой плотности, поливинилпирролидон, система комплемента, литическая активность ммЛПНП, сосудистая дистония у крыс, субклинический атеросклероз, толщина комплекса интима-медиа сонных артерий.

**Для цитирования:** Шойбонов Б.Б., Драпкина О.М., Елиашевич С.О., Лавренова Е.А., Федорович А.А., Сухинина Н.Ю., Толпыго С.М., Григорьева Д.В., Баронец В.Ю., Панченко Л.Ф., Кубатиев А.А. Скрининг-тест для определения множественно-модифицированных липопротеинов низкой плотности — маркера субклинического атеросклероза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 227—236.

**DOI:**

**Для корреспонденции:** Шойбонов Батожаб Батожагаралович, e-mail: shoibonov@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания министерства здравоохранения РФ № АААА-А17-117031310099-1.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 15.07.2018

Shoibonov B.B.<sup>1</sup>, Drapkina O.M.<sup>1</sup>, Eliashevich S.O.<sup>1</sup>, Lavrenova E.A.<sup>1</sup>, Fedofovich A.A.<sup>1</sup>,  
Suhinina N.Yu.<sup>1</sup>, Tolpygo S.M.<sup>2</sup>, Grigir`eva D.V.<sup>3</sup>, Baronets V.Yu.<sup>4</sup>, Panchenko L.F.<sup>4,5</sup>, Kubatiev A.A.<sup>5</sup>

## Screening test for determination of multiple-modified lipoproteins of low density — marker of subclinical atherosclerosis

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution »National Medical Research Center for Preventive Medicine» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 101990, Moscow, 10/3 Petroverigsky per.

<sup>2</sup> Federal State Budget Scientific Institution «P.K.Anokhin Institute of Normal Physiology», 125315, Moscow, 8 Baltiyskaya street

<sup>3</sup> State Budgetary Healthcare Institution of the Moscow region. «Scientific Research Institute of Obstetrics and Gynecology of the Moscow Region», 101000, Moscow, 22/A Pokrovka street

<sup>4</sup> «V.Serb'sky Federal Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 119002, Moscow, 3 M. Mogiltsevsky per.

<sup>5</sup> Federal State Budget Scientific Institution «The research institute of general pathology and pathophysiology», 125315, Moscow, 8 Baltiyskaya street

A screening test was developed to determine multiply-modified low-density lipoprotein (mmLDL) in serum for routine studies. Incubation of serum in a buffer containing 9.1% polyvinylpyrrolidone 35,000 (PVP-35) results in complete aggregation of mmLDL. Pathogenicity of isolated mmLDL was confirmed during binding tests of the complement system and lytic activity *in vitro*, and also in vascular dystonia test with rats *in vivo*. The proposed method is characterized by high productivity, low cost, includes 2 operations — mixing serum with a solution of 10% PVP-35 in 96-well immunoassay plates, incubating for 10 min at room temperature and turbidimetry at 450 nm on an ELISA reader. A study was made to determine relationship between concentration of mmLDL in the blood serum and thickness of the intima-media complex from data of ultrasound duplex scanning of carotid arteries with 78 people with low cardiovascular risk (SCORE <1%) and low cardiovascular risk (CMDS 0-1). Of all fractions of the lipid spectrum of the blood, mmLDL showed the highest correlation coefficient with the indices of subclinical atherosclerosis, which confirms high atherogenic potential of mmLDL.

**Keywords:** multiply-modified low-density lipoproteins, polyvinylpyrrolidone, complement system, mmLDL lytic activity, vascular dystonia, subclinical atherosclerosis, carotid artery intima-media thickness.

**For citation:** Shoibonov B.B., Drapkina O.M., Eliashevich S.O., Lavrenova E.A., Fedofovich A.A., Suhinina N.Yu., Tolpygo S.M., Grigir'eva D.V., Baronets V.Yu., Panchenko L.F., Kubatiev A.A. Screening test for determination of multiple-modified lipoproteins of low density — marker of subclinical atherosclerosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 227—236. (in Russian).

**DOI:**

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

**Acknowledgment.** RF № AAAA-A17-117031310099-1.

**For correspondens:** Shoibonov B.B., e-mail: shoibonov@mail.ru

**Received** 15.07.2018

## Введение

Атеросклероз является патогенетической основой ишемической болезни сердца, нарушений мозгового кровообращения и других сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Среди основных причин развития атеросклероза наиболее изученной является липидная теория [1]. Хорошо известно, что повышенный уровень циркулирующего холестерина, переносимого ЛПНП, служит независимым фактором риска для ССЗ [2]. Нативные ЛПНП (нЛПНП) не индуцируют накопление холестерина внутри макрофагов и последующее образование пенных клеток [1, 3]. Показано, что окислительная модификация ЛПНП (оx-ЛПНП) вызывает образование из макрофагов пенных клеток при неконтролируемом поступлении оx-ЛПНП через сквэнджер-рецепторы, которые не регулируются уровнем внутриклеточного холестерина [4]. Оx-ЛПНП также индуцируют другие проатерогенные эффекты, такие, как эндотелиальная дисфункция и пролиферация гладкомышечных клеток, благодаря поглощению их с участием лектиноподобных рецепторов 1 типа к оx-ЛПНП (LOX-1) [5, 6]. С момента обнаружения оx-ЛПНП рядом исследователей была подтверждена связь между циркулирующими

оx-ЛПНП и сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) атеросклеротического генеза [7, 8]. Выделяют следующие виды модифицированных липопротеинов (мЛПНП): перекисно-модифицированные, ацетилованные, ацетоацетилованные, сукцинированные, модифицированные малоновым диальдегидом, гликозилированные, десиалированные. Среди различных форм модифицированных ЛПНП наиболее важная роль в атерогенезе, по-видимому, принадлежит окисленным ЛПНП (оxЛПНП).

Одной из ведущих причин образования оxЛПНП *in vivo* является окислительный стресс. В экспериментах показано, что к процессу окислительной модификации ЛПНП способны различные клетки сосудистой стенки: эндотелиоциты, макрофаги, гладкомышечные клетки. Однако ведущую роль в этом процессе отводят макрофагам. Эти клетки секретируют активные формы кислорода, а также миелопероксидазу, при участии которой образуется гипохлорит анион — сильный окислитель ЛПНП. Множественная модификация сопровождается изменением как физических свойств ЛПНП, так и их химического состава. Так, у пациентов с коронарным атеросклерозом в циркулирующих мЛПНП, в сравнении с нЛПНП, обнаружено сниженное содержание

сиаловой кислоты, некоторых фракций фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, сфингомиелина), свободного, эстерифицированного ХС и повышенный уровень лизофосфатидилхолина, полиненасыщенных жирных кислот, продуктов перекисного окисления липидов. При модификации ЛПНП в них уменьшается содержание антиоксидантов — коэнзима Q, альфа и бета-токоферолов, бета-каротина, ликопина. Вследствие сниженного содержания антиоксидантов и увеличения уровня полиненасыщенных жирных кислот, мЛПНП более подвержены окислению, чем нЛПНП. ммЛПНП имеют большую плотность и меньший размер частиц [9].

Однако определение мЛПНП с использованием моноклональных антител к одному эпитопу в иммуноферментных анализах дают противоречивые результаты в зависимости от стадии атеросклеротического поражения артерий.

Субклиническим считается бессимптомное атеросклеротическое поражение сосуда, когда формирование атеросклеротических бляшек, находится в начальной стадии и степень сужения сосудов не достигает гемодинамической значимости. В настоящее время субклинический атеросклероз диагностируют с помощью дуплексного сканирования сонных артерий при значении показателя толщины комплекса интима-медиа (ТИМ) более 0,9 мм. Однако диагностика ТИМ характеризуется субъективностью из-за феномена физиологического, постспрагиального воспаления эндотелия [10], с одной стороны, и возрастных изменений ТИМ, которые индивидуальны у каждого человека [11].

В настоящее время в клинической лабораторной практике отсутствуют доступные для рутинных исследований методы определения содержания ммЛПНП. Учитывая важную патогенетическую роль ммЛПНП при атеросклерозе [12] разработка простых доступных для рутинных исследований скрининг-тестов остается актуальной.

*Цель исследования* — разработка доступного скрининг-теста для определения ммЛПНП, биохимического маркера субклинического атеросклероза.

### Методика

*Материал и реактивы.* В работе использовали веронал, мединал, — фирмы «Serva» (ФРГ), трис — «Merck» (ФРГ), поливинилпирролидон с мол.

массой  $35000 \pm 5000$  (ПВП-35) производства ООО «АК Синтвита», Россия, комплемент морской свинки, консервированные эритроциты барана («ЭКОлаб», г. Электрогорск, Россия) остальные реактивы квалификации не ниже ч.д.а. — отечественного производства.

Приготовление эритроцитов барана, сенсibilизированных антителами кролика (ЕА), изотонического вероналового буфера, рН 7,4 (VBS), буфера, содержащего ионы  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  ( $VBS^{2+}$ ), описано ранее [13].

Буфер для преципитации ммЛПНП готовили растворением 10 г ПВП (относительная молекулярная масса  $35000 \pm 5000$ ) в 100 мл 0,01M Трис-НСl-буфера, рН 7,4, содержащего 0,15 M NaCl, как описано в работе<sup>1</sup>.

*Выделение ммЛПНП из пулированной сыворотки крови неврологических больных с инструментально подтвержденным атеросклерозом каротидных артерий.* Пулированную сыворотку крови от 10 неврологических больных обрабатывали 20% буферным раствором ПВП-35 при объемном соотношении сыворотка: ПВП (1,0:0,84), инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре<sup>2</sup>. Агрегированные ммЛПНП осаждали центрифугированием при 9000 об/мин в течение 10 мин при 23°C, декантировали, осадок ммЛПНП растворяли в буфере без ПВП-35 и использовали в работе.

*Определение литической активности ммЛПНП.* Приготовленные ммЛПНП (10 мкл), как описано выше, добавляли к 50 мкл аутологичным, отмытым и стандартизованным ( $1,5 \times 10^8$  кл/мл) эритроцитам человека. Общий объем доводили буфером  $VBS^{2+}$  до 0,1 мл в 96-луночных иммунологических планшетах с плоским дном. Инкубировали в течение 48 ч при комнатной температуре, измеряли оптическую плотность на фотометре для ИФА при длине волны 620 нм. По калибровочному графику определяли степень лизиса. В качестве контроля использовали контроль эритроцитов на спонтанный лизис (50 мкл Е + 50 мкл  $VBS^{2+}$ ) и полный лизис (50 мкл Е + 50 мкл  $H_2O$ )<sup>3</sup>.

В работе исследовали сыворотки крови у 78 пациентов от 40 до 50 лет ( $43,8 \pm 3,2$ ) с нормальной, избыточной массой тела и ожирением (ИМТ от 19,7 до 45,3) — 37 мужчин (47%) и 41 женщина (53%). Все пациенты имели низкий сердечно-сосудистый

<sup>1</sup> Шойбонов Б.Б., Шойбонова Б.В. Метод определения атерогенности крови. Патент РФ № 2497116. Оpubл. 27.10.2013. Бюл. № 30.

<sup>2</sup> Шойбонов Б.Б., Баронец В.Ю., Толпыго С.М., Замолодчикова Т.С., Котов А.В., Кравченко М.А., и др. Метод выделения и количественного определения множественно-модифицированных липопротеинов низкой плотности. Патент РФ № 2592238. Оpubл. 20.07.2016. Бюл. № 20.

<sup>3</sup> Шойбонов Б.Б., Баронец В.Ю., Толпыго С.М., Замолодчикова Т.С., Котов А.В., Лагутина Л.В., Борголова Л.М. Способ определения литической активности множественно модифицированных липопротеинов низкой плотности. Патент РФ № 2577719. Оpubл. 20.03.2016. Бюл. №8.

риск (SCORE  $\leq 1\%$ ) и низкий кардиометаболический риск (CMDS 0-1). Участие в обследовании подтверждено письменным согласием и одобрено Этическим комитетом ФГБУ НМИЦ ПМ Минздрава России.

Забор крови осуществляли из локтевой вены после 14-часового голодания. Содержание общего холестерина (ОХС), триацилглицеридов (ТГ) в сыворотке крови определяли с помощью реактивов ЗАО «ЭКОлаб», (г. Электрогорск, Россия).

Ультразвуковое исследование сосудов проводилось одним специалистом на аппарате экспертного класса Toshiba Xario SSA 660A (Япония). Для оценки толщины комплекса интима-медиа (ТИМ) брахиоцефальных артерий использовался линейный датчик PLT-805 AT (8 МГц) в В-режиме. ТИМ оценивался с обеих сторон в 2 областях: по задней стенке дистальной трети общей сонной артерии (ОСА) перед бифуркацией на протяжении 10 мм, и по задней стенке ОСА в области бифуркации справа и слева. Для анализа брали усредненные значения 4 измерений.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакета «Statistica», Ver. 6,1 от компании «StatSoft» и программы Microsoft XL. Для оценки различия количественных показателей использовали дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента. Характеристика выборок представлены в виде средней  $\pm$  ошибка средней при нормальном распределении и в виде медианы (min-max) при отклонении от нормального распределения. Критерием статистической значимости полученных результатов считали величину  $p < 0,05$ .

*Определение патогенности ммЛПНП in vivo в тесте сосудистой дистонии.* Патогенность ммЛПНП *in vivo* исследовали по запатентованной методике<sup>4</sup>. Кратко: препарат ммЛПНП выделяли из сыворотки крови больных с атеросклерозом каротидных артерий, как описано выше. Проводили диализ против физиологического раствора. Эффективную дозу определяли в тесте связывания комплемента, как описано в работе<sup>5</sup>. Эксперименты выполняли на крысах-самцах Wistar массой 300-350 г ( $n = 8$ ). Степень развития сосудистой дистонии оценивали по гемодинамическим показателям (систолическое артериальное давление — САД, частота сердечных сокращений — ЧСС). С целью моделирования сосудистой дистонии вводили препарат ммЛПНП однократно внутривенно. Контрольным животным ( $n = 8$ )

вводили физиологический раствор. Непосредственно после введения препарата ммЛПНП начинали регистрацию АД и ЧСС в хвостовой артерии у ненаркотизированных, иммобилизованных в пластиковых пеналах крыс неинвазивным способом с использованием системы NIBP («AD Instruments», Australia) с интервалом 5-10 мин в течение 3 ч. Все эксперименты проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным.

### Результаты и обсуждение

*Определение оптимальной концентрации ПВП-35 для агрегации ммЛПНП в пулированной сыворотке крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями.* К 50 мкл пулированной сыворотки крови от 10 больных сердечно-сосудистыми заболеваниями добавляли 100-900 мкл буфера-1, тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин в 9 луночных кюветах биохимического анализатора FR-901 «Labsystem», Финляндия. После инкубации измеряли степень помутнения спектрофотометрически при длине волны 450 нм и рассчитывали содержание ммЛПНП по формуле:

$$\text{ммЛПНП (ЕД)} = [E_0 - E_K] \times 100,$$

где:

ммЛПНП — содержания множественно-модифицированных липопротеинов низкой плотности в единицах (ЕД);

$E_0$  — оптическая плотность опытной пробы, сыворотки с соответствующим количеством буфера, содержащего ПВП-35, при длине волны 450 нм, ед. опт. пл.;

$E_K$  — оптическая плотность контрольной пробы при длине волны 450 нм, сыворотки с соответствующим количеством буфера без ПВП-35, ед. опт.пл.;

100 — коэффициент перерасчета в условные единицы (ЕД).

Полученные результаты приведены в табл. 1.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, с увеличением концентрации ПВП-35 в инкубационной системе с 6,7% до 9,1% и при концентрации сыворотки от 33,3% до 9,1% соответственно наблюдается агрегация ммЛПНП и помутнение раствора пулированной сыворотки крови больных с атеросклерозом коронарных артерий. Максимальная агрегация ммЛПНП достигается при концентрациях ПВП-35 и сыворотки равной 9,1%, т.е. при объемном соотношении сыворотка : Буфер-1 (1:10). При дальнейшем

<sup>4</sup> Шойбонов Б.Б., Толпыго С.М., Певцова Е.И., Замолдчикова Т.С., Баронец В.Ю., Лагутина Л.В., Борголова Л.М., Котов А.В. Способ моделирования сосудистой дистонии у крыс по гипотензивному типу. Патент РФ № 2614521. Оpubл. 28.03.2017.

<sup>5</sup> Шойбонов Б.Б., Баронец В.Ю., Панченко Л.Ф., Собенин И.А., Пальцын А.А., Кубатиев А.А. Среда и способ определения множественно модифицированных липопротеинов сыворотки крови человека. Патент РФ № 2444014. Оpubл. 27.02.2012. Бюл. № 6.

увеличении концентрации ПВП-35 свыше 9,1% наблюдается относительное уменьшение агрегации ммЛПНП с одной стороны из-за эффекта разбавления тестируемой сыворотки при избытке буфера с ПВП-35, с другой стороны, отсутствие роста экстинкции свидетельствует о полной агрегации ммЛПНП.

*Определение специфичности агрегации ммЛПНП в зависимости от времени инкубации и концентрации ПВП-35 в пулированной сыворотке крови больных с коронарным атеросклерозом, подтвержденным инструментальными методами.* Для подтверждения специфической агрегации ммЛПНП в пулированной сыворотке крови больных атеросклерозом коронарных артерий в зависимости от концентраций ПВП-35 была исследована агрегация ммЛПНП во времени при условиях, описанных выше. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, максимальная агрегация ммЛПНП наблюдается

в течение первой минуты и завершается к 10 мин инкубации при концентрациях ПВП-35, равной 9,1%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при концентрации 9,1% препарата ПВП-35 или ниже в системе (от 6,7% до 9,1%), в пулированной сыворотке крови больных атеросклерозом коронарных артерий, агрегации нативных липопротеинов низкой и очень низкой плотности практически не наблюдается (отсутствие изменения оптической плотности смеси ПВП-сыворотка после 10 мин инкубации). При концентрации ПВП более 9,1% в пробе наблюдается незначительный рост экстинкции, обусловленный агрегацией нативных ЛПНП.

*Определение содержания холестерина, триглицеридов (ТГ) и общих белков в ПВП-преципитатах.* Для подтверждения наличия ммЛПНП в ПВП-преципитатах были проведены следующие эксперименты. Из 0,5 мл пулированной сыворотки больных ИБС и контрольных здоровых доноров были приготовлены ПВП-преципитаты в условиях

Таблица 1

Влияние ПВП-35 на агрегацию ммЛПНП в пулированной сыворотке крови больных с атеросклерозом коронарных сосудов в зависимости от концентрации

№	Сыв., мкл	10% ПВП-35, мкл	% ПВП-35 в системе	% сыв. в системе	A <sub>450</sub>	ммЛПНП, ЕД
1	50	100	6,7	33,3	0,176	17,6
2	50	200	8,0	20,0	0,298	29,8
3	50	300	8,6	14,3	0,426	42,6
4	50	400	8,9	11,1	0,569	56,9
5	50	500	<b>9,1</b>	9,1	<b>0,58</b>	<b>58,0</b>
6	50	600	9,2	7,7	0,513	51,3
7	50	700	9,3	6,7	0,501	50,1
8	50	800	9,4	5,9	0,356	35,6
9	50	900	9,5	5,3	0,358	35,8

Таблица 2

Агрегация ммЛПНП в зависимости от времени инкубации и концентрации ПВП-35 в пулированной сыворотке крови больных с коронарным атеросклерозом

№	Сыв., мкл	10% ПВП-35, мкл	% ПВП-35 в системе	A <sub>450</sub>				
				1 мин	10 мин	20 мин	30 мин	60 мин
1	50	100	6,7	0,133	0,176	0,170	0,169	0,170
2	50	200	8,0	0,184	0,298	0,22	0,218	0,214
3	50	300	8,6	0,236	0,426	0,295	0,285	0,281
4	50	400	8,9	0,313	0,569	0,428	0,411	0,411
5	50	500	9,1	0,386	<b>0,58</b>	<b>0,584</b>	<b>0,579</b>	<b>0,593</b>
6	50	600	9,2	0,369	0,513	0,63	0,638	0,68
7	50	700	9,3	0,248	0,501	0,707	0,687	0,83
8	50	800	9,4	0,246	0,356	0,600	0,730	0,846
9	50	900	9,5	0,180	0,358	0,575	0,680	0,816

9,1% ПВП-35. Агрегированные ммЛПНП осаждали путем центрифугирования при 6000 об/мин в течение 10 мин при 23°C. Супернатант тщательно декантировали, ПВП-преципитат два раза отмывали буфером, содержащим 9,1% ПВП-35 и ресуспендировали в 0,5 мл 0,01М Трис-НСl-буфера, рН 7,4, содержащего 0,15 М NaCl. В полученных ПВП-преципитатах определяли содержание холестерина, ТГ и общих белков с использованием реактивов фирмы «ЭКОлаб», Россия. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, в ПВП-преципитате пулированной сыворотки больных ИБС содержание холестерина в 5,3 раз, а ТГ — в 16 раз больше, чем в ПВП-преципитате из сыворотки здоровых доноров. Содержание общего белка в 1,3 раза выше в ПВП-преципитате больных.

Таким образом, наличие холестерина, ТГ и белка в ПВП-преципитатах из сывороток свидетельствует о липопротеиновой природе агрегатов, образующихся в присутствии 9,1% ПВП-35. Повышенный уровень ПВП-преципитата, содержащего ммЛПНП у больных с ИБС, подтверждает патологическую роль ммЛПНП при атеросклеротическом процессе.

*Определение связывания комплемента морской свинки преципитатами ммЛПНП в зависимости от концентрации.* К 10—160 мкл раствора ПВП-преципитата (4,3 мг/мл по белку), приготовленного из пулированной сыворотки больных с ИБС и разбавленного в соотношении 1:99 буфером VBS<sup>2+</sup>, добавляли 20 мкл раствора, разбавленного 1:19, комплемента морской свинки. Общий объем доводили до 0,3 мл буфером VBS<sup>2+</sup> и инкубировали 20 мин при 37°C. После предварительной инкубации добавляли 200 мкл стандартизированных эритроци-

тов барана (1,5 × 10<sup>8</sup> кл/мл), сенсibilизированных антителами кролика (ЕА). Далее инкубировали 30 мин при 37°C. После инкубации в каждую пробу добавляли по 2,5 мл холодного раствора 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли величину А<sub>405</sub> супернатанта. Контрольная проба не содержала ПВП-преципитата. Пониженный гемолиз в опытных пробах по сравнению с контролем свидетельствовал о наличии связывания комплемента. Степень лизиса эритроцитов (У) определяли по формуле:

$$У (\%) = [(X - R) / (H - R) \times 100],$$

где H, R и X — величины оптической плотности А<sub>412</sub> в гемолитических системах контрольной пробы, в контроле спонтанного лизиса ЕА и в опытной пробе соответственно. Степень связывания комплемента (ССК) определяли по формуле:

$$ССК (\%) = 100 - У$$

Данные о степени связывания комплемента при разных концентрациях ПВП-преципитата приведены в табл. 4.

Как видно из данных, представленных в табл. 4, ммЛПНП, преципитированные в растворе 9,1% ПВП-35, обладают комплемент-связывающей способностью, причем эффект является дозозависимым.

*Определение литической активности ммЛПНП.* Проведено исследование литической активности 6 проб ммЛПНП, приготовленных из индивидуальных сывороток неврологических больных, с использованием в качестве мишеней аутологичные, отмывтые и стандартизованные эритроциты. Методика подробно описана в материалах и методах. Полученные результаты представлены в табл. 5.

Таблица 3

Содержание холестерина, ТГ и общих белков в ПВП-преципитатах, приготовленных из сыворотки крови больных ИБС и здоровых доноров

	Холестерин, мг/дл	ТГ, мкМ/л	Белок, мг/мл
ПВП-преципитат из сыворотки больных ИБС	24,6	117	4,3
	25,1	117	4,5
	25,2	116	4,2
М ± m	25,0 ± 0,3	116,7 ± 0,6	4,3 ± 0,2
ПВП-преципитат из сыворотки доноров	5,0	7	3,4
	4,2	10	2,9
	4,5	5	3,2
М ± m	4,7 ± 0,4	7,3 ± 2,5	3,2 ± 0,3

Таблица 4

Степень связывания комплемента ммЛПНП в ПВП-преципитате в зависимости от концентрации

ПВП-преципитат, мкл	0	10	20	40	80	160
ССК, %	0	27	57	83	97	100



Как видно из данных, представленных в табл. 5, в пробах 1—5 разброс оптической плотности после 48-часовой инкубации колебался от 0,8% до 5,3%. Только в пробе №6 разброс составил 11%. При определении степени лизиса по калибровочному графику максимальная ошибка в пробе №6 составила  $\pm 7,9\%$ . Таким образом, ошибка по 3 точкам не превышает 10%, поэтому наличие литического эффекта ммЛПНП можно констатировать при лизисе более 10%.

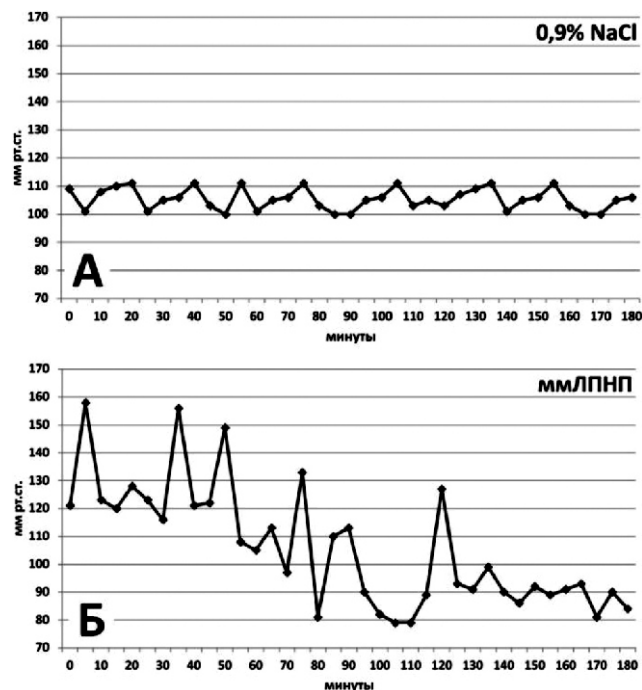
Выявление литического действия ммЛПНП, приготовленных из сыворотки крови больных с атероск-

лерозом каротидных артерий, и лизис собственных эритроцитов свидетельствует о высокой патогенности ммЛПНП и об отсутствии ингибирующих факторов в пробе в виде альбумина или липопротеинов высокой плотности, которые были представлены в работе Suzuki A., Kawakami M. (1983). Авторами было показано, что основными факторами, оказывающими литическое действие на эритроциты мыши, являются фосфолипаза A2 (ФЛА2) и лизофосфатидилхолин (ЛФХ), который является продуктом гидролиза

Таблица 5

Литическая активность ммЛПНП, приготовленных из сыворотки крови больных с инструментально подтвержденным атеросклерозом каротидных артерий

ммЛПНП	n	A <sub>620</sub>	Степень лизиса, %
ммЛПНП(1)	1	0,18	73,0
	2	0,182	72,5
	3	0,179	75
	M $\pm$ n	0,1803 $\pm$ 0,0015	<b>73,5 <math>\pm</math> 1,3</b>
ммЛПНП(2)	1	0,214	63,0
	2	0,215	63,0
	3	0,223	59,0
	M $\pm$ n	0,2173 $\pm$ 0,049	<b>61,7 <math>\pm</math> 2,3</b>
ммЛПНП(3)	1	0,248	54,0
	2	0,248	54,0
	3	0,268	47,0
	M $\pm$ n	0,2547 $\pm$ 0,0115	<b>51,7 <math>\pm</math> 4,04</b>
ммЛПНП(4)	1	0,225	60,0
	2	0,206	65,0
	3	0,227	59,0
	M $\pm$ n	0,2193 $\pm$ 0,0116	<b>61,3 <math>\pm</math> 3,2</b>
ммЛПНП(5)	1	0,107	96,0
	2	0,113	95,0
	3	0,117	93,0
	M $\pm$ n	0,1123 $\pm$ 0,005	<b>94,7 <math>\pm</math> 1,53</b>
ммЛПНП(6)	1	0,183	72,0
	2	0,154	81,0
	3	0,191	70,0
	M $\pm$ n	0,176 $\pm$ 0,0195	<b>74,3 <math>\pm</math> 5,86</b>
Контроль, 0% лизиса	1	0,421	
	2	0,426	
	3	0,42	
	M $\pm$ n	0,4223 $\pm$ 0,0032	<b>0% лизиса</b>
Контроль, 100% лизиса	1	0,098	
	2	0,096	
	3	0,102	
	M $\pm$ n	0,0987 $\pm$ 0,0031	<b>100% лизис</b>



Типичная динамика САД в хвостовой артерии крысы при внутрибрюшинном введении: А – физиологического раствора; Б – ммЛПНП.

сложноэфирной связи во втором положении фосфатидилхолина и превращении его в лФХ. [14].

**Патогенность ммЛПНП in vivo в тесте сосудистой дистонии.** Однократное внутрибрюшинное введение ммЛПНП в дозе 200 мкг по белку вызывает у всех крыс отчетливую сосудистую дистонию в виде резких колебаний САД уже в первые 5–10 мин после инъекции. При этом наблюдается чередование гипер- и гипотензии с перепадами значений САД от исходных на 50–60 мм рт. ст., а у отдельных животных на 80–90 мм рт. ст. К 70–100 мин регистрации у всех крыс колебания САД сглаживались и данный показатель стабилизировался на уровне 80–85 мм рт. ст. Типичные примеры динамики САД

после внутрибрюшинного введения ммЛПНП и физ.раствора приведены на рисунке.

Изменения динамики ЧСС после введения ммЛПНП были выражены в меньшей степени и не коррелировали с изменениями САД. При оценке динамики показателей САД после введения ммЛПНП у животных отмечается тенденция к гипотензии, которая начинает проявляться уже на 20-й — 30-й мин, а после 60-й мин данные изменения становятся устойчивыми и сохраняются до конца эксперимента. При этом статистически значимых изменений ЧСС выявлено не было. Введение физиологического раствора у контрольных животных не вызывало существенных сдвигов гемодинамических показателей.

Таким образом, полученные данные об изменении гемодинамических показателей после однократного внутрибрюшинного введения ммЛПНП свидетельствуют о том, что патогенное воздействие ммЛПНП *in vivo* реализуется через острую сосудистую дистонию по гипотензивному типу.

**Сравнительные исследования содержания ммЛПНП в сыворотке крови и толщины интима-медиа сонных артерий.** Учитывая мощный атерогенный потенциал ммЛПНП, было проведено исследование по взаимосвязи уровня ммЛПНП с показателями субклинического атеросклероза по данным ультразвукового сканирования сонных артерий. Исследование содержания ммЛПНП предлагаемым способом в сыворотке крови было проведено у 78 пациентов от 40 до 50 лет ( $43,8 \pm 3,2$ ) с нормальной, избыточной массой тела и ожирением (ИМТ от 19,7 до 45,3) — 37 мужчин (47%) и 41 женщина (53%). Все пациенты имели низкий сердечно-сосудистый риск (SCORE  $\leq 1\%$ ) и низкий кардиометаболический риск (CMDS 0-1). Уровень содержания ммЛПНП определяли по описанной выше методике. Методом ранговой корреляции по Спирмену был проведен анализ взаимосвязи показателя ТИМ с различными фракциями липидного спектра крови. Полученные результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

Корреляционная взаимосвязь ТИМ сонных артерий с показателями липидного профиля крови

Показатели	r	p
ХС	0,2415	0,032
ТГ	0,2757	0,0139
ХС-ЛПВП	-0,3561	0,0013
ХС-ЛПНП	0,3282	0,0032
ХС-ЛПОНП	0,2309	0,0406
ммЛПНП	0,4169	0,0001

Сокращения: р — уровень значимости, r — коэффициент корреляции Спирмена, ХС — общий холестерин, ТГ — триглицериды, ХС-ЛПВП — холестерин липопротеинов высокой плотности, ХС-ЛПНП — холестерин липопротеинов низкой плотности, ХС-ЛПОНП — холестерин липопротеинов очень низкой плотности.

Как видно из данных корреляционного анализа, представленных в табл. 6, для ТИМ сонных артерий наиболее значимым является уровень ммЛПНП. Расположение ХС-ЛПНП ( $r = 0,3282$ ,  $p < 0,0032$ ) на втором месте по значимости увеличения ТИМ свидетельствует о том, что в составе пула ЛПНП присутствуют данные атерогенные ммЛПНП.

Ранее нами был разработан оригинальный скрининг-тест для определения ммЛПНП и проведены данные исследования у лиц с избыточной массой тела и в контрольной группе здоровых доноров. Для сравнительных исследований были использованы ИФА тест-системы определения МДА-ЛПНП и антител к охЛПНП (оба — производства «Biomedica», Австрия) и доказано, что наиболее информативным в плане диагностики субклинического атеросклероза является разработанный скрининг-тест для определения ммЛПНП. Учитывая исходную гетерогенность нативных ЛПНП, определение пула модифицированных липопротеинов низкой плотности в нашем тесте — как множественно-модифицированные липопротеины низкой плотности — оказалось более информативным, как показали исследования ТИМ сонных артерий при ультразвуковом сканировании.

Проведенные исследования патогенности выделенных ммЛПНП в тестах связывания системы комплемента *in vitro*, а также в прямом литическом тесте с использованием аутологических эритроцитов свидетельствуют о высокой патогенности данного маркера. Выделение и исследование ммЛПНП в тесте сосудистой дистонии позволяют в дальнейшем заняться моделированием и лечением сосудистой дистонии на модельных животных. Полученные результаты являются оригинальными. В доступной литературе нами не обнаружены подобные эффекты ммЛПНП, приготовленных из человеческой крови.

Таким образом, разработанный скрининг-тест для определения ммЛПНП является эффективным для ранней диагностики субклинического атеросклероза. Предлагаемый тест включает всего 2 операции: смешивание сыворотки крови человека с раствором ПВП-35 и регистрацию мутности на фотометрах для ИФА. Для приготовления среды необходимы широко распространенные реактивы: ПВП, NaCl и трис-HCl. Способ является высокопроизводительным в отличие от ИФА тестов (10 мин на 1 анализ, одномоментно для скрининга возможно определение 96 проб сыворотки, тест легко может быть адаптирован на биохимических автоматических анализаторах после разработки стабильного калибратора для ммЛПНП. Использование простого и быстрого в осуществлении способа определения атерогенности крови позволяет проводить скрининговые обследования с целью выявления наличия атеросклеротического

процесса на доклинической стадии и при диспансеризации. Формирование группы риска по атеросклерозу (повышенный уровень атерогенных ммЛПНП) позволит установить индивидуальную причину патологического процесса и проводить этиотропную терапию. Исследования уровня содержания ммЛПНП в крови больных с атеросклерозом в условиях клиники позволит контролировать эффективность проводимой терапии.

## Литература

### (п.п. 1—8; 10—12; 14 см. References)

9. Кремнева Л.В., Шалаева С.В. Модифицированные липопротеины низкой плотности их атерогенная и провоспалительная активность, роль в патогенезе острого коронарного синдрома. *Российский кардиологический журнал*. 2004; 2(46): 70-75.
13. Шойбонов Б.Б., Кравченко М.Ф., Баронец В.Ю., Толпыго С.М., Костырева М.В., Шабалина А.А. Определение атерогенности иммунных комплексов, содержащих модифицированные липопротеины, в тесте связывания комплемента. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; №4: 133-138.

## References

1. Linton M.F., Yancey P.G., Davies S.S., Jerome W.G.J., Linton E.F., Vickers K.C. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In: De Groot, L.J., Beck-Peccoz, P., Chrousos, G., et al. (eds). *Endotext*. South Dartmouth (MA). 2000.
2. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Mihaylova B., Emberson J., Blackwell L., Keech A., Simes J. et al. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet*. 2012; 380: 581-590.
3. Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K., Brown M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76: 333-337.
4. Steinbrecher U.P., Parthasarathy S., Leake D.S., Witztum J.L., Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:3883-3887.
5. Stancel N., Chen C.C., Ke L.Y., Chu C.S., Lu J., Sawamura T., Chen C.H. Interplay between CRP, Atherogenic LDL, and LOX-1 and Its Potential Role in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Chem*. 2016; 62(2): 320-327.
6. Yoshimoto R., Fujita Y., Kakino A., Iwamoto S., Takaya T., Sawamura T. The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2011; 25: 379-391.
7. Tsimikas S., Mallat Z., Talmud P.J., Kastelein J.J., Wareham N.J., Sandhu M.S. et al. Oxidation-specific biomarkers, lipoprotein(a), and risk of fatal and nonfatal coronary events. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 56: 946-955.
8. Gomez M., Vila J., Elosua R., Molina L., Bruguera J., Sala J. et al. Relationship of lipid oxidation with subclinical atherosclerosis and 10-year coronary events in general population. *Atherosclerosis*. 2014; 232: 134-140.

9. Kremneva L.V., Shalaev S.V. Modified lipoproteins of low density: atherogenic and pro-inflammatory activity, role in pathogenesis of acute coronary syndrome. *Russian Cardiological Journal*. 2004; 2(46): 70-75. (in Russian).

10. Mori Y., Itoh Y., Komiya H., Tajima N. Association between postprandial remnant-like particle triglyceride (RLP-TG) levels and carotid intima-media thickness (IMT) in Japanese patients with type 2 diabetes: assessment by meal tolerance tests (MTT). *Endocrine*. 2005; 28(2): 57-63.

11. Bae J.H., Kim W.S., Lee M.S., Kim K.S., Park J.B., Youn H.J. The changes of individual carotid artery wall layer by aging and carotid intima-media thickness value for high risk. *Cardiovasc Ther*. 2016; 34(6): P. 397-403.

12. Ishigaki Y., Katagiri H., Gao J., Yamada T., Imai J., Uno K. et al. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation*. 2008; 118: 75-83.

13. Shoibonov B.B., Kravchenko M.F., Baronets V.Yu., Tolpygo S.M., Kostyreva M.V., Shabalina A.A. et al. Determination of the atherogenicity of immune complexes containing modified lipoproteins in the complement fixation test. *Patol. fiziol. and experimental. therapy*. 2014; (4): 133-138 (in Russian)

14. Suzuki A., Kawakami M. A hemolytic lipoprotein containing lyso-phosphatidylcholine produced in incubated mouse plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1983; 753: 236-243.

### Сведения об авторах:

*Шойбонов Батожаб Батожаргалович*, канд. химич. наук, вед. науч. сотр. отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России;

*Драпкина Оксана Михайловна*, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, директор ФГБУ НМИЦ ПМ Минздрава России;

*Елиашевич Софья Олеговна*, лаборант-исследователь отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения НМИЦ ПМ;

*Лавренова Евгения Александровна*, лаборант-исследователь отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения НМИЦ ПМ;

*Федорович Андрей Александрович*, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения НМИЦ ПМ;

*Сухина Наталья Юрьевна*, канд. мед. наук, врач ультразвуковой диагностики «НМИЦ ПМ»;

*Толпыго Светлана Михайловна*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологии мотивации ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина»;

*Григорьева Диана Викторовна*, канд. мед. наук, науч. сотр. поликлинического отделения ГБУЗ МО МОНИИАГ Минздрава России;

*Баронец Валерия Юрьевна*, науч. сотр. лаб. биохимии «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;

*Панченко Леонид Федорович*, доктор мед. наук, акад. РАН, зав. лаб. молекулярных основ болезней зависимости ФГБНУ НИИ ОПП, гл. науч. сотр. лаб. биохимии «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;

*Кубатиев Аслан Амирханович*, доктор мед. наук, академик РАН, науч. руководитель ФГБНУ НИИ ОПП.

© Коллектив авторов, 2018  
УДК 616-092

Алчинова И.Б.<sup>1,2</sup>, Полякова М.В.<sup>1</sup>, Яковенко Е.Н.<sup>1</sup>, Медведева Ю.С.<sup>1</sup>, Сабурин И.Н.<sup>1</sup>,  
Карганов М.Ю.<sup>1</sup>

## Введение внеклеточных везикул из клеток костного мозга способствует восстановлению физиологических параметров облученных мышей

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт космической медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России. 115682, Москва, Россия, Ореховый бульвар, д. 28

Внеклеточные везикулы, секретируемые мультипотентными мезенхимными стромальными клетками костного мозга человека, внутривенно ввели мышам через 1 неделю после облучения в сублетальной дозе. Через 3 и 6 недель после начала эксперимента оценивали изменения физиологических параметров, спровоцированные облучением и проводимой терапией. Применяемые методы оценки: измерение массы тела, лазерная корреляционная спектроскопия, подсчет лейкоцитарной формулы крови, проточная лазерная цитометрия, гистологическое исследование внутренних органов. Результаты исследования показали, что однократная внутривенная инъекция изучаемых внеклеточных везикул облученным животным способствует снижению выраженности изменений, вызванных действием гамма-излучения в высокой дозе.

**Ключевые слова:** внеклеточные везикулы, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, гамма-облучение.

**Для цитирования:** Алчинова И.Б., Полякова М.В., Яковенко Е.Н., Медведева Ю.С., Сабурин И.Н., Карганов М.Ю. Введение внеклеточных везикул из клеток костного мозга способствует восстановлению физиологических параметров облученных мышей. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 237—240. DOI:

**Для корреспонденции:** Полякова Маргарита Вячеславовна, e-mail: nedzumy@bk.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 23.08.2018

Alchinova I.B.<sup>1,2</sup>, Polyakova M.V.<sup>1</sup>, Yakovenko E.N.<sup>1</sup>, Medvedeva Yu.S.<sup>1</sup>, Saburina I.N.<sup>1</sup>,  
Karganov M.Yu.<sup>1</sup>

## Administration of extracellular vesicles from bone marrow cells promotes recovery of physiological parameters in irradiated mice

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Research Institute for Space Medicine of the Federal Scientific and Clinical Center of Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the Federal Biomedical Agency of Russia, Orekhovyi Blvd. 28, Moscow 115682, Russian Federation

Extracellular vesicles secreted by human multipotent mesenchymal stromal cells were injected intravenously into mice one week after irradiation at a sublethal dose. At 3 and 6 weeks after the start of the experiment, changes in physiological parameters provoked by the irradiation and therapy were evaluated. The following methods of evaluation were used: measurement of body weight, laser correlation spectroscopy, white blood cell count, laser flow cytometry, histological examination of internal organs. The study showed that a single intravenous injection of the analyzed extracellular vesicles into irradiated animals helped to reduce severity of the changes caused by a high dose of gamma radiation.

**Keywords:** extracellular vesicles, multipotent mesenchymal stromal cells, gamma-irradiation.

**For citation:** Alchinova I.B., Polyakova M.V., Yakovenko E.N., Medvedeva Yu.S., Saburina I.N., Karganov M.Yu. [Administration of extracellular vesicles from bone marrow cells promotes recovery of physiological parameters in irradiated mice]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 237—240. (in Russian). DOI:

**For correspondence:** Polyakova Margarita Vyacheslavovna, e-mail: nedzумы@bk.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

**Received** 23.08.2018

## Введение

Воздействие ионизирующего излучения на организм в высоких дозах приводит к многочисленным изменениям на всех уровнях системной организации: нарушению жизнедеятельности клеток, истощению клеточного запаса, нарушению функций органов и систем, и к развитию многих патологических состояний, возможным итогом которых может являться смерть организма. Перспективным направлением исследований является применение клеточных технологий в качестве возможных способов терапии последствий действия излучения. Ранее мы показали, что внутривенная инъекция мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ) может быть достаточно эффективна для минимизации пагубных изменений, вызванных облучением, в организме животного [1]. Неясным оставался механизм реализации такого эффекта исследуемых клеток. В последнее время вызывающим интерес объектом для изучения механизмов межклеточной коммуникации являются внеклеточные везикулы (ВВ). Это группа мембранных образований размерами от 30 до 1000 нм, которые секретируются практически всеми клетками организма и способны переносить в себе различные биохимические сигналы в виде микроРНК, биологически активных белков и липидов, малых последовательностей ДНК [2, 3]. Тот факт, что биохимический состав переносимого содержимого ВВ в некоторой степени отражает состав секретирующей их клетки, позволяет рассматривать эти микрочастицы в роли посредников в реализации эффектов изучаемых клеток.

Целью данной работы было изучить влияние внутривенного введения ВВ, продуцируемых ММСК КМ, на облученных животных.

## Методика

В эксперименте было задействовано 44 самца мышей линии С57bl/6J (филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России). Животные были поделены на три группы: 11 мышей составили контрольную группу животных, 22 мыши были облучены до сублетальной дозы 7,5 Гр на цезиевом облучателе Панорама (ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА им. К.И. Скрябина) с интенсивностью 5,4 Р/мин — из

них сформировали группу «облучение». Группа «опыт» состояла из 11 животных, подвергнутых воздействию радиации в той же дозе одновременно с группой «облучение», и которым через неделю после облучения в боковую хвостовую вену ввели суспензию внеклеточных везикул, выделенных из культуральной среды от ММСК КМ человека второго пассажа в объеме 100 мкл на животное.

Оценку изменений, спровоцированных облучением и проводимой терапией, проводили на 3 и 6 неделях эксперимента. Чтобы оценить повреждения, вызванные облучением, и реакции организма на проводимую терапию проводили комплексную оценку состояния животных на разных уровнях системной организации.

Раз в неделю животных взвешивали после двухчасового лишения корма, чтобы оценить изменение прироста массы тела. Через 3 и 6 недель после облучения часть животных забивали с дальнейшим взятием печени, поджелудочной железы и селезенки для характеристики и оценки реакций на органном уровне. Для этого были выделены степени тяжести повреждения, где 0 степень соответствовала неизменной ткани, а все следующие степени описывали морфологические изменения исследуемых структур, характерные для разных стадий патологического процесса [4]. Кроме того, для исследования брали образцы сыворотки крови животных для оценки ее субфракционного состава методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) [5], подсчета лейкоцитарной формулы крови с использованием комбинированной окраски по Паппенгейму и оценки субпопуляционного состава лимфоцитов методом проточной лазерной цитометрии (применяли антитела с тройной меткой).

Выделение и характеристику внеклеточных везикул проводили из культуральной жидкости, полученной от стандартной культуры ММСК костного мозга человека 2 пассажа, по протоколам, описанным нами ранее [6]. Результаты анализа траекторий наночастиц свидетельствовали о наличии в исследуемой суспензии частиц сферической формы, теоретический гидродинамический радиус которых составил в среднем 86 нм. Концентрация исследуемых частиц в полученной суспензии составила  $6,6 \times 10^{10}$  частиц/мл.

Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабора-

торной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.

### Результаты и обсуждение

Через 3 недели после облучения величина изменения прироста массы тела не отличалась для трех исследуемых групп животных. В крови животных группы «облучение» выявили значимое увеличение содержания сегментоядерных нейтрофилов по сравнению с группами «контроль» и «опыт» (на 15,6% и 12,0% соответственно,  $p < 0,05$  по критерию Краскела—Уоллиса), что может быть обусловлено воспалительными процессами, развивающимися в организме под действием радиации. Результаты проточной лазерной цитометрии показали на 21% значимо более низкое содержание В-лимфоцитов в крови мышей группы «облучение» по сравнению с группой «опыт» ( $p < 0,05$  по критерию Краскела—Уоллиса), что объясняется уничтожением предшественников этих клеток в костном мозге животных под действием ионизирующего излучения.

На 3-й неделе при исследовании методом ЛКС в сыворотке крови группы «облучение» наблюдали увеличение содержания частиц размером до 15,28 нм ( $p < 0,05$  по критерию Манн—Уитни), в то время как группы «контроль» и «опыт» не различались между собой. Известно, что вызванные облучением процессы деструкции тканей, разрушение клеток приводят к увеличению в крови содержания внеклеточной ДНК [7]. Увеличение вклада в светорассеяние мелких частиц при анализе сыворотки крови методом ЛКС является отражением этих процессов.

Исследование морфологических изменений в тканях облученных животных показало, что в группе «опыт» по сравнению с группой «облучение» чаще встречается более тяжелая степень повреждения селезенки и поджелудочной железы, тогда как в тканях печени животных группы «опыт» самые тяжелые повреждения наблюдали, наоборот, реже.

После 6 недель эксперимента прирост массы тела животных группы «опыт» не отличался от показателей группы «контроль». По клеточным показателям крови в этих двух группах различий также не выявили, в крови группы «облучение» на шестой неделе было повышено содержание палочкоядерных нейтрофилов.

Результаты ЛКС свидетельствовали о значимом увеличении в субфракционном составе сыворотки крови группы «опыт» мелких частиц (6,25—15,28 нм) по сравнению с двумя другими исследуемыми группами. Способность ВВ беспрепятственно распределяться по тканям организма [2] и передавать переносимые сигналы не только в клетку-реципиент, но и в межклеточное пространство, возможно, является

причиной длительного увеличения вклада в светорассеяние мелких частиц.

Гистологические показатели группы «опыт» по сравнению с ситуацией на 3-й неделе эксперимента улучшились, тяжелые степени повреждения встречались реже. Сходную картину наблюдали и в группе «облучение», однако в опытной группе чаще встречались животные с нормальными тканями селезенки и поджелудочной железы. Кроме того на 6 неделе эксперимента гистологическое исследование селезенки показало на 49% значимо меньшее количество животных с 1 степенью повреждения по сравнению с группой «облучение» ( $p < 0,05$  по критерию Фишера). Вероятно, что эффективность воздействия ВВ на тот или иной орган или систему определяется восприятием клеток поврежденного органа сигналов или рецепторов ВВ, которые, в свою очередь, во многом обусловлены секреторирующей их клеткой.

### Заключение

Таким образом, в нашей работе было показано, что внутривенная инъекция ВВ, продуцируемых ММСК КМ человека, облученным животным способствует снижению выраженности изменений, вызванных действием гамма-излучения в высокой дозе. Результаты нашей работы согласуются с данными других авторов. Так, в исследовании Wen et al. [3] было показано, что ВВ от ММСК КМ человека снижают радиационное повреждение костного мозга облученных животных, ускоряя пролиферацию и дифференциацию гемопоэтических стволовых клеток, снижая уровень апоптоза и повреждения ДНК. Защита клеток от апоптоза, по мнению авторов, может быть опосредована везикулярной стимуляцией повышенной экспрессии некоторых микроРНК в клетках костного мозга (miR210-5p, miR155-5p, miR106b-3p). Авторы показали, что такой потенциал свойственен именно везикулам мезенхимных мультипотентных стромальных клеток. Группа немецких исследователей также изучала роль внеклеточных везикул костного мозга в восстановлении гемопоэза при тотальном облучении экспериментальных животных [2]. Ими было показано, что введенные ВВ от мышинных ММСК КМ таргетно связывались с гемопоэтическими стволовыми клетками, обеспечивая их защиту и быстрое восстановление системы гемопоэза.

Тем не менее, в данных работах авторы основное внимание уделяли восстановлению гемопоэтической системы организма. Однако мы считаем, что в исследованиях и разработке терапии, направленной на нивелирование последствий острого облучения целого организма, необходимо также оценивать реакции

систем и эффективность применяемой терапии на всех уровнях системной организации.

### Литература (п.п. 1—4 см. References)

5. Карганов М.Ю., Алчинова И.Б., Яковенко Е.Н., Ковалева О.И., Медведева Ю.С., Вялкина М.В. Применение метода лазерной корреляционной спектроскопии в лабораторной медицине. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(9): 533-534. DOI:10.18821/0869-2084-2016-61-9

6. Алчинова И.Б., Полякова М.В., Сабурова И.Н., Карганов М.Ю. Размеры внеклеточных везикул, секретируемых разными видами стволовых клеток. *Патогенез*. 2017; 15(4): 38-42. DOI: 10.25557/GM.2018.4.9747

7. Абдуллаев С.А., Антипова В.Н., Газиев А.И. Содержание внеклеточной митохондриальной ДНК с мутациями резко повышено в плазме крови облученных мышей. *Молекулярная биология*. 2009; 43(6): 1063-1069.

### References

1. Vyalkina M.V., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Medvedeva Yu.S., Saburina I.N., Karganov M.Yu. Long-Term Effects of Stem Cells on Total-Body Irradiated Mice. *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series*, 2017; 784(1): 012015. DOI: 10.1088/1742-6596/784/1/012015.

2. Schoefinius J.-S., Brunswig-Spickenheier B., Speiser T., Krebs S., Just U., Lange C. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Provide Long-Term Sur-

vival After Total Body Irradiation Without Additional Hematopoietic Stem Cell Support. *Stem Cells*. 2017 35(12): 2379-2389. DOI: 10.1002/stem.2716.

3. Wen S., Dooner M., Cheng Y., Papa E., Del Tatto M., Pereira M., Deng Y, Goldberg L, Aliotta J, Chatterjee D, Stewart C, Carpanetto A, Collino F, Bruno S, Camussi G, Quesenberry P. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia*. 2016; 30(11): 2221-2231. DOI:10.1038/leu.2016.107

4. Alchinova I., Arkhipova E., Medvedeva Yu., Cherepov A., Antipov A., Lysenko N., Noskin L., Karganov M. The complex of tests for the quantitative evaluation of the effects of radiation on laboratory animals. *American Journal of Life Sciences*. 2015; 3(1-2): 5-12. DOI:10.11648/j.ajls.s.20150303.12

5. Karganov M.Yu., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Kovaleva O.I., Medvedeva Yu.S., Vyalkina M.V. [Use of laser correlation spectroscopy in laboratory medicine]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]* 2016; 61(9): 533-534. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-9 (In Russian)

6. Alchinova I.B., Polyakova M.V., Saburina I.N., Karganov M.Yu. [The size of extracellular vesicles secreted by different types of stem cells]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2017; 15(2): 38-42. DOI: 10.25557/GM.2018.4.9747 (In Russian)

7. Abdullaev S.A., Antipova V.N., Gaziev A.I. [Extracellular mutant mitochondrial DNA content is dramatically elevated in the blood plasma of irradiated mice]. *Молекулярная биология [Molecular biology]*. 2009; 43(6): 1063-1069. (In Russian)

### Сведения об авторах:

Алчинова Ирина Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП; зав. лаб. космической патофизиологии «НИИ космической медицины» ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России;

Полякова Маргарита Вячеславовна, мл. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Яковенко Елена Николаевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ;

Медведева Юлия Сергеевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Сабурова Ирина Николаевна, доктор биол. наук, зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП;

Карганов Михаил Юрьевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП.



Исмаилова А.М.<sup>1</sup>, Туховская Е.А.<sup>1</sup>, Лобанов А.В.<sup>1,2</sup>, Шайхутдинова Э.Р.<sup>1</sup>, Мурашев А.Н.<sup>1</sup>

## Исследование влияния предварительного перорального введения дипиридамола на мозговой кровоток и артериальное давление крыс SD в процессе глобальной ишемии головного мозга

<sup>1</sup> Филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук.

142290, Московская область, Пушкино, Россия, пр. Науки, д. 6

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

В исследовании изучали влияние дипиридамола (курантила) при введении в течение 3 дней перед операцией на показатели артериального давления (АД) и мозгового кровотока в период глобальной ишемии головного мозга с последующей реперфузией у крыс SD. Глобальную ишемию моделировали путем билатеральной окклюзии сонных артерий с одновременным взятием крови в объеме 30% от объема циркулирующей крови (ОЦК). Показатели АД и кровотока регистрировали на протяжении всей операции. **Результаты.** Динамика изменения АД в ходе эксперимента не различалась между группами «курантил» и «носитель». Падение мозгового кровотока в ответ на окклюзию сонных артерий в группе «курантил» было статистически незначимым, в отличие от группы «носитель» (разница между группами около 10%). После инициирования гиповолемии путем взятия крови, падение кровотока также имело тенденцию к 10% различию между группами «курантил» и «носитель». При реперфузии разница между значением уровня кровотока до и после реперфузии в группе «носитель» была статистически значимой ( $p = 0,001$ ). В группе «курантил» разница между уровнем кровотока при окклюзии и реперфузии также была статистически значимой, но менее выраженной, чем в группе «носитель» ( $p = 0,040$ ), то есть колебания мозгового кровотока при критических воздействиях, таких как окклюзия, гиповолемия и реперфузия были более ярко выражены в группе «носитель». Таким образом, курантил в некоторой степени стабилизировал мозговой кровоток. Описанные эффекты курантила следует считать защитными (нейропротекторными), так как наибольшие повреждения тканей головного мозга развиваются вследствие резких колебаний уровня мозгового кровотока в процессе острых сосудистых катастроф. Стабилизация мозгового кровотока курантилом говорит о перспективности применения данного препарата для коррекции ишемических состояний головного мозга.

**Ключевые слова:** инсульт; дипиридамола; курантил; крысы; глобальная ишемия.

**Для цитирования:** Исмаилова А.М., Туховская Е.А., Лобанов А.В., Шайхутдинова Э.Р., Мурашев А.Н. Исследование влияния предварительного перорального введения дипиридамола на мозговой кровоток и артериальное давление крыс SD в процессе глобальной ишемии головного мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 241—245.

DOI:

**Для корреспонденции:** Елена Александровна Туховская, e-mail: elentuk@mail.ru

**Финансирование:** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 28.08.2018

Ismailova A.M.<sup>1</sup>, Tuchowskaya E.A.<sup>1</sup>, Lobanov A.V.<sup>1,2</sup>, Shaikhutdinova E.R.<sup>1</sup>, Murashev A.N.<sup>1</sup>

## The effect of prior administration of oral dipyridamole on cerebral blood flow and blood pressure of SD rats during global cerebral ischemia

<sup>1</sup> Branch of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Prospekt Nauki 6, Pushchino of Moscow Region 142290, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

The study focused on the effect of dipyridamole (kurantil) administered for 3 days prior to a surgery on blood pressure (BP) and cerebral blood flow during global cerebral ischemia followed by reperfusion in SD rats. Global ischemia was modeled by bilateral occlusion of carotid arteries with simultaneous withdrawal of 30% of the circulating blood volume (CBV).

BP and blood flow were recorded throughout the operation. Results. During the experiment, time-related BP changes did not differ between the kurantil group and the vehicle group. The drop of cerebral blood flow in response to carotid artery occlusion was statistically non-significant in the kurantil group in contrast to the vehicle group (intergroup difference approximately 10%). After initiating hypovolemia by blood withdrawal, the drop of blood flow also tended to a 10% difference between the kurantil group and the vehicle group. In reperfusion, the difference in blood flow before and after reperfusion was statistically significant in the vehicle group ( $p = 0.001$ ). In the kurantil group, the difference between the blood flow during occlusion and reperfusion was also statistically significant but less pronounced than in the vehicle group ( $p = 0.040$ ), i.e., the cerebral blood flow fluctuations induced by critical conditions, such as occlusion, hypovolemia, and reperfusion, were more pronounced in the vehicle group. Therefore, kurantil stabilized the cerebral blood flow to some extent. These kurantil effects should be considered protective (neuroprotective) since the greatest damage of brain tissue is caused by sharp fluctuations of cerebral blood flow during acute vascular accidents. The kurantil-induced stabilization of cerebral blood flow suggests perspectives in using this drug for correction of brain ischemic conditions.

**Keywords:** stroke; dipyrindamole; kurantil; rat; global ischemia.

**For citation:** Ismailova A.M., Tuchowskaya E.A., Lobanov A.V., Shaikhutdinova E.R., Murashev A.N. [Study of the effect of preliminary oral administration of dipyrindamole on cerebral blood flow and blood pressure of SD rats in the process of global cerebral ischemia]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 241—245. (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Elena Aleksandrovna Tuchowskaya, e-mail: elentuk@mail.ru

**Funding.** The study has no sponsorship.

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

**Received** 28.08.2018

## Введение

Ишемический инсульт является одной из важнейших медицинских и социальных проблем [1, 2], приводит к тяжелым последствиям вплоть до полной потери дееспособности и смерти. Добиться полного излечения пациента или даже просто восстановления утраченных функций на данный момент очень сложно [3]. Помимо этого, перенесенный инсульт значительно увеличивает риск возникновения ишемических цереброваскулярных заболеваний еще несколько лет [4]. Гораздо более эффективными являются превентивные меры, примененные к пациентам, находящимся в группе риска. В терапевтической практике в качестве нейропротекторов широко используются вазоактивные и антиагрегационные препараты [5, 6]. К таким препаратам относят дипиридамола (курантил), который является производным пиримидо-пиримидина с вазодилатирующими и антитромбоцитарными свойствами. На данный момент изучены два механизма действия дипиридамола [7, 8] на систему тромбообразования: первый — за счет блокировки захвата аденозина и стимуляцией аденилатциклазного механизма тромбоцитов; второй — за счет ингибирования фосфодиэстеразы, фермента превращающего ц-АМФ в 5-АМФ, в связи с чем повышается содержание ц-АМФ в тромбоцитах, препятствуя их агрегации [9]. Помимо этого, дипиридамола способствует усилению кровотока основных сосудов и коллатералей [8], а также стимулирует образование новых

коллатералей, что может значительно повлиять на уровень повреждений вследствие острой ишемии сосудов головного мозга.

В исследовании изучали влияние дипиридамола (курантила) при введении в течение 3 дней перед операцией на показатели артериального давления (АД) и мозгового кровотока в период глобальной ишемии головного мозга у крыс SD с последующей реперфузией.

## Методика

Исследование выполняли на половозрелых самцах крыс SD. Всего использовали 20 животных, разделенных на две группы по 10 особей. Одной группе животных вводили курантил перорально один раз в день в течение трех дней в дозе 15 мг/кг. Препарат вводили в виде суспензии в воде зондом в желудок. Вторая группа животных была контрольной и получала носитель — воду.

Глобальную ишемию моделировали путем билатеральной окклюзии сонных артерий с одновременным взятием крови в объеме 30% от объема циркулирующей крови (ОЦК). Показатели АД и кровотока регистрировали на протяжении всей операции.

Животных наркотизировали смесью кетамин/ксилазин (в дозах 30 мг/кг кетамина и 12 мг/кг ксилазина, внутримышечно, объем инъекции 1,2 мл/кг), вводили катетер в бедренную артерию (для регистрации АД и для забора крови), а также были наложены

окклюдеры на общие стволы сонных артерий. Для регистрации относительного мозгового кровотока с помощью лазерного доплеровского флоуметра у животных делали разрез кожи в области виска. Затем делали надрез височной мышцы, к височной кости присоединяли датчик флоуметра так, чтобы исключить его смещение в процессе регистрации кровотока. После присоединения переходника для датчика к ви-

сочной кости и вживления катетеров в бедренный сосуд, записывали в электронном виде исходные показатели АД и кровотока в течение 5 минут. Затем инициировали окклюзию, затягивая петли окклюдера на сонных артериях. После этого регистрировали показатели АД и кровотока в течение 4 минут. Через артериальный катетер брали кровь (в объеме 30% от ОЦК). Регистрировали показатели АД и кровотока



Рис. 1. Изменение артериального давления в процессе эксперимента по моделированию глобальной ишемии головного мозга у крыс.

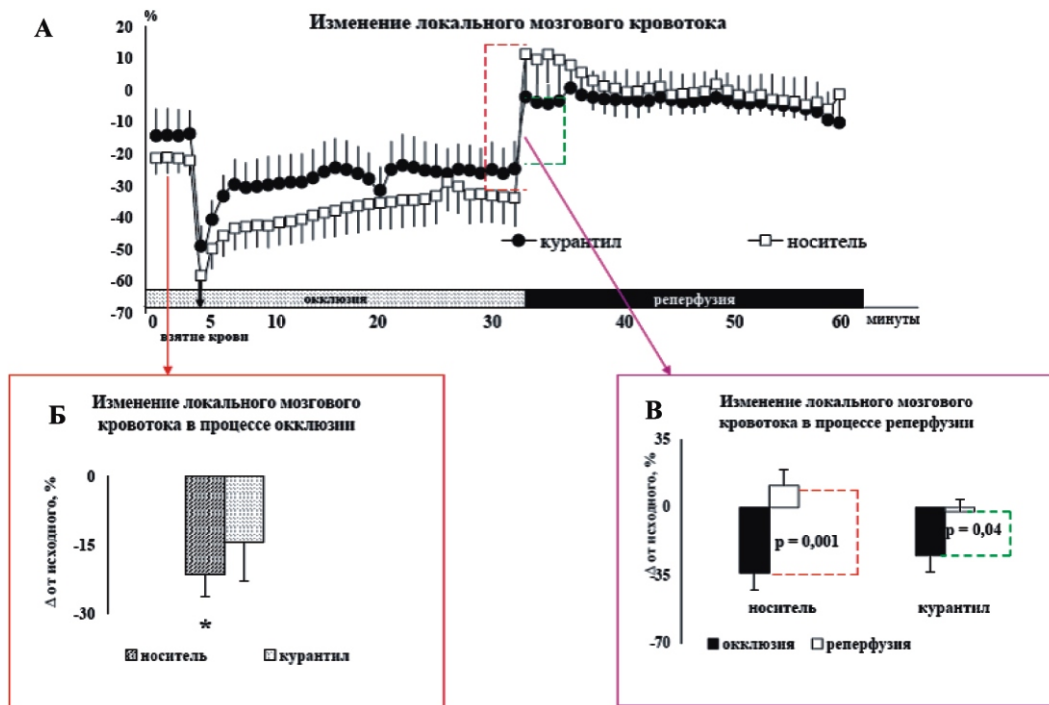


Рис. 2. Изменение локального мозгового кровотока в процессе эксперимента по моделированию глобальной ишемии головного мозга у крыс SD. А. Динамика изменения кровотока. Данные представлены в виде % от исходных значений кровотока ± стандартная ошибка среднего. Б. Изменение мозгового кровотока в период окклюзии сонных артерий. \* –  $p < 0,05$  относительно исходного уровня. Падение кровотока в группе «носитель» было значимо в отличие от группы «курантил». В. Изменение локального мозгового кровотока в процессе реперфузии. Данные представлены для точек перед реперфузией и непосредственно после реперфузии. Значения уровня достоверности различий между точками «окклюзия» и «реперфузия» представлены для обеих групп. Расчеты производились с использованием U-теста Манна–Уит-

в течение 30 минут. Затем делали реперфузию, ослабляя петли окклюдеров и снимая окклюдеры с сосудов. Регистрировали АД и кровоток в течение 30 минут. По истечении этого срока животных подвергали эвтаназии.

### Результаты и обсуждение

Поведение АД не различалось между группами «курантил» и «носитель». АД после окклюзии возрастало в обеих группах примерно на 20%. После взятия крови происходило падение АД в обеих группах примерно на 55%, затем в течение нескольких минут происходило повышение АД примерно на 15% от уровня падения и сохранялось на таком уровне на протяжении всего времени окклюзии. В момент реперфузии происходило падение АД в обеих группах примерно на 10%, с несущественным подъемом к моменту окончания регистрации (рис. 1).

Изменения мозгового кровотока в группе «носитель» были следующими. После окклюзии происходило снижение мозгового кровотока примерно на 20% (статистически значимо относительно исходного уровня). После взятия крови происходило резкое падение уровня кровотока примерно на 60%, затем происходило повышение кровотока примерно на 20% относительно падения. После реперфузии происходило резкое увеличение уровня кровотока примерно на 50% от уровня окклюзии ( $p = 0,001$ ) с последующим незначительным падением до исходного уровня.

В группе «курантил» динамика изменения кровотока была следующей. После окклюзии кровоток падал примерно на 10% (что статистически не отличалось от исходного уровня). После взятия крови происходило резкое падение кровотока примерно на 50% от уровня окклюзии с последующим восстановлением примерно на 20% относительно уровня падения. В момент реперфузии происходило повышение уровня кровотока примерно на 30% (относительно уровня окклюзии,  $p = 0,040$ ) с сохранением этого уровня до момента окончания регистрации (рис. 2).

Влияние превентивного трехкратного введения курантила на локальный мозговой кровоток при глобальной ишемии головного мозга может быть следствием воздействия на эндотелий сосудов, повышения синтеза простагландина и оксида азота, что приводит к усилению кровотока основных сосудов и коллатералей, а также стимулирует образование новых коллатералей [8].

Таким образом, можно сделать вывод о наличии стабилизирующего влияния курантила на мозговой кровоток в процессе глобальной ишемии головного

мозга при превентивном профилактическом введении в течение трех дней.

Целесообразно продолжить исследования противоишемических эффектов курантила на разных моделях ишемии головного мозга.

### Литература

(п.п. 5—9 см. References)

1. Виленский Б.С. Инсульт — современное состояние проблемы. *Неврологический журнал*. 2008; 2: 4-10.
3. Абдильманова Б.Р., Байдрахманова Г.М., Бижанова Л.С., Исакова Ф.Е., Рахимжанова Н.К. Реабилитация больных с последствиями инсульта. *Вестник Алма-тинского государственного института усовершенствования врачей*. 2011; 3: 20.
4. Кадыков А.С., Шахпаронова Н.В. Реабилитация постинсультных больных. Роль медикаментозной терапии. *Медицинский совет*. 2013; 4: 92-99.

### References

1. Vilenskii B.S. [Stroke — the current state of the problem]. *Neurologicheskii zhurnal. [Neurological Journal]*. 2008; 2: 4-10. (in Russian)
2. Bogousslavsky J., Kaste M., Olsen T.S., Hacke W., Orgogozo J-M. Risk factors and stroke prevention. *Cerebrovasc. Dis.* 2000; 10(Suppl 3): 12-21.
3. Abdilmanova B.R., Baydrakhmanova G.M., Bizhanova L.S., Iskakova F.E., Rakhimzhanova N.K. [Rehabilitation of patients with the effects of stroke]. *Vestnik Almatinskogo gosudarstvennogo instituta usovershenstvovaniya vrachej. [Bulletin of the Almaty State Institute of Advanced Medical Studies]*. 2011; 3: 20. (in Russian)
4. Kadykov A.S., Shakhparonova N.V. Rehabilitation of post-stroke patients. The role of drug therapy]. *Meditsinskiy sovet. [Medical Council]*. 2013; 4: 92-99. (in Russian)
5. Antithrombotic Trialists Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high-risk patients. *BMJ*. 2002; 324: 71-86.
6. Diener H.C., Cunha L., Forbes C., Sivenius J., Smets P., Lowenthal A. European Stroke Prevention Study 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J. Neuro. Sci.* 1996; 143: 1-13.
7. Leonardi-Bee J., Bath Ph.M.W., Boussier M-G., Davalos A., Diener H-Ch., Guiraud-Chaumeil B., Sivenius J., Yatsu F., Dewey M.E. Dipyridamole for Preventing Recurrent Ischemic Stroke and Other Vascular Events. *Stroke*. 2004; 36: 162-168. DOI:10.1161/01.STR.0000149621.95215.ea
8. De Schryver E.L., Algra A., van Gijn J. Cochrane review: dipyridamole for preventing major vascular events in patients with vascular disease. *Stroke*. 2003; 34: 2072-2080. DOI:10.1161/01.STR.0000082381.23938.0E
9. Gamboa A., Abraham R., Diedrich A., Shibao C., Paranjape S.Y., Farley G., Biaggioni I. Role of adenosine and nitric oxide on the mechanisms of action of dipyridamole. *Stroke*. 2005; 36(10): 2170-2175. DOI:10.1161/01.STR.0000179044.37760.9d

**Сведения об авторах:**

*Исмаилова Алина Магомедовна* — мл. науч. сотрк. лаборатории биологических испытаний Филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук

*Туховская Елена Александровна* — к. фарм. н., научный сотрудник лаборатории биологических испытаний Филиала федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук.

*Шайхутдинова Эльвира Рауильевна* — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биологических испытаний Филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук

*Лобанов Александр Владимирович* — к. биол. н., научный сотрудник лаборатории биологических испытаний Филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук; старший научный сотрудник лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

*Мурашев Аркадий Николаевич* — д. биол. н., профессор, руководитель лаборатории биологических испытаний Филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук

Лобанов А.В.<sup>1,2</sup>, Давыдов Д.М.<sup>1</sup>, Перепеченова Н.А.<sup>2</sup>, Черкашина О.Л.<sup>3</sup>,  
Карпова Н.С.<sup>3</sup>, Захарова И.А.<sup>1</sup>, Морозов С.Г.<sup>1</sup>

## Влияние недостатка S100B в раннем онтогенезе на поведение взрослых животных в открытом поле

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук. 142290, Московская область, Россия, Пушкино, пр. Науки, д. 6

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова». 119991, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1

Ранее было выявлено, что недостаток белка S100B в раннем онтогенезе влияет на формирование поведенческого фенотипа у мышей в гнездовом периоде развития. В данном исследовании были изучены эффекты недостатка белка S100B, вызванного иммунизацией самок мышей, на поведение их потомства в возрасте 12 месяцев в тесте открытого поля. Было установлено увеличение двигательной и исследовательской активности у самок и снижение активности у самцов мышей, рожденных от иммунизированных животных, относительно нормы. Также отмечено исчезновение нормального полового диморфизма в поведении в тесте открытого поля, характерного для контрольных мышей ICR в возрасте 12 месяцев.

**Ключевые слова:** белок S100B; иммунизация; поведение; мыши.

**Для цитирования:** Лобанов А.В., Давыдов Д.М., Перепеченова Н.А., Черкашина О.Л., Карпова Н.С., Захарова И.А., Морозов С.Г. Влияние недостатка S100B в раннем онтогенезе на поведение взрослых животных в открытом поле. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 246—249.

DOI:

**Для корреспонденции:** Лобанов Александр Владимирович, e-mail: lobanov-av@yandex.ru.

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.08.2018

Lobanov A.V.<sup>1,2</sup>, Davydov D.M.<sup>1</sup>, Perepechenova N.A.<sup>2</sup>, Cherkashina O.L.<sup>3</sup>,  
Karpova N.S.<sup>3</sup>, Zakharova I.A.<sup>1</sup>, Morozov S.G.<sup>1</sup>

## The effect of S100B deficit in early ontogenesis on behavior of adult animals in the open field test

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Branch of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Prospekt Nauki 6, Pushchino of Moscow Region 142290, Russian Federation

<sup>3</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University. Leninskie Gory 1, Moscow 119991, Russian Federation

Earlier it was shown that the shortage of S100B protein in early ontogenesis affected formation of the behavioral phenotype in mice during the nesting period of development. This study focused on effects of S100B protein deficiency induced by immunization of female mice on behavior of their offspring at the age of 12 months in the open field. The motor and exploratory activity of females was increased whereas the activity of males born from immunized animals was decreased compared to the control. Also, normal sexual dimorphism of the open field behavior characteristic of 12-month old control ICR mice was lost.

**Keywords:** S100B protein; immunization; behavior; mice.

**For citation:** Lobanov A.V., Davydov D.M., Perepechenova N.A., Cherkashina O.L., Karpova N.S., Zakharova I.A., Morozov S.G. The effect of S100B deficit in early ontogenesis on behavior of adult animals in the open field test. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 246—249. (in Russian)

DOI:

**For correspondence:** Lobanov Alexander Vladimirovich, e-mail: lobanov-av@yandex.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

Received 22.08.2018

## Введение

S100B — димерный белок из семейства  $Ca^{2+}$ -связывающих белков, является компонентом множественных внутриклеточных и внеклеточных сигнальных путей, и наибольшее его количество присутствует в астроцитах. Известно, что белок S100B в определенные периоды развития нервной системы влияет на нейропластичность и адаптивное поведение в дальнейшем онтогенезе [1]. Установлены эффекты недостатка белка S100 в период пренатального и постнатального развития на формирование поведения в гнездовом периоде у мышей [2]. Предполагается, что возникшие отклонения в поведении могут сохраняться в дальнейшей жизни животных и влиять на их адаптацию к окружающим условиям.

Целью данного исследования являлось изучение эффектов недостатка белка S100B, вызванного иммунизацией самок мышей, на поведение их потомства в возрасте 12 месяцев в тесте открытого поля.

## Методика

В исследовании были использованы мыши аутбредного стока ICR. Животных содержали в комнатах барьерного типа с контролируемыми условиями окружающей среды. Все манипуляции с животными были одобрены институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФИБХ РАН.

В исследовании было сформировано две группы мышей по 10 самок в возрасте 5 недель. Самки экспериментальной группы были четырехкратно иммунизированы белком S100B: первые три иммунизации проводили с интервалом 10 дней, четвертая реиммунизация была через месяц после третьей иммунизации. Для иммунизации белок в количестве 10 мкг растворяли в 150 мкл физиологического раствора, который смешивали с 150 мкл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ), после чего полученную эмульсию вводили подкожно. Животные контрольной группы получали смесь физиологического раствора и ПАФ. Для контроля иммунного ответа у мышей после третьей иммунизации определяли титр антител к S100B. Через 3 дня после четвертой реиммунизации проводили ссадку животных с интактными самцами. Далее у животных получали потомство. Через 4 недели после рождения потомство отсаживали от самки и содержали по пометам, предварительно разделив по полу. В возрасте 5 месяцев животных метили при помощи ушных клипс. В возрасте 12 месяцев потомство тестировали в открытом поле (ОП) [3]. Поведение фиксировали автоматически при помощи прибора TSE MultiConditioning (ТСИ, Германия). Тестирование проводили на площадке в закрытом боксе при

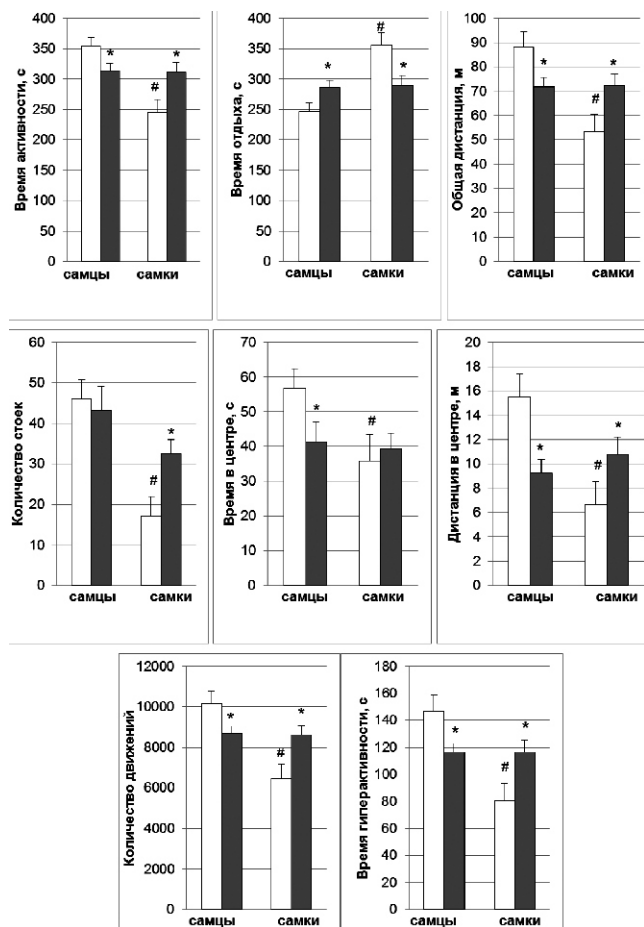
ярком освещении, однократно в течение 10 минут. В начале тестирования животное помещали в центр поля. После каждого тестирования проводили уборку площадки мыльным раствором. В рамках статьи приведены основные показатели поведения животных в тесте открытого поля: общая дистанция, время активности, время отдыха, количество стоек, время в центре и дистанция в центре, количество движений и время гиперактивности (гиперактивностью считались движения, скорость которых превышала 20 см/с).

Для всех количественных данных были подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего. Данные были проанализированы при помощи однофакторного или многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA1, ANOVA2). Различия определяли при 5% уровне значимости. Для анализа использовали программу Statistica 7.1.

## Результаты и обсуждение

Тестирование поведения животных выявило разнонаправленные эффекты дефицита S100B в раннем онтогенезе на поведение самцов и самок в ОП у взрослых животных (рисунок). У самцов группы S100B было установлено статистически значимое в сравнении с контролем снижение времени активности и увеличение времени отдыха, снижение общей пройденной дистанции, уменьшение количества движений и времени гиперактивности, уменьшение дистанции и времени в центре поля. У самок экспериментальной группы S100B было выявлено значимое увеличение времени активности и сокращение времени отдыха, увеличение общей дистанции, увеличение количества движений и времени гиперактивности, увеличение числа стоек относительно контроля (рисунок). По сумме изменений самцы экспериментальной группы были менее активны, а самки более активны. У животных контрольной группы был показан статистически значимый половой диморфизм по всем показателям поведения в открытом поле. Самцы контрольной группы были более активны, чем самки по всем исследуемым показателям: времени активности, общей дистанции, количества движений, количества стоек, времени гиперактивности, дистанции и времени в центре (рисунок). Различия в поведении в ОП, которые проявлялись в норме у контрольных животных разного пола, между самцами и самками группы S100B отсутствовали.

Таким образом, было установлено, что иммунное воздействие на белок S100B в период раннего онтогенеза приводило к сближению поведения самцов и самок в ОП и исчезновению нормального полового диморфизма, характерного для взрослых мышей ICR.



Поведение животных в тесте открытого поля. Обозначения групп: светлые столбики – контроль, тёмные столбики – потомство иммунизированных самок (S100B). Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего, количество животных в группе: самцы контроль  $n = 21$ , самцы S100B  $n = 21$ , самки контроль  $n = 11$ , самки S100B  $n = 26$ . Обозначения статистической значимости: \* –  $p < 0,05$  при сравнении группы S100B с контролем (ANOVA1, Duncan test), # –  $p < 0,05$  при сравнении самцов и самок контрольной группы (ANOVA2, Duncan test).

Также было выявлено изменение гиперактивного поведения, которое наблюдалось в подростковом периоде у самцов и было показано в предварительных исследованиях (материал не опубликован), на противоположное — снижение двигательной и исследовательской активности во взрослом состоянии. При этом у самок признаки гиперактивности, выявленные в раннем возрасте, сохранились и у животных в воз-

расте 12 месяцев. Известно, что увеличение уровня S100B в определенные периоды созревания мозга стимулирует нейропластичность и формирование адаптивного поведения [1]. Можно предположить, что у потомства иммунизированных животных адаптивное окно, связанное с белком S100B, открывается на другом, в отличие от нормы, этапе формирования ЦНС, и имеет другие временные характеристики. Вследствие этого могут возникать нарушения в закреплении адаптивного поведения, характерного для определенного пола. Возможно, у самцов включаются определенные механизмы компенсации гиперактивного поведения, характерного для животных группы S100B в подростковом периоде, которые приводят к обратному эффекту и закреплению малоактивного поведения у животных в возрасте 12 месяцев. Вероятно, исчезновение полового диморфизма, выявленного в поведении в ОП у мышей группы S100B, может также проявляться в нарушении социального и полового поведения у обоих полов, а также в нарушении материнского поведения у самок.

### Заключение

Изменение уровня белка S100B в период раннего онтогенеза у мышей влияет на формирование их поведения в ОП у взрослых животных. Установлено увеличение двигательной и исследовательской активности у самок мышей и снижение активности у самцов мышей группы S100B относительно нормы. Выявлено сближение поведения самцов и самок животных группы S100B в ОП и исчезновение нормального полового диморфизма, характерного для контрольных мышей ICR в возрасте 12 месяцев.

### Литература/References

1. Buschert J., Hohoff C., Touma C., Palme R., Rothermundt M., Arolt V., Ambree O. S100B overexpression increases behavioral and neural plasticity in response to the social environment during adolescence. *J. Psychiatr. Res.* 2013; 47(11): 1791-1799. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2013.08.001.
2. Davydov D.M., Lobanov A., Morozov S., Gribova I., Murashev A. Neurodevelopment and phenotype-modulating functions of S100B protein: A pilot study. *Physiol. Behav.* 2015; 140, 188-196. DOI:10.1016/j.physbeh.2014.12.037
3. Walsh R.N., Cummins R.A. The open-field test: a critical review. *Psychol. Bul.* 1976; 83: 482-504.



**Сведения об авторах:**

*Лобанов Александр Владимирович*, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП; науч. сотр. лаб. биологических испытаний Филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН;

*Давыдов Дмитрий Михайлович*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

*Перепеченова Наталья Александровна*, мл. науч. сотр. лаб. биол. испытаний Филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН;

*Черкашина Ольга Леонидовна*, студентка 3-го курса факультета биоинженерии и биотехнологии ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова;

*Карпова Наталья Сергеевна*, магистрант 2-го курса факультета биоинженерии и биотехнологии ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова;

*Захарова Ирина Александровна*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБУН НИИОПП;

*Морозов Сергей Георгиевич*, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, директор ФГБУН НИИОПП.

Кучеряну В.Г., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А.

## Влияние антител к глутамату при интраназальном введении на экспериментальный паркинсонический синдром

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

Изучали влияние интраназального, в 2 режимах, введения антител к L-глутамату (АТ-Глу) на экспериментальный паркинсонический синдром (ПС) у мышей C57BL/6j, вызванный 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП). Показано, что интраназальное введение АТ-Глу мышам параллельно с введением МФТП в течение 10 сут. ослабляло развитие паркинсонических симптомов — олигокинезию и ригидность. В сыворотке крови мышей, которым вводили АТ-Глу и/или МФТП были обнаружены аутоантитела к L-глутамату в большем количестве, чем у контрольных животных. Однократное интраназальное введение АТ-Глу мышам C57BL/6j на 11-е сут. с сформировавшимся ПС не влияло на выраженность паркинсонической симптоматики.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона; паркинсонический синдром; антитела к глутамату; аутоантитела к глутамату; МФТП; мыши C57Bl.

**Для цитирования:** Кучеряну В.Г., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А. Влияние антител к глутамату при интраназальном введении на экспериментальный паркинсонический синдром. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 250—253.

**DOI:**

**Для корреспонденции:** Кучеряну Валериян Григорьевич, e-mail: kucheryanu@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 29.08.2018

Kucheryanu V.G., Vetrile L.A., Zakharova I.A.

## The effect of intranasal administration of glutamate antibody on experimental parkinsonian syndrome

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Effects of two schedules of intranasal treatment with glutamate antibody (AT-Glu) on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonian syndrome (PS) were studied in C57BL/6j mice. Intranasal AT-Glu administration along with MPTP administration for 10 days attenuated the development of parkinsonian symptoms, oligokinesia and rigidity. The serum of mice treated with AT-Glu and / or MPTP contained a greater amount of glutamate autoantibody than the serum of control animals. A single intranasal administration of AT-Glu on day 11 to C57BL/6j mice with developed PS did not influence the severity of parkinsonian symptoms.

**Keywords:** Parkinson's disease; parkinsonian syndrome; antibodies to glutamate; autoantibodies to glutamate; MPTP; C57Bl mice.

**For citation:** Kucheryanu V.G., Vetrile L.A., Zakharova I.A. The effect of intranasal administration of glutamate antibody on experimental parkinsonian syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 250—253. (In Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Kucheryanu Valerian Grigorevich, e-mail: kucheryanu@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

**Received** 29.08.2018

## Введение

Болезнь Паркинсона (БП) является хроническим нейродегенеративным заболеванием и развивается в результате повреждения и гибели nigrostriatalных дофаминергических нейронов [1]. Точных механизмов гибели нейронов не известно. Предполагается, что повышенный уровень внеклеточного глутамата и гиперактивация глутаматергических рецепторов в базальных ганглиях вызывает критический каскад событий, включающих как внутриклеточные пути, так и взаимодействия между клетками, которые влияют на жизнеспособность клеток и способствуют гибели нейронов. Комплекс этих событий, вызванных глутаматом, отвечает за эксайтотоксичность, явление, связанное с несколькими патологическими состояниями, такими как гипоксическое повреждение мозга и нейродегенеративные заболевания, в том числе БП [2]. В предыдущих наших работах показано, что интраназальное введение глутамата крысам с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом усиливало выраженность паркинсонической симптоматики животных — гипокинезии и мышечной ригидности [3]. Учитывая способность антител к нейромедиаторам связывать определенные нейромедиаторы [4], можно предположить, что применение антител к глутамату при моделировании БП снизит степень эксайтотоксичности глутамата и окажет благоприятный эффект на течение БП. Предварительное и одновременное с МФТП введение антител к глутамату стареющим мышам C57BL/6j (12 мес.) ослабляло выраженность паркинсонических симптомов — гипо- и брадикинезии, ригидности и тремора [5].

*Цель исследования* — изучение влияния антител к L-глутамату при интраназальном введении в профилактическом и «лечебном режимах» на выраженность паркинсонического синдрома у мышей линии C57BL/6j среднего возраста, а также определение возможности усиления образования аутоантител к глутамату в крови у «паркинсонических» животных при системном введении МФТП.

## Методика

Исследования выполняли на инбредных мышцах-самцах C57BL/6j. Возраст животных составил 5—6 мес., масса тела 32—35 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище и 12-часовом световом режиме. При выполнении экспериментальных работ учитывали набор требований, изложенный в Совете Европейского сообщества 86\609\ЕЕС относительно использования экспериментальных животных при проведении исследований.

Паркинсонический синдром (ПС) индуцировали путем многократного внутрибрюшинного введения пронеуротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) в дозе 20 мг/кг в течение 10 сут., дважды в день с интервалом 12 ч. Степень развития ПС определяли по выраженности паркинсонических симптомов: олигокинезии и мышечной ригидности. Выраженность олигокинезии определяли путем изменения горизонтальной двигательной активности (длина пробега животного в см), вертикальной двигательной активности (количества стоек) и времени отдыха, когда мышца оставалась без признаков движения. Параметры локомоторной активности определяли в автоматизированном режиме посредством установки (Opto-Varimex-3) фирмы «Columbus Instruments» (USA), используя программу «Auto-Track». Длительность тестирования животных составила 6 мин. Степень развития мышечной ригидности определяли в баллах по выраженности симптома «горбатость» — сокращение линейного размера тела животного от шеи до хвоста [5, 6].

Антитела к L-глутамату (АТ-Глу) получали гипериммунизацией кроликов антигеном глутамат-бычий сывороточный альбумин (Глу-БСА), синтезированный по ранее описанной методике [7]. АТ-Глу очищали от примесей антител к БСА методом аффинной хроматографии на бромциан сефарозе 4В с иммобилизованным на ней БСА.

Животные были разделены на 6 групп. Мыши 2-й группы ( $n = 10$ ) получали МФТП по указанной выше схеме. 3-й группе мышей ( $n = 10$ ) вводили одновременно внутрибрюшинно МФТП и интраназально АТ-Глу в дозе 300 мкг/кг массы тела животного в объеме 10 мкл (по 5 мкл в каждую ноздрю мышки) в течение 10 сут. Контролем служила 1-я группа мышей ( $n = 12$ ), которые получали внутрибрюшинно и интраназально 0,9% раствор NaCl (ФР) в том же объеме, что МФТП и АТ-Глу. Кроме того, две группы мышей — 4-я ( $n = 8$ ) и 5-я ( $n = 8$ ) получали МФТП в течение 10 сут. На 11-е сут. опыта мышам 4-й группы вводили интраназально однократно АТ-Глу в той же дозе, а мышам 5-й группы вводили ФР, 6-я группа мышей получала ФР по той же схеме, что группы 4-я и 5-я и служила для них контролем. По окончании эксперимента после проведения тестирования животных в тесте «открытое поле» мышам всех групп декапитировали и брали кровь для определения уровня аутоантител к L-глутамату.

Аутоантитела к L-глутамату (АутоАТ-Глу) в сыворотках крови контрольных и опытных мышей определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) при  $\lambda = 492$  нм с использованием считывающего устройства «Mini-reader» («ImmunoChem-2100», USA) [8]. Тест-антигеном служил

конъюгат Глу-БСА. Уровень аутоАТ в условных единицах активности (усл. ед.) определяли по соотношению оптической плотности каждой опытной сыворотки к среднему значению оптической плотности контрольных сывороток.

Статистическую обработку данных проводили по алгоритму компьютерной программы STATISTICA 10.0 с помощью однофакторного дисперсионного анализа One-way ANOVA с пост-хок тестом Newman—Keuls или непараметрическим методом Манна—Уитни (Mann—Whitney U test). Отличия величин параметров в группах считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Системное введение мышам МФТП на протяжении 10 сут. приводило к развитию выраженных симптомов паркинсонического синдрома. Значение горизонтальной двигательной активности (длина пробега) снижалась с  $929 \pm 56$  см в группе мышей, которым вводили ФР, до  $283 \pm 59$  см в группе мышей, которым вводили МФТП. Число стоек уменьшалось с  $11,8 \pm 0,8$  в группе мышей, которым вводили ФР, до  $2,6 \pm 0,5$  в группе мышей, которым вводили МФТП. Значение времени отдыха, когда животные были без движения, наоборот, увеличивалось с  $155 \pm 5$  с до  $279 \pm 16$  с в группе мышей, которым вводили пронеуротоксин. Эти изменения локомоторной активности свидетельствует о развитии у мышей олигокинезии.

Статистически значимые изменения моторной активности у мышей, получавших МФТП, наблюдали уже на 5-е сут. после введения препарата. На 10-е сут. введения МФТП у 90% мышей развивалась мышечная ригидность. Развитие тремора у этих животных не наблюдали, что, вероятно, связано с возрастом животных (5—6 мес.).

Ежедневное интраназальное введение мышам АТ-Глу в течение 10 сут. одновременно с МФТП приводило к увеличению локомоторной активности относительно группы мышей, которым вводили МФТП: длина пробега и число стоек повышались в 2,1 и 3,5 раза соответственно, а время без движения животных снижалось в 1,3 раза, что свидетельствует о статистически значимом снижении развития олигокинезии. Однако показатели двигательной активности мышей, получавших АТ-Глу, на 10-е сут. опыта не восстанавливались до величин группы контроля (введение ФР). Интраназальное введение АТ-Глу ослабляло развитие ригидности у мышей с ПС ( $1,6 \pm 0,3$  в группе с МФТП до  $0,9 \pm 0,2$  балла в группе МФТП + АТ-Глу ( $p < 0,05$ ). Тестирование мышей на 5-е сут. введения МФТП и АТ-Глу

не выявило статистически значимых изменений олигокинезии и ригидности.

Однократное интраназальное введение АТ-Глу мышам с сформировавшимся ПС, вызванным МФТП на 11-е сут. не вызывало эффект подавления симптомов паркинсонического синдрома — олигокинезии и мышечной ригидности.

МФТП при внутрибрюшинном введении мышам в течение 10 сут. вызвало усиленную выработку ауто-АТ-Глу в крови.

У мышей контрольной группы, получавших внутрибрюшинно ФР, в сыворотке крови определяли незначительное количество естественных аутоАТ-Глу ( $0,84 \pm 0,09$  у.е.). Естественные антитела продуцируются в ответ на образование эндогенных конъюгированных антигенов, которые представляют собой ковалентно связанные с белками реакционноспособные радикалы, образующиеся в результате метаболизма нейромедиаторов [9]. В сыворотках крови опытных мышей количество определяемых аутоАТ-Глу было статистически значимо выше (в 1,6 раза), чем в группе контроля. Содержание аутоАТ-Глу в сыворотках крови групп мышей, получавших МФТП и МФТП+АТ, существенно не различалось. Это может быть связано с тем, что интраназально введенные в микродозе АТ поступают преимущественно в ЦНС, минуя гематоэнцефалический барьер [10].

Механизм действия АТ к нейромедиаторам на ЦНС — это сложный комплекс различных процессов. АТ, проникая в ЦНС через гематоэнцефалический барьер, способны изменять функциональную активность нейромедиаторов, что подтверждается результатами исследований на других экспериментальных моделях. Системное введение АТ к нейромедиаторам приводило к изменению уровня, метаболитов и лиганд-связывающей активности рецепторов нейромедиаторов [4]. При введении интраназально АТ поступают в ЦНС через бульбо-олифакторные пути в течение 1,5—4,5 мин на 88—98% больше, чем при других способах введения [10]. В экспериментальной модели стресса на крысах АТ к Глу при интраназальном введении восстанавливали поведенческую активность животных в тесте открытого поля и содержание в гиппокампе глутамата, дофамина и ГАМК [7]. Предполагается, что АТ к нейромедиаторам могут воздействовать на ЦНС опосредованно через медиаторы иммунной системы, обладающие нейротропным действием (интерлейкины, интерфероны) [4].

В наших исследованиях АТ-Глу при длительном совместном введении с МФТП ослабляли развитие паркинсонической симптоматики — олигокинезии и ригидности мышей. Возможно, при таком способе введения АТ-Глу способны уменьшить эксайтотоксичность глутамата в дофаминергических нейронах,

оказывая нейропротективный эффект. Отсутствие положительного эффекта АТ-Глу при другом способе — однократном введении на фоне сформировавшегося ПС, возможно, связано с тем, что АТ-Глу не способны существенно уменьшать уровень глутамата и снизить его токсическое действие на дофаминергические нейроны.

### Литература

1. Крыжановский Г.Н., Карабань И.Н., Магаева С.В., Кучеряну В.Г., Карабань Н.В. *Болезнь Паркинсона*. М.: Медицина, 2002. 372 с.
2. Masilamoni G.J., Smith Y. Metabotropic glutamate receptors: targets for neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Curr. Opin. Pharmacol*, 2018; 38: 72-80. DOI: 10.1016/j.coph.2018.03.004
3. Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н. Влияние глутамата и антагонистов N-метил-D-аспаратат-рецепторов на экспериментальный паркинсонический синдром у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2000; 130 (7): 20-23.
4. Евсеев В.А. *Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии*. М.: Издательство РАМН, 2007. 145 с.
5. Давыдова Т.В., Фомина В.Г., Горбатов В.Ю., Ветрилэ Л.А., Кучеряну В.Г. Антитела к глутамату в развитии паркинсонического синдрома, вызванного введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), у мышей C57Bl/6. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2008; 4: 13-14.
6. Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н., Бочарова О.А., Кудрин В.С., Белорусцева С.А. Влияние комплексного фитоадаптогена на МФТП-индуцированный паркинсонический синдром у мышей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2006; 141 (5): 555-558. DOI: 10.1007/s10517-006-0220-2
7. Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Кудрин В.С., Клодт П.М. Влияние антител к глутамату на развитие стресс-реакций и содержание нейромедиаторов в гиппокампе и гипоталамусе крыс с разной поведенческой активностью. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013; 155(3): 293-298. DOI: 10.1007/s10517-013-2143-z
8. Ветрилэ Л.А., Невидимова С.И. Мастерова, Бокхан Н.А., Захарова И.А., Савочкина Д.Н., Фомина В.Г., Давыдова Т.В. Антитела к нейромедиаторам — нейроиммунные маркеры в персонализированной профилактике болезни зависимости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, 2017; 61(3): 31-37. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.31-37
9. Ковалев И.Е., Полевая О.Ю. *Антитела к физиологически активным соединениям*. М.: Медицина, 1981. 126 с.

### Сведения об авторах:

Кучеряну Валериян Григорьевич, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИОПП;

Ветрилэ Лучия Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Захарова Ирина Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП.

10. Talegaonkar S., Mishra. Intranasal delivery: An approach to bypass the bloodbrainbarrier. *Indian J. Pharmacol.*, 2004; 36 (3): 140-147.

### References

1. Kryzhanovsky G.N., Karaban I.N., Magayeva S.V., Kucheryanu V.G., Karaban N.V. [*Parkinson's disease*]. М.: Meditsina, 2002. 336 p. (in Russian)
2. Masilamoni G.J., Smith Y. Metabotropic glutamate receptors: targets for neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Curr. Opin. Pharmacol*, 2018; 38: 72-80. DOI: 10.1016/j.coph.2018.03.004
3. Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N. [Effect of glutamate and antagonists of N-Methyl-D-aspartate receptors on experimental parkinsonian syndrome in rats]. *Byulleten' ehksperimental'noi biologii i mediciny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2000; 130(1): 629-632. (in Russian)
4. Evseyev V.A. *Antibodies to neurotransmitters in the mechanisms of neuroimmunopathology*. [Antitela k neyromediatoram v mekhanizmax neyroimmunopatologii]. Moscow; RAMS, 2007. (in Russian)
5. Davydova T.V., Fomina V.G., Gorbatov V.Yu., Vetrile L.A., Kucheryanu V.G. Glutamate antibodies in the development of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro pyridine (MPTP)-induced parkinsonian syndrome in C57Bl/6 mice. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2008; 4: 13-4. (in Russian)
6. Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N., Belorustseva S.A., Bocharova O.A., Kudrin V.S. Effect of complex phytoadaptogen on MPTP-induced Parkinson's syndrome in mice. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2006; 141(5): 560-563. DOI: (in Russian)
7. Vetrile L.A., Zakharova I.A., Kudrin V.S., Klodt P.M. Effects of antiglutamate antibodies on the development of stress response and neurotransmitter content in the hippocampus and hypothalamus of rats with different behavioral activity. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2013; 155 (3): 318-23. DOI: (in Russian)
8. Vetrile L.A., Nevidimova S.I. Masterova, Bokhan N.A., Zakharova N.A., Savochkina D.N., Fomina V.G., Davydova T.V. Antibodies to neurotransmitters are neuroimmune markers in personalized prevention of addiction diseases. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2017; 61(3): 31-7. (in Russian)
9. Kovalev I.E., Poleyeva O.Yu. *Antibodies to physiologically active compounds [Antitela k fiziologicheski aktivnym soedineniyam]*. Moscow; Meditsina, 1981. (in Russian)
10. Talegaonkar S., Mishra. Intranasal delivery: An approach to bypass the bloodbrainbarrier. *Indian J. Pharmacol.*, 2004; 36 (3): 140-7.

Давыдова Т.В.<sup>1</sup>, Невидимова Т.И.<sup>2</sup>, Ветрилэ Л.А.<sup>1</sup>, Захарова И.А.<sup>1</sup>, Савочкина Д.Н.<sup>2</sup>, Бохан Н.А.<sup>2</sup>

## Нейробиологическая предрасположенность к аддиктивным расстройствам. Антитела к нейромедиаторам

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук 634014, Томск, Россия, ул. Алеутская, д. 4

Выявление нейробиологической предрасположенности к развитию аддиктивных расстройств является актуальной задачей при решении проблемы профилактики болезней зависимости от психоактивных веществ. Ключевую роль в разработке этой проблемы играет изучение молекулярных нейроиммунных механизмов регуляции нейромедиации в развитии аддиктивных расстройств. Целью работы было изучение в сыворотке крови иммуноферментным методом содержания аутоантител к нейромедиаторам для построения паттерна их изменения при формировании зависимости к психоактивным веществам. Показано, что система антител к дофамину, норадреналину, глутамату изменяется в процессе развития зависимости от психоактивных веществ и может рассматриваться в качестве нейроиммунного маркера для выявления групп риска развития наркомании.

**Ключевые слова:** аддиктивные расстройства; психоактивные вещества; антитела; нейромедиаторы; дофамин; норадреналин; глутамат.

**Для цитирования:** Давыдова Т.В., Невидимова Т.И., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Савочкина Д.Н. Бохан Н.А. Нейробиологическая предрасположенность к аддиктивным расстройствам. Антитела к нейромедиаторам. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 254—256.

DOI:

**Для корреспонденции:** Давыдова Татьяна Викторовна, e-mail: dav-ta@yandex.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ отделение гуманитарных и общественных наук Грант № 16-06-00617 «Персонализированная профилактика аддиктивных расстройств подростково-юношеского возраста».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.08.2018

Davydova T.V.<sup>1</sup>, Nevidimova T.I.<sup>2</sup>, Vetrile L.A.<sup>1</sup>, Zakharova I.A.<sup>1</sup>, Savochkina D.N.<sup>2</sup>, Bokhan N.A.<sup>2</sup>

## Neurobiological predisposition to addictive disorders. Antibodies to neurotransmitters

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Mental Health Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center, Aleutskaya Str. 4, Tomsk 634014, Russian Federation

Identification of neurobiological susceptibility to addictive disorders is an important issue of preventing psychoactive substance dependence. A key role in approaching this issue belongs to studying molecular neuroimmune mechanisms for neurotransmission regulation during development of addictive disorders. The aim of this study was to construct a pattern of changes in serum neurotransmitter autoantibodies during formation of psychoactive substance dependence using immunoassay. The system of antibodies to dopamine, norepinephrine, and glutamate changed during the development of psychoactive substance dependence and can be considered as a neuroimmune marker for identifying groups at risk of drug addiction.

**Keywords:** addictive disorders; psychoactive substances; antibodies; neurotransmitters; dopamine; norepinephrine; glutamate.

**For citation:** Davydova T.V., Nevidimova T.I., Vetrile L.A., Zakharova I.A., Savochkina D.N. Bokhan N.A. Neurobiological predisposition to addictive disorders. Antibodies to neurotransmitters. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 254—256 (in Russian).

DOI:

**For correspondence:** Davydova Tatiana Viktorovna, e-mail: dav-ta@yandex.ru

**Funding.** This work was carried out with the financial support of the RFBR Department of Humanities and Social Sciences Grant No. 16-06-00617 «Personalized prevention of addictive disorders in adolescent age».

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

**Received** 23.08.2018

## Введение

Проблема аддиктивного поведения, проявляющегося в развитии зависимости к психоактивным веществам, включая алкоголь, наркотические вещества, является в настоящее время одной из актуальнейших медико-социальных проблем для современного общества. По данным ВОЗ более 3% населения нашей планеты страдают от наркомании. В России наркомания затрагивает около 30 млн чел., т.е. практически каждого пятого человека страны. В связи с этим в индивидуальной профилактике болезней зависимости важное значение имеет выявление нейробиологической предрасположенности к этим заболеваниям. В механизмах развития аддиктивных расстройств существенную роль играет нейроиммунная составляющая. В настоящее время считается, что основным механизмом зависимости от наркотических веществ являются нарушения нейромедиаторных систем мозга [1], которые могут регулироваться факторами иммунной системы, а именно антителами к нейромедиаторам, способными модулировать функциональную активность нейротрансмиттеров [2].

В этом контексте изучение участия антител к нейромедиаторам как факторов нейробиологической предрасположенности к развитию аддиктивных расстройств, представляет несомненный интерес. Ранее было показано, что в группе риска по формированию зависимости от наркотических веществ выявляется существенное снижение уровня антител к нейромедиаторам по сравнению с группой студентов-добровольцев, не употреблявших психоактивные вещества, а также повышение уровня этих антител у пациентов, страдающих наркоманией [3, 4]. *Целью настоящей работы* было изучение системы антител к дофамину (ДА), норадреналину (НА) и глутамату (Глу) в сыворотке крови для построения паттерна их изменения в разные сроки развития зависимости от психоактивных веществ, что может быть использовано в индивидуальной профилактике болезней зависимости.

## Методика

Для проведения исследования были привлечены две группы испытуемых. В одну вошли 85 студентов-добровольцев средних специальных и высших учебных заведений города Томска. Во вторую группу были включены 65 пациентов, находящиеся на лечении в отделении аддиктивных состояний НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН, с подтвержденным диагнозом наркомания. Для включения в обследование были использованы следующие критерии: письменное информированное согласие на участие в исследовании;

верифицированный диагноз; возраст 18—28 лет. Критериями исключения были: наличие эндогенных психических расстройств; наличие умственной отсталости; наличие неврологической патологии, соматические расстройства в стадии обострения. Кровь для исследования у добровольцев и наркологических пациентов брали однократно при обследовании.

Все участники эксперимента были разделены на пять групп: 1 группа — студенты, полностью отвергающие прием психоактивных веществ, в том числе алкоголя и табака («абстиненты»); 2 группа — студенты, не употребляющие психоактивные вещества (контроль); 3 группа — студенты, эпизодически употребляющие наркотические вещества из каннабиноидов или амфетаминов; 4 группа — пациенты, употребляющие наркотические вещества и имеющие вследствие этого проблемы со здоровьем, но без формирования зависимости; 5 группа — пациенты с доказанной наркотической зависимостью.

Антитела к нейромедиаторам ДА, НА и Глу определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В качестве тест-антигенов использовали конъюгаты нейротрансмиттеров с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Для синтеза конъюгированного антигена ДА-БСА использовали диазотированный белок [4]. Синтез конъюгатов НА-БСА и Глу-БСА проводили с помощью глутарового альдегида [4].

Статистическую обработку полученных данных проводили по алгоритмам программы «Statistica 6.0» с использованием однофакторного непараметрического дисперсионного анализа по Краскелу—Уоллису ( $H$ -критерий). Последующие попарные сравнения проводили с использованием  $U$ -критерия Манна—Уитни. Уровень статистической значимости при проверке нулевых гипотез был равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

Обследование здоровых людей и наркологических пациентов показало разницу между группами по уровню в сыворотках крови аутоантител к ДА  $H(4N-150) = 88,09; p < 0,000$ , НА  $H(4N-150) = 66,85; p < 0,000$  и Глу  $H(4N-150) = 49,68; p < 0,000$ . Проведенное исследование системы антител к ДА, НА и Глу показало, что уровень этих антител может отражать изменения в нейротрансмиттерных системах головного мозга, происходящие при развитии зависимости от психоактивных веществ. Выявлены особенности образования системы антител к ДА, НА и Глу у здоровых молодых людей. Так, добровольцы,

полностью отвергающие психоактивные вещества, так называемые «абстиненты», имеют более высокий уровень этих антител в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой, ведущей обыкновенный образ жизни и не принимающей психоактивные вещества. Группа студентов, проявляющая интерес и эпизодически имеющая контакт с амфетаминами и каннабиноидами, имеет низкие уровни антител к ДА, НА и Глу. Уровень этих антител остается сниженным у молодых людей, принимающих наркотические вещества с вредом для здоровья, но без развития зависимости. При развитии зависимости от психоактивных веществ содержание антител к ДА, НА и Глу существенно возрастает в сыворотке крови, особенно в постабстинентном состоянии и постепенно начинает снижаться при ремиссии. По всей вероятности, снижение уровня этих антител при ремиссии может предполагать возможность нового обострения болезни.

### Заключение

Таким образом, паттерн системы антител к ДА, НА и Глу может рассматриваться в качестве нейроиммунного маркера предрасположенности для выявления групп риска по формированию аддиктивных расстройств, в частности опиийной наркомании, а также может быть использована при разработке персонализированной профилактики болезни зависимости.

### Литература

1. Анохина И.П. Основные биологические механизмы зависимости от психоактивных веществ. *Вопросы наркологии*. 2013; 6:40-59.

2. Евсеев В.А. *Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии*. М.: Издательство РАМН, 2007. 144 с.

3. Давыдова Т.А., Ветрилэ Л.А., Невидимова Т.И., Ветлугина Т.П., Фомина В.Г., Захарова И.А., Батухтина Е.И., Бохан Н.А. Соотношение антител к нейромедиаторам в сыворотке крови студентов, эпизодически употреблявших психоактивные вещества. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 157(3): 309-311.

4. Ветрилэ Л.А., Невидимова Т.И., Мастерова Е.И., Бохан Н.А., Захарова И.А., Савочкина Д.Н., Фомина В.Г., Давыдова Т.В. Антитела к нейромедиаторам — нейроиммунные маркеры в персонализированной профилактике болезней зависимости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(3): 32-37. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.31-37

### References

1. Anokhina I.P. The main biological mechanisms psychoactive substances dependence. *Voprosy narkologii [Journal of Addiction Problems]*. 2013; 6: 40-59. (in Russian)

2. Evseev V.A. *[Antibodies to neuromediators in mechanisms of neuroimmunopathology]*. М.: RAMS, 2007. 144 pp. (in Russian)

3. Davydova T.V., Vetrile L.A., Nevidimova T.I., Vetlugina T.P., Fomina V.G., Zaharova I.A., Batuhtina E.I., Bohan N.A. [Ratio of antibodies to neurotransmitters in the serum of students, occasional drug users]. *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2014; 157(3): 333-5. (in Russian)

4. Vetrile L.A., Nevidimova T.I., Masterova E.I., Bokhan N.A., Zakharova I.A., Savochkina D.N., Fomina V.G., Davydova T.V. Antibodies to neurotransmitters — neuroimmune markers in individual prevention of addiction. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimental'naya terapiya [Pathological Physiology and Experimental Therapy]*. 2017; 61(3); 32-37. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.31-37 (in Russian)

### Сведения об авторах:

Давыдова Татьяна Викторовна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Невидимова Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии ФГБНУ «НИИ психического здоровья» Томского национального исследовательского медицинского центра РАН;

Ветрилэ Лучия Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Захарова Ирина Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Савочкина Дарья Николаевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии ФГБНУ «НИИ психического здоровья» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук;

Бохан Николай Александрович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ, директор ФГБНУ «НИИ психического здоровья» Томского национального исследовательского медицинского центра РАН.



Шакова Ф.М., Кирова Ю.И., Романова Г.А.

## Влияние Семакса на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий мозга при экспериментальном двустороннем фотохимическом ишемическом повреждении префронтальной коры

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

Ишемическое повреждение префронтальной коры головного мозга сопровождается ранним и прогрессирующим во времени снижением активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) митохондрий перифокальной зоны. Суточное дробное введение синтетического аналога фрагмента АКТГ<sub>4-10</sub> — Семакса в дозе 25 мкг/кг сопровождается нормализацией активности СДГ через 24 ч после фототромбоза коры. Исследование показало, что определение активности СДГ является информативным методом, позволяющим оценить тяжесть ишемического повреждения головного мозга и эффективность нейропротекторной терапии.

**Ключевые слова:** ишемия, сукцинатдегидрогеназа, фототромбоз, Семакс, префронтальная кора.

**Для цитирования:** Шакова Ф.М., Кирова Ю.И., Романова Г.А. Влияние Семакса на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий мозга при экспериментальном двустороннем фотохимическом ишемическом повреждении префронтальной коры. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 257—260.  
DOI:

**Финансирование.** Работа не имеет финансовой поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Шакова Фатима Мухамедовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: shakova.fatima@yandex.ru

Поступила 28.08.2018

Shakova F.M., Kirova Y.I., Romanova G.A.

## The influence of Semax on the activity of brain mitochondria succinate dehydrogenase in experimental bilateral photochemical ischemic damage to the prefrontal cortex

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

Ischemic damage to the prefrontal cortex is accompanied by early and progressive decrease in the succinate dehydrogenase (SDH) activity of the mitochondria of the perifocal area. The daily fractional administration of a synthetic analogue of the ACTH<sub>4-10</sub> fragment — Semax at a dose of 25 µg / kg is accompanied by normalization of the activity of SDH 24 hours after photothrombosis of the cortex. The study showed that the determination of the activity of SDH is an informative method to assess the severity of ischemic brain damage and the effectiveness of neuroprotective therapy.

**Keywords:** ischemia, succinate dehydrogenase, photothrombosis, Semax, prefrontal cortex.

**For citation:** Shakova F.M., Kirova Y.I., Romanova G.A. The influence of Semax on the activity of brain mitochondria succinate dehydrogenase in experimental bilateral photochemical ischemic damage to the prefrontal cortex. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 257—260. (in Russian).  
DOI:

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

**For correspondence:** Fatima M. Shakova, PhD, MD, Leading Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», e-mail: shakova.fatima@yandex.ru

Received 28.08.2018

## Введение

В Российской Федерации, как и во всем мире, инсульт является важнейшей медико-социальной проблемой, обусловленной высокими показателями заболеваемости, смертности и инвалидизации населения. По данным Национального регистра инсульта, на долю ишемического приходится 80% от всех случаев заболевания. Каждый третий пациент, перенесший инсульт, нуждается в посторонней помощи, 20% не могут самостоятельно ходить и лишь 8% больных могут вернуться к прежней работе [1, 2]. Смертность от инсульта среди лиц трудоспособного возраста за последние 10 лет увеличилась более чем на 30%, составив 41 случай на 100 тыс. населения, а ранняя 30-дневная летальность составляет 16% [3]. В связи с этим, поиск лекарственных средств, снижающих степень нейродегенерации и улучшающих функции ЦНС, а также внедрение современных принципов терапии ишемического повреждения головного мозга, которые позволят существенно улучшить исход заболевания, является весьма актуальной задачей [4].

Ишемический инсульт развивается вследствие острой фокальной церебральной ишемии. Инфаркт мозга — необратимое повреждение ткани, с морфологически сформировавшимся очагом некроза, развивается уже через 5—6 мин после ишемического повреждения, вследствие чего эта зона не может являться объектом терапевтического воздействия [5]. По периферии зоны инфаркта, на протяжении нескольких часов, сохраняется функционально измененная ткань — пенумбра, не утратившая основных структурных характеристик и жизнеспособности [6, 7]. Характерным для пенумбры является низкий уровень энергетического и белкового метаболизма. Зона пенумбры является непосредственным объектом терапевтических вмешательств, поэтому первые 3—6 ч с момента развития заболевания рассматриваются в качестве «терапевтического окна», в пределах которого лечебные мероприятия могут быть наиболее эффективными [8].

Объем и степень поражения головного мозга при ишемии, а также восстановительный потенциал ишемизированной ткани мозга зависят от функциональной активности митохондрий. Известны различные патогенетически обоснованные подходы, направленные на поддержание электронтранспортирующей, энергосинтезирующей и  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующей функций митохондрий при ишемии [9, 10]. Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) митохондрий является уникальным ферментом, устойчивым к ингибирующему действию многих дыхательных ядов и активных форм кислорода. Активация сукцинатдегидрогеназы в условиях гипоксии, ишемии, травмы, интоксикации и воспаления, позволяет рассматривать ее как фермент поддержа-

ния механизмов митохондриальной энергопродукции в патофизиологических условиях. Активность СДГ является неотъемлемым элементом в системе молекулярно-клеточных механизмов толерантности к гипоксии/ишемии [9, 10].

При разработке тактик нейропротекции последние десятилетия пристальное внимание уделяется нейропептидам, которые вырабатываются клетками нервной ткани и структурно представляют собой короткие аминокислотные цепочки, обладающие высокой эффективностью и выраженной направленностью действия. Наибольший интерес привлекают нейропептиды, структурно связанные с адренокортикотропным гормоном (АКТГ). Эти соединения способны участвовать в регенерации нервных клеток, а также регулировать процессы поведения, внимания, формирования памяти и обучения. Примером достижений отечественной науки в этом направлении является разработанный в Институте молекулярной генетики РАН лекарственный препарат Семакс — синтетический аналог фрагмента АКТГ из 7 аминокислот (АКТГ<sub>4-10</sub>), полностью лишенный гормональной активности, но обладающий нейропротекторными свойствами [11].

*Цель исследования* — оценка влияния Семакса при интраназальном введении на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий в остром периоде при двустороннем фотохимическом ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс.

## Методика

Работа была выполнена на 54 нелинейных крысах-самцах массой 200—220 г, выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» при естественном чередовании суточной освещенности и свободном доступе к воде и пище. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Протокол исследования был утвержден этической комиссией ФГБНУ НИИОПП.

Экспериментальные животные были разделены на 9 групп:

1. Интактные крысы ( $n = 6$ );
2. Интактные + Семакс однократно в дозе 25 мкг/кг интраназально ( $n = 6$ );
3. Интактные + четырехкратное введение Семакс каждые 6 ч в дозе 25 мкг/кг интраназально ( $n = 6$ );
4. Наркотизированные крысы ( $n = 6$ );
5. Наркоз + Семакс однократно в дозе 25 мкг/кг интраназально ( $n = 6$ );

6. Наркоз + четырехкратное введение Семакс каждые 6 ч в дозе 25 мкг/кг интраназально (n = 6);

7. Фототромбоз + 0,9% раствор NaCl в объеме 10 мкл интраназально (n = 6);

8. Фототромбоз + Семакс однократно через 1 ч после операции в дозе 25 мкг/кг интраназально (n = 6);

9. Фототромбоз + четырехкратное введение Семакс каждые 6 ч в дозе 25 мкг/кг интраназально, первое введение через 1 ч после операции (n = 6)

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс — поля Fr1 и Fr2 создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза по ранее описанной методике [12, 13]. Операцию проводили под наркозом, вызываемым внутривенным введением хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Через 24 ч после операции животных декапитировали для забора мозга.

Выделение митохондриальной фракции префронтальной коры головного мозга осуществляли методом дифференциального центрифугирования [14]. Активность СДГ определяли спектрофотометрическим методом, основанным на окислении ферментом янтарной кислоты и сопряженном восстановлении акцептора электронов окрашенного феррицианида калия до бесцветного ферроцианида [14].

Статистический анализ данных проводили с помощью программы «Statistica 6.0» с использованием критерия Стьюдента и непараметрического рангового U-критерия Уилкоксона (Уилкоксона—Манна—Уитни). Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

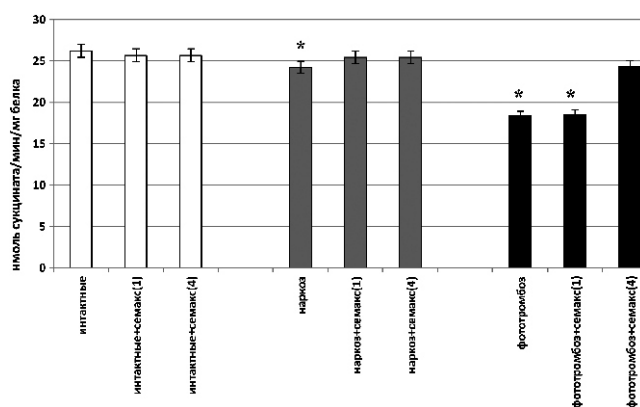
## Результаты и обсуждение

Через 2 ч после фотоиндуцируемого тромбоза префронтальной коры было установлено снижение активности СДГ в перифокальной зоне на 15% по сравнению с интактным контролем. Данный показатель в эти же сроки снижался также у наркотизированных крыс без фототромбоза и составил 8% по сравнению с контрольной группой. Через 24 ч после ишемического повреждения коры снижение активности СДГ в перифокальной зоне усугубилось и составило уже 30% по сравнению с интактным контролем (рисунок). При этом, ингибирующее влияние наркоза, выявленное в ранние сроки, полностью нивелировалось спустя 1 сут. Однократное интраназальное введение Семакса через 1 ч после фототромбоза в дозе 25 мкг/кг повысило активность СДГ до уровня интактного контроля, но эффект был кратковременным и не определялся через 24 ч после ишемического повреждения. Применение 4-разовой суточной схемы введения Семакса с интервалами 6 ч позволило получить устойчивый эффект нормализации активности

СДГ в перифокальной зоне префронтальной коры. На активность СДГ у интактных крыс Семакс не повлиял.

Выявленный на фоне наркоза (через 2 ч после введения хлоралгидрата) срочный эффект снижения активности СДГ, по-видимому, отражает усиление в мозге ГАМК-опосредованных механизмов торможения антагонистических СДГ-стимулирующей катехоламиновой сигнализации. Спустя 24 ч после наркоза этот эффект полностью нивелировался. Наибольшего внимания заслуживает эффект подавления активности СДГ в перифокальной зоне, который прогрессировал во времени и составил 30% через 24 ч после фототромбоза. Снижение оксигенации (гипоперфузия) может привести к угнетению механизмов индукции дыхательных ферментов и снижению общей удельной активности СДГ в области пенумбры [15]. Кроме того, данные могут свидетельствовать об усилении апоптоза в перинфарктной зоне и связанной с ним деградацией митохондрий. Обнаруженный нами в раннем постишемическом периоде (2 ч после фототромбоза) эффект активации СДГ Семаксом и отсутствие этого эффекта через 24 ч после введения может свидетельствовать: 1 — о нормализующем действии препарата на нейротрансмитторный баланс, профиль цитокинов, нейротрофинов и антиоксидантных ферментов, 2 — быстрой метаболизации/деактивации пептида [6].

Таким образом, проведенное исследование позволяет расценивать определение активности СДГ митохондрий перифокальной зоны как перспективный метод оценки тяжести ишемического повреждения мозга и эффективности применяемой нейропротективной те-



Активность СДГ митохондрий префронтальной коры головного мозга при однократном и четырехкратном введением Семакса. По оси ординат представлены данные активности СДГ (нмоль сукцината/мин/мг белка). По оси абсцисс отмечены группы животных. (1) — однократное введение Семакса интраназально в дозе 25 мкг/кг, (4) — четырехкратное введение Семакса интраназально в дозе 25 мкг/кг. \* — данные статистически значимо отличаются от контроля ( $p < 0,05$ ).

рапии. Четырехразовое суточное введение Семакса с острым периоде ишемического повреждения головного мозга позволило получить устойчивый эффект нормализации активности СДГ в перифокальной зоне префронтальной коры.

### Литература

(п.п. 5; 7—10; 12; 13; 15 см. References)

1. Стаховская Л.В., Ключихина О.А., Богатырева М.Д., Коваленко В.В. Эпидемиология инсульта в России по результатам территориально-популяционного регистра (2009-2010). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2013;113(5): 4-10.
2. Тул Дж.Ф., Гусев Е.И. *Сосудистые заболевания головного мозга* /перевод с англ. Под ред. акад. РАМН Е.И. Гусева, проф. А.Б. Гехт. Руководство для врачей: 6 изд. М.; ГЭОТАР-Медиа. 2007.
3. Парфенов В.А. Постинсультная депрессия: распространенность, патогенез, диагностика и лечение. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2012; 4: 84-8.
4. Шакова Ф.М., Калинина Т.И., Гуляев М.В., Романова Г.А. Нейропротективный и антиамнестический эффекты комбинированной терапии на модели фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крысы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 2: 39-45.
6. Гусев Е. И. *Ишемия головного мозга*. М.; Медицина. 2001.
11. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Мартынов М.Ю., Камчатнов П.Р. Церебральный инсульт: проблемы и решения. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2006; 4 (51): 28-32.
14. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)*. Под ред. М.И. Прохоровой. Л.; Изд-во Ленинградского университета, 1982.

### References

1. Stahovskaya L.V., Klochihina O.A., Bogatyreva M.D., Kovalenko V.V. Epidemiology of stroke in Russia according to the results of the territorial-population register (2009-2010). *Journal of Neurology and Psychiatry. S.S Korsakov. [Zhurnal nevrologii i psichiatrii im. S.S. Korsakova]*. 2013; 113(5): 4-10. (In Russian)

2. Tul Dzh.F., Gusev E.I., Ed. Acad. RAMS E.I. Gusev, prof. A.B. Hecht A Guide for Doctors: 6th ed. Moscow; GEOTAR-Media. 2007. (In Russian)

3. Parfenov V.A. Post-stroke depression: prevalence, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics. Nevrologiya, neyropsikhiatriya, psihosomatika*. 2012; 4: 84-8. (In Russian)

4. Shakova F.M., Kalinina T.I., Gulyaev M.V., Romanova G.A. Neuroprotective and antiamnestic effects of combination therapy on a model of photochemical ischemic damage to the rat prefrontal cortex. *Pathological physiology and experimental therapy. [Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya]*. 2018; 2: 39-45. (In Russian)

5. Heiss W.D. Comparison of PET and DW/PW-MRI in acute ischemic stroke. *Keio J. Med.* 2008; 57 (3): 125-31.

6. Gusev E.I. *Ischemia of the brain [Ishemiya golovnogo mozga]*. Moscow; Meditsine. 2001.

7. Changa A. et al. Hypoxic preconditioning attenuated in kainic acid-induced neurotoxicity in rat hippocampus. *Exp. Neur.* 2005; 195(1): 40-8.

8. Chen F. Magnetic resonance diffusion-perfusion mismatch in acute ischemic stroke: an update F. Chen, Y. Ni. *World J. Radiol.* 2012; 4(3): 63-74.

9. Lukyanova L.D., Kirova Yu.I. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Frontiers in Neuroscience*. 2015; 9: 1-15.

10. Farshbaf J.M., Kiani-Esfahani A. Succinate dehydrogenase: Prospect for neurodegenerative diseases. *Mitochondrion* 2018; 42: 77-83.

11. Gusev E.I., Skvorцова V.I., Martynov M.Yu., Kamchatnoe P.R. Cerebral stroke: problems and solutions. *Bulletin of the Russian State Medical University. [Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta]*. 2006; 4 (51): 28-32.

12. Paxinos G., Watson C. Atlas of anatomy of rat brain. In: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd San Diego, Calif. Academic Press Inc; 1997.

13. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985; 17 (5): 497-504.

14. *Methods of biochemical research (lipid and energy metabolism) [Metody biokhimicheskikh issledovaniy (lipidnyy i energeticheskiy obmen)]*. Izd-vo Leningradskogo universiteta, 1982. Ed. M.I. Prokhorovoy. L.; Leningrad publishing house. Univ., 1982.

15. Rutter J., Winge D.R., Schiffman J.D. Succinate Dehydrogenase — Assembly, Regulation and Role in Human Disease. *Mitochondrion* 2010; 10(4): 393-401.

### Сведения об авторах

Романова Галина Александровна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: romanovaga@mail.ru

Кирова Юлия Игоревна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: bioenergy@mail.ru

Засеева А.М., Хугаева В.К.

## Прижизненное изучение состояния микролимфоциркуляторного русла брыжейки тонкой кишки крысы в ответ на применение антибиотиков

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

В условиях биомикроскопии брыжейки тонкой кишки крысы исследована лимфостимулирующая активность наиболее часто используемых в клинической практике антибиотиков. Показано преимущественно тормозное действие отдельных антибиотиков (линкомицин и амикацин) на сократительную активность стенки, клапанов и скорость лимфотока в лимфатических микрососудах (ЛМ). Слабой активностью обладали цефтриаксон, амоксилав и ванкорус. У части ЛМ снижение сократительной активности вызывает нарушение лимфотока, что отражается на работе различных органов и систем. Поскольку нарушение моторики ЛМ влияет на различные функции лимфатической системы (детоксикационная, регуляция водно-электролитного обмена, иммунитета и др.), возникает вопрос о механизмах лечебного действия антибиотиков при воспалении на фоне нарушенного лимфотока и необходимость прижизненного изучения состояния лимфатических сосудов в целостном организме в ответ на антибиотики, применяемые в клинической практике.

**Ключевые слова:** биомикроскопия; антибиотики; лимфатические микрососуды; моторика; скорость лимфотока.

**Для цитирования:** Засеева А.М., Хугаева В.К. Прижизненное изучение состояния микролимфоциркуляторного русла брыжейки тонкой кишки крысы в ответ на применение антибиотиков. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 261—264.

**DOI:**

**Для корреспонденции:** Засеева Алана Моисеевна, e-mail: alzasmoy@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 29.08.2018

Zaseeva A.M., Khugaeva V.K.

## An *in vivo* study of the response to antibiotics of the rat small bowel mesenteric lymphatic microvasculature

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

The lymphostimulating activity of the antibiotics commonly used in clinical practice was studied in the rat small bowel mesentery using biomicroscopy. Some antibiotics (lincomycin and amikacin) mostly exerted an inhibitory effect on contractility of the vascular wall, valves, and lymph flow rate in lymphatic microvessels (LM). Ceftriaxone, amoxiclav, and vancorus had a weak activity. In a part of LM, the decrease in contractile activity impaired the lymph flow, which affected performance of organs and systems. Since the LM dysmotility affects different functions of the lymphatic system (detoxication, regulation of water and electrolyte metabolism, immunity, etc.) it is unclear what mechanisms underlie the therapeutic effect of antibiotics in inflammation associated with impaired lymph flow. This warrants *in vivo* studies of the lymphatic vessel response to the antibiotics used in clinical practice.

**Keywords:** biomicroscopy; antibiotics; lymphatic microvessels; motility; lymph flow rate.

**For citation:** Zaseeva A.M., Khugaeva V.K. An *in vivo* study of the response to antibiotics of the rat small bowel mesenteric lymphatic microvasculature. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 261—264 (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Zaseeva Alana Moiseevna, e-mail: alzasmoy@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

**Received** 29.08.2018

### Введение

Последние десятилетия прошлого и настоящего столетия ознаменовались появлением большого числа исследований, посвященных клинической лимфологии [1]. Лимфотропная и эндолимфатическая терапия цитостатиками при онкологических заболеваниях позволяет острые состояния перевести в хронические, а хронические эффективно излечивать (трофические язвы, гнойно-воспалительные заболевания мягких тканей и др.) [2, 3, 4]. Огромное число терапевтических видов патологии, сопровождающиеся воспалением, также успешно поддаются лечению при использовании антибиотиков, вводимых в лимфатические сосуды (ЛС) или лимфотропным методом, т.е. в область расположения регионарных лимфоузлов (острый разлитой перитонит) [5, 6]. Высокая эффективность эндолимфатической и лимфотропной терапии обусловлена высокой концентрацией лечебного препарата в лимфоузлах — области максимального скопления метастазов опухолевых клеток и инфекционных микроорганизмов, а также снижением интоксикации целостного организма применяемым препаратом.

В ранее опубликованных работах имеются различные мнения о влиянии антибиотиков на моторику ЛС. В работе [7] на изолированных фрагментах ЛС крупного рогатого скота (быка) показано тормозное действие антибиотиков из группы цефалоспоринов (клафоран) и аминогликозидов (гентамицина сульфат) на моторику ЛС. В других исследованиях [8—10] показаны различные влияния антибиотиков (амикацин и цефтриаксон) на сократимость ЛС: выявлено, что низкие концентрации стимулируют сократительную активность лимфангионов, высокие концентрации — угнетают моторику ЛС.

**Цель исследования** — изучение влияния антибиотиков на сократительную активность стенки, клапанов и скорость лимфотока в лимфатических сосудах (ЛМ).



Доля ЛМ брыжейки тонкой кишки крысы реагирующих на аппликацию антибиотиков (от общего числа исследованных ЛМ).

### Методика

Эксперименты были поставлены на 17 беспородных крысах-самцах массой 200—250 г. В качестве наркоза использовали 8% раствор хлоралгидрата из расчета 0,6 г/кг в 0,9%-ном растворе NaCl при внутримышечном введении. Микроциркуляцию в кровеносных и ЛМ изучали в брыжейке тонкой кишки крысы в условиях биомикроскопии [11]. Моторику ЛМ брыжейки регистрировали методом фотометрии [12] и с помощью секундомера при редких сокращениях. Оценивали сократительную активность стенки и клапанов ЛМ по следующим параметрам: латентный период от момента аппликации антибиотика до начала сокращения стенки или клапана ЛМ, продолжительность сокращения, частоту сокращений за 1 мин на протяжении эксперимента. При отсутствии сокращения наблюдение продолжалось 15—30 мин. Скорость лимфотока определяли визуально:

(—) — отсутствие лимфотока, лимфостаз;

(+) — слабая активность соответствовала маятникообразному движению лимфы без продвижения в центральном направлении;

(++) — средняя активность: маятникообразное движение лимфы с продвижением в центральном направлении;

(+++ ) — интенсивный лимфоток характеризовался непрерывным движением лимфы.

Вследствие того, что ЛМ обладают различной чувствительностью к экспериментальным воздействиям в зависимости от их топографии в брыжейке тонкой кишки, исследовали микрососуды, расположенные на границе жировой ткани с прозрачной частью брыжейки. Эксперименты проводили на исходно несокращающихся ЛМ.

### Результаты и обсуждение

В контроле стенка и клапаны ЛМ брыжейки не функционируют или сокращаются периодически с частотой сокращения не превышающей 5—10 сокращений в минуту на протяжении 5—10 мин. В ответ на аппликацию антибиотиков максимальное количество реагирующих сосудов не превышало 30% от общего числа исследованных ЛМ каждой группы (рисунок).

В ряду исследованных антибиотиков наиболее выраженный ответ ЛМ наблюдали при аппликации цефтриаксона: сокращения регистрировали у 29% исследованных ЛМ. Максимальная частота сокращений этих ЛМ составляла  $2,0 \pm 0,9$  в минуту. Продолжительность периода ответа составила  $2,0 \pm 0,7$  мин. Антибиотики амоксициллин и ванкомицин вызывали сокращение стенок еще меньшего количества ЛМ — 19% от исследованных ЛМ, с частотой

Таблица

## Сократительная активность ЛМ брыжейки тонкой кишки крысы в ответ на аппликацию антибиотиков

Название препарата	Сократительная активность ЛМ						Скорость лимфотока *
	Стенка			Клапан			
	1	2	3	1	2	3	
Амоксиклав	2,0 ± 1,1	13,0 ± 2,7	8,0 ± 1,8	—	—	—	+++
Цефтриаксон	4,0 ± 1,1	2,0 ± 0,9	2,0 ± 0,7	—	—	—	++
Ванкорус	2,0 ± 1,2	15,0 ± 2,9	5,0 ± 2,6	—	—	—	+++
Амикацин	—	—	—	—	—	—	—
Линкомицин	6,0 ± 0,1	11,0 ± 0,1	4 ± 0	—	—	—	++

Примечание. 1 — латентный период в минутах; 2 — частота сокращений в минуту; 3 — продолжительность сокращения ЛМ в минутах; \* — расшифровка в разделе "Материалы и методы"

сокращений  $13,0 \pm 2,7$  и  $15,0 \pm 2,9$  в мин и продолжительностью  $8,0 \pm 1,8$  и  $5,0 \pm 2,6$  мин соответственно. Линкомицин активировал наименьшее количество ЛМ — 11%, с частотой сокращений 11,0 и продолжительностью 4,0 мин во всех регистрациях. Амикацин практически не влиял на моторику ЛМ.

Клапаны ЛМ в ответ на аппликацию всех исследованных антибиотиков не сокращались (таблица).

### Выводы

Наиболее часто применяемые в клинической практике антибиотики не обладают лимфостимулирующей активностью, поскольку воздействуют лишь на незначительное число ЛМ, не превышающее 30% исследованных сосудов. Сравнивая полученные результаты, можно сказать, что при большем количестве реагирующих на аппликацию антибиотика сосудов они способны к меньшей частоте сокращения, но с большей длительностью активации, а при меньшем числе активированных ЛМ имеет место увеличение частоты и длительности сокращения ЛМ, что свидетельствует об одинаковом слабом влиянии их на лимфоток.

Полученные результаты требуют рационального подхода при подборе антибиотиков при состояниях, сопровождающихся отеками и застойными явлениями в легких и других органах и тканях.

### Литература

1. Левин Ю.М. *Основы общеклинической лимфологии и эндоэкологии*. Вып. X. М.; ОАО Щербинская типография; 2003.
2. Мельников В.В., Юсупов И.А., Абдулаева З.Ш., Бекбаев А.З., Астахин В.А. Эндолимфатическое, лимфотропное введение антибиотиков и лимфатическая терапия при комплексном лечении гнойно-септических осложнений у больных с различными видами парентеральной наркоманией. *Limpha*. 2017; 4: 62.
3. Москаленко В.И., Москаленко В.В. Применение методов лимфатической терапии в военно-полевых условиях. *Limpha*. 2017; 4: 45.

4. Саидоходжаева Д.Г., Хакимов В.А., Джумабаев Э.С., Курбанов Х.А., Азизов Г.А. Лимфотропная терапия в комплексном лечении трофических язв. *Limpha*. 2018; 2: 72.

5. Курбанов Х.А., Джумабаев Э.С., Пакирдинова А.С., Суянов Д.М. Влияние современных антибиотиков на сократительную активность лимфатических сосудов при перитоните. *Limpha*. 2017; 3: 34.

6. Эгамов Ю.С., Худайбергенев П.К., Эгамов Б. Ю. Эффективность лимфотропной терапии при остром разлитом перитоните. *Limpha*. 2018; 2: 84-5.

7. Андреевская М.В., Булатова И.А. *Влияние антибиотиков на транспортную функцию и структуру лимфангионов*. Материалы IV съезда лимфологов России, Москва, 15-17 сентября 2011; 506.

8. Авраменко Е.А., Егорова А.А., Петунов С.Г., Чеминава Р.В. Влияние современных антибиотиков на моторику лимфатических сосудов в норме и при экспериментальном перитоните. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина*. 2011; 11(3): 119-25.

9. Авраменко Е.А., Петунов С.Г., Чеминава Р.В. Влияние амикацина и цефтриаксона на моторику лимфатических сосудов и узлов в норме и при экспериментальном перитоните. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2011; 10(1): 83-8.

10. Нечайкина О.В., Петунов С.Г., Егорова А.А., Авраменко Е.А. Обоснование эффективности эндолимфатической и лимфотропной антибиотикотерапии при остром перитоните. *Limpha*. 2018; 2: 64-5.

11. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. *Микроциркуляция*. М.; Медицина, 1984.

12. Александров П.Н., Хугаева В.К. Метод прижизненной регистрации сокращения стенок и клапанов лимфатических микрососудов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1989; 33(4): 65-7.

### References

1. Levin Yu.M. *Basics of general clinical lymphology and endoecology: Vol. X. [Osnovy obshcheklinicheskoy limfologii i endoekologii. Вып. X]*. Moscow; Scherbinskaya printing house; 2003. (in Russian)
2. Melnikov V.V., Yusupov I.A., Abdulaeva Z.Sh., Bekbaev A.Z., Astakhin V.A. Endolymphatic, lymphotropic administration of antibiotics and lymphatic therapy in the complex treatment of purulent septic complications in patients with various types of parenteral addiction. *Limfa. [Lymph]*. 2017; 4: 22. (in Russian)

3. Moskalenko V.I., Moskalenko V.V. [The use of methods of lymphatic therapy in the military field]. *Limfa. [Lymph]*. 2017; 4: 45. (in Russian)
4. Saidokhadzhayeva DG, Khakimov V.A., Dzhumabaev E.S., Kurbanov Kh.A., Azizov G.A. Lymphotropic therapy in the complex treatment of trophic ulcers. *Limfa. [Lymph]*. 2018; 2: 72 (in Russian)
5. Kurbanov Kh.A., Dzhumabaev E.S., Pakirdinova A.S., Suyunov D.M. The effect of modern antibiotics on the contractile activity of lymphatic vessels in peritonitis. *Limfa. [Lymph]*. 2017; 3: 34. (in Russian)
6. Egamov Yu.S., Khudaibergenov P.K., Egamov B.Yu. Effectiveness of lymphotropic therapy in acute diffuse peritonitis. *Limfa. [Lymph]*. 2018; 2: 84-5. (in Russian)
7. Andreevskaya M.V., Bulatova I.A. *Influence of aminoglycosides, cephalosporins on the transport function and structure of lymphangions. Proceedings of IV Congress of Russian Lymphologists, Moscow, September 15-17. [Vliyaniye aminoglikozidov, tsefalosporinov na transportnuyu funktsiyu i strukturu limfangionov. Materialy IV s'ezda limfologov Rossii, Moskva, 15-17 sentyabrya 2011]*. 506. 2011. (in Russian)
8. Avramenko E.A., Egorova A.A., Petunov S.G., Chemina R.V. The effect of modern antibiotics on the motility of the lymphatic vessels in normal and experimental peritonitis. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Meditsina. [Bulletin of St. Petersburg University. Meditsine]*. 2011; 11 (3): 119-25. (in Russian)
9. Avramenko E.A., Petunov S.G., Chemina R.V. The effect of amikacin and ceftriaxone on the motility of the lymphatic vessels and nodes in normal and experimental peritonitis. *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya. [Regional blood circulation and microcirculation]*. 2011; 10 (1): 83-8. (in Russian)
10. Nechaykina OV, Petunov S.G., Egorova A.A., Avramenko E.A. Justification of the effectiveness of endolymphatic and lymphotropic antibiotic therapy for acute peritonitis. *Limfa. [Lymph]*. 2018; 2: 64-5. (in Russian)
11. Chernukh A.M., Aleksanrov P.N., Alekseev O.V. *Microcirculatio [Mikrotsirkulyatsiya]*. Moscow; Meditsine, 1984. (in Russian)
12. Aleksandrov P.N., Khugaeva V.K. Method of intravital registration of the contraction of the walls and valves of lymphatic microvessels. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. Pathological physiology and experimental therapy*. 1989; 33 (4): 65-7. (in Russian)

#### Сведения об авторах

Засеева Алана Моисеевна, мл. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП;

Хугаева Валентина Каргоевна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП.



Сабурина И.Н.<sup>1,2</sup>, Джуссоева Е.В.<sup>1</sup>, Горкун А.А.<sup>1,2,4</sup>, Зурина И.М.<sup>1,2,4</sup>, Кошелева Н.В.<sup>1,2,3</sup>, Колокольцова Т.Д.<sup>1,2</sup>, Скуратовская Л.Н.<sup>1</sup>, **Репин В.С.**<sup>1</sup>

## 3D культура меланоцитов как тест-система и клеточная модель для изучения патологии меланогенеза

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 123995, Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова». 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1

<sup>4</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Функциональная активность меланоцитов обуславливает защитные свойства кожи против воздействия ультрафиолета, вызывающего фотостарение. Однако изучение меланоцитов *in vivo* затруднено тем, что необходимо использовать животные модели и трудоемкие методы анализа, а культивирование клеток в монослойной культуре *in vitro* сопряжено с потерей тканеспецифичных маркеров клеток. Данная работа посвящена получению и изучению сфероидов из меланоцитов, так как 3D культивирование меланоцитов в виде сфероидов может сохранить их фенотип и функциональность. Исследование проводили на первичной культуре меланоцитов кожи человека. Клетки культивировали в монослое в полной ростовой среде до 4 пассажа. Далее клетки помещали на агарозные планшеты с микролунками в посевной плотности  $3,3 \times 10^6$  кл./мл. Анализ полученных сфероидов производили с помощью фотометрии, иммуноцитохимии и ПЦР в реальном времени. Было показано, что, при культивировании в монослое, к 4 пассажу снижалось количество синтезируемого меланина. Тогда как в 3D условиях меланоциты формировали компактные сфериды, внутри которых в процессе культивирования не только сохранялся синтез, но и накапливался меланин. Была выявлена экспрессия специфических генов TYR и MCR1, и увеличивался синтез белков, участвующих в меланогенезе — grp100 и MITF. Таким образом, в данном исследовании было показано, что меланоциты *in vitro* способны формировать длительно живущие, жизнеспособные 3D структуры — сфериды, с сохранением фенотипа и синтеза тканеспецифичных маркеров. Поэтому данные сфериды могут быть успешно использованы как тест-системы для оценки эффективности препаратов, направленных на регуляцию уровня пигментации кожи.

**Ключевые слова:** меланоциты; сфериды; тест-система.

**Для цитирования:** Сабурина И.Н., Джуссоева Е.В., Горкун А.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Колокольцова Т.Д., Скуратовская Л.Н., Репин В.С. 3D культура меланоцитов как тест-система и клеточная модель для изучения патологии меланогенеза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 265—268.

DOI:

**Для корреспонденции:** Горкун Анастасия Алексеевна, e-mail: stgork@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 24.08.2018

Saburina I.N.<sup>1,2</sup>, Dzhusssoeva E.V.<sup>1</sup>, Gorkun A.A.<sup>1,2,4</sup>, Zurina I.M.<sup>1,2,4</sup>, Kosheleva N.V.<sup>1,2,3</sup>, Kolokoltsova T.D.<sup>1,2</sup>, Skuratovskaya L.N.<sup>1</sup>, **Repin V.S.**<sup>1</sup>

## 3D cell culture of melanocytes as a test-system and a cellular model for studying pathology of melanogenesis

<sup>1</sup> FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russian Federation

<sup>3</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University. Leninskie Gory 1, Moscow 119991, Russian Federation

<sup>4</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russian Federation

The functional activity of melanocytes determines protective properties of the skin against the effect of ultraviolet radiation, which causes photo-aging. However, studying melanocytes *in vivo* and in an *in vitro* monolayer culture is difficult because animal models and laborious analytical methods are required, and the culturing is associated with loss of tissue-specific cell markers. Since 3D cultivation of melanocytes in the form of spheroids can preserve their phenotype and functionality, this work focused on obtaining and studying melanocyte spheroids. The study was conducted using a primary culture of human skin melanocytes. Cells were cultured in a monolayer to the fourth passage. Then these cells were placed in agarose plates with microwells at the cell suspension concentration of  $3.3 \times 10^6$  cells/ml. Spheroids were characterized using photometry, immunocytochemical staining, and real-time PCR. The amount of synthesized melanin gradually reduced to the fourth passage of melanocyte monolayer culture. When melanocytes were transferred to the 3D conditions in non-adhesive agarose plates they aggregated and formed compact spheroid structures, in which the amount of melanin was elevated. Real-time PCR demonstrated the expression of tyrosinase (TYR) and MCR1. According to immunocytochemical staining cells in spheroids also expressed the tissue-specific markers: gp100, MITF, and Sox10. Therefore, this study showed that in a non-adherent culture, melanocytes are able to form long-lasting, viable 3D spheroid structures, in which the cells maintain their initial phenotype and synthesis of tissue-specific markers *in vitro*. These features make the melanocyte spheroids a convenient test-system for studying toxicity and efficiency of drugs targeted at regulation of skin pigmentation.

**Keywords:** melanocytes; spheroids; test-system.

**For citation:** Saburina I.N., Dzhussioeva E.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Kolokoltsova T.D., Skuratovskaya L.N., Repin V.S. 3D cell culture of melanocytes as a test-system and a cellular model for studying pathology of melanogenesis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 265—268 (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Gorkun Anastasiya Alekseevna, e-mail: stgork@gmail.com

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

**Received** 24.08.2018

## Введение

Воздействие ультрафиолета (УФ) на кожу человека вызывает фотостарение, что сопровождается снижением ее защитных свойств, появлением глубоких морщин и пигментных пятен, пожелтением, дряблостью и сухостью кожи, телеангиоэктазией, предопухоловыми поражениями, атрофией, эластозом и актинической пурпурой [1]. Защитные свойства кожи человека в отношении УФ прямо коррелируют с функциональной активностью меланоцитов, которую можно исследовать *in vitro*. Считается, что меланоциты — это терминально дифференцированная клеточная популяция, поэтому их длительное культивирование в виде монослойной 2D культуры затруднено. Однако в настоящее время идет активное развитие 3D клеточных технологий, целью которых является получение тканеподобных структур с сохранением тканеспецифичной функциональной активности для последующего применения их не только в тканевой инженерии и клеточной терапии, но и для высокоэффективного тестирования фармацевтических препаратов [2]. Наиболее распространенными подходами к 3D культивированию на сегодняшний день являются: культивирование клеточных сфероидов и органоидов в неадгезивных условиях, культивирование клеток на матриксах и гелях, а также технологии «орган-на-чипе» и трехмерная биопечать. Из перечисленных вариантов исследователи особенно выделяют модель клеточных сфероидов,

преимуществом которой является возможность быстрого и простого получения для анализа массива тканеподобных модулей стандартного размера [3]. В настоящее время уже созданы модели клеточных сфероидов, позволяющие изучать воздействие препаратов на фибробласты кожи [4] и репаративную активность клеток после повреждения [5]. При разработке биотрансплантата для терапии витилиго на основе хитозана была выявлена способность меланоцитов агрегировать друг с другом [6], однако при этом не были изучены экспрессия генов и синтез белков, специфичных для меланоцитов. Поэтому представленная работа является актуальной и посвящена получению и характеристике сфероидов из меланоцитов кожи человека.

## Методика

Исследование проводили на первичной культуре меланоцитов кожи человека (104-05N, CELL Applications) в стандартных условиях инкубирования ( $+37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Клетки культивировали в монослое в полной ростовой среде, адаптированной для меланоцитов (135-500, CELL Applications), до 4 пассажа. Далее клетки помещали на агарозные планшеты с микролунками (Microtissue, США) в посевной плотности  $3,3 \times 10^6$  кл./мл. Культивировали клетки в течение 7 суток. В монослойной культуре и сфероидах из меланоцитов анализировали количество

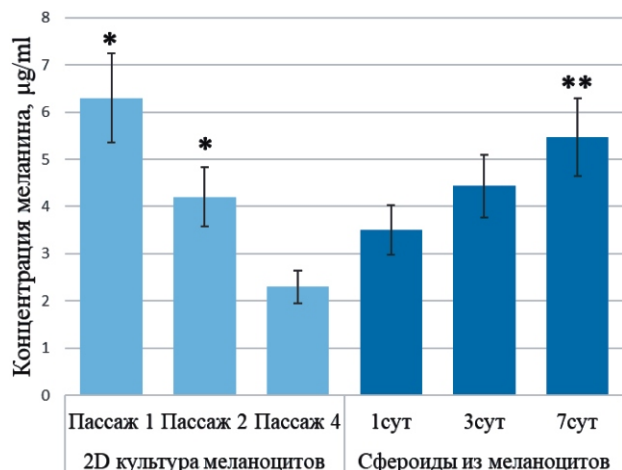


Рис. 1. Динамика накопления меланина в сфероидов из меланоцитов \* —  $p < 0,05$  в сравнении с группой «Пассаж 4»; \*\* —  $p < 0,05$  в сравнении с группой 1 сут. сфероидов (однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением метода множественных сравнений).

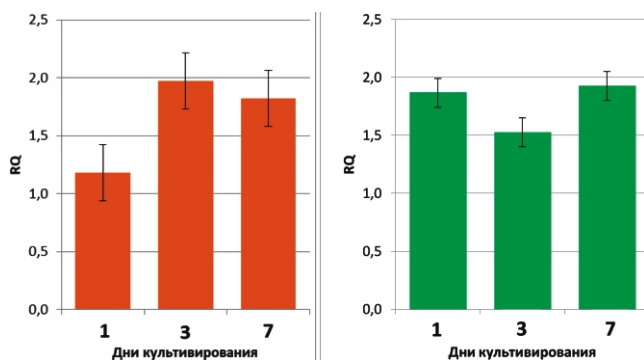


Рис. 2. Экспрессия генов MCR1 (оранжевые столбики) и TYR (зелёные столбики) в сфероидов. Приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение. Метод ПЦР в реальном времени, RQ — относительные единицы, данные нормализовали по репортерному гену TBP.

меланина с помощью фотометрии, синтез белков gp100, MITF и Sox10, используя методы иммуноцитохимии и лазерной конфокальной сканирующей микроскопии. Методом ПЦР в реальном времени анализировали экспрессию генов фермента меланогенеза тирозиназы (TYR) и основного рецептора, регулирующего синтез меланина, MCR1.

## Результаты и обсуждение

Первичная культура была представлена клетками вытянутой формы, имеющими от двух до четырех отростков, которые пролиферировали с индексом пролиферации не более 1,5 и активно синтезировали меланин. Однако, при культивировании меланоцитов в монослое, к 4 пассажу снижалось количество синтезируемого меланина. При переводе культуры в 3D условия культивирования на агарозных планшетах

меланоциты агрегировали друг с другом и формировали компактные сфероиды. При этом к 7 сут. 3D культивирования происходило накопление меланина внутри сфероидов (рис. 1).

С помощью иммуноцитохимии было установлено, что клетки в сфероидов также экспрессировали тканеспецифические маркеры: gp100, MITF и Sox10. При анализе экспрессии транскрипционных факторов меланогенеза, было установлено, что в сфероидов экспрессия gp100, как и транскрипционного фактора MITF увеличивалась уже к 3 суткам культивирования, достигая максимума к 7 суткам. Фактор Sox10 экспрессировался во всех клетках сфероидов с 1 суток культивирования и незначительно увеличивался к 7 суткам культивирования. Методом ПЦР в реальном времени была выявлена экспрессия генов фермента меланогенеза тирозиназы (TYR) и основного рецептора, регулирующего синтез меланина, MCR1, которая с небольшими отклонениями сохранялась на протяжении 7 суток культивирования (рис. 2).

## Заключение

Таким образом, в данном исследовании было показано, что меланоциты *in vitro* способны формировать длительно живущие, жизнеспособные 3D структуры — сфероиды, с сохранением фенотипа клеток и синтеза тканеспецифических маркеров. Поэтому данные сфероиды могут быть успешно использованы как тест-системы для оценки эффективности препаратов, направленных на регуляцию уровня пигментации кожи.

## Литература

### (п.п. 1—3; 5; 6 см. References)

4. Кожина К.В., Сабурова И.Н., Горкун А.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Волкова Е.Н., Морозов С.Г. Сравнительный анализ воздействия p199 на 2D и 3D культуру дермальных фибробластов человека. *Патогенез*. 2015; 13(4): 34-40.

## References

- Helfrich Y.R., Sachs D.L., Voorhees J.J. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol. Nurs.* 2008; 20(3): 177-183.
- Langhans S.A. Three-Dimensional *In Vitro* Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front. Pharmacol.* 2018; 9: 6. DOI:10.3389/fphar.2018.00006
- Fang Y., Eglon R.M. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. *SLAS Discov.* 2017; 22(5): 456-72. DOI: 10.1177/1087057117696795
- Kozhina K.V., Saburina I.N., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Volkova E.N., Morozov S.G. [Comparative analysis of P199 influence on 2D and 3D culture of human dermal fibroblasts]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2015; 13(4): 34-40. (in Russian)

5. Kosheleva N.V., Ilina I.V., Zurina I.M., Roskova A.E., Gorkun A.A., Ovchinnikov A.V., Agranat M.B., Saburina I.N. Laser-based technique for controlled damage of mesenchymal cell spheroids: a first step in studying reparation in vitro. *Biol. Open*. 2016; 15: 017145. DOI: 10.1242/bio.017145

6. Lin S.J., Jee S.H., Hsiao W.C., Yu H.S., Tsai T.F., Chen J.S., Hsu C.J., Young T.H. Enhanced cell survival of melanocyte spheroids in serum starvation condition. *Biomaterials*. 2006; 27(8): 1462-9. DOI:10.1016/j.biomaterials.2005.08.031

#### Сведения об авторах:

*Сабурина Ирина Николаевна*, доктор биол. наук, зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; проф. группы регенеративной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

*Джусоева Екатерина Витальевна*, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП;

*Горкун Анастасия Алексеевна*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; ассистент каф. биохимии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; ст. науч. сотр. Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первый МГМУ И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);

*Зурина Ирина Михайловна*, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; науч. сотр. группы регенеративной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; науч. сотр. Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первый МГМУ И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);

*Кошелева Настасья Владимировна*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; ст. науч. сотр. группы регенеративной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; доцент каф. эмбриологии биологического факультета ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова»;

*Колокольцова Тамара Дмитриевна*, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; руководитель группы регенеративной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

*Скуратовская Лариса Николаевна*, канд. мед. наук, ученый секретарь ФГБНУ НИИОПП;

*Репин Вадим Сергеевич*, доктор биол. наук, член-корр. РАН, гл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП.

Егорова Е.М., Каба С.И.

## Коррекция контроля токсичности стабилизатора в исследовании действия наночастиц серебра на клетки Jurkat

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

С помощью тетразолиевого теста (МТТ) определяли токсичность для клеток Jurkat анионного ПАВ (АОТ), используемого в качестве стабилизатора наночастиц серебра (НЧС). Целью работы была проверка правильности контроля токсичности стабилизатора по его раствору в воде с концентрацией, равной таковой в растворе НЧС. Сравнивали жизнеспособность клеток после инкубации с одинаковыми разведениями исходного раствора АОТ в дистиллированной воде и в модельном растворе нитрата калия с той же ионной силой, что и в опытном растворе наночастиц. Показано, что токсичность АОТ увеличивается при увеличении ионной силы исходного раствора, что может быть обусловлено изменением соотношения молекул и мицелл этого ПАВ. Сделан вывод, что контроль токсичности заряженного ПАВ, используемого в качестве стабилизатора наночастиц, следует проводить с учетом различия его критической концентрации мицеллообразования в воде и в растворе наночастиц.

**Ключевые слова:** наночастицы серебра, цитотоксичность стабилизатора, анионный ПАВ.

**Для цитирования:** Егорова Е.М., Каба С.И. Коррекция контроля токсичности стабилизатора в исследовании действия наночастиц серебра на клетки Jurkat. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 269—272.

**DOI:**

**Для корреспонденции:** Егорова Елена Михайловна, e-mail: emenano@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 22.08.2018

Egorova E.M., Kaba S.I.

## Correction of the toxicity control for stabilizer in studies of the silver nanoparticle effect on Junkat cells

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Toxic effect of anionic surfactant (AOT) used as stabilizer of silver nanoparticles (AgNPs) was determined on Jurkat cells by means of tetrazolium salt (MTT) assay. The purpose was to check the validity of the control of stabilizer toxicity by using its water solution with concentration equal to that in AgNPs solution. Cell viability was compared after the incubation with equal dilutions of AOT stock solutions in water and in model potassium nitrate solution with ionic strength equal to that in AgNPs solution. It is shown that AOT toxicity increases with the increase of ionic strength of the stock solution, presumably because of the change of monomer/micelle relation of this surfactant. The conclusion is that, for the correct control of the cytotoxicity of charged surfactant used as nanoparticle stabilizer one should consider the difference in its critical micelle concentration between water and nanoparticle solution.

**Keywords:** silver nanoparticles; cytotoxicity of stabilizer; anionic surfactant.

**For citation:** Egorova E.M., Kaba S.I. Correction of the toxicity control for stabilizer in studies of the silver nanoparticle effect on Junkat cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 269—272 (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Egorova Elena Mikhailovna, e-mail: emenano@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

**Received** 22.08.2018

## Введение

В последние годы в исследованиях токсичности наночастиц металлов на клетках *in vitro* обращается внимание на необходимость контроля токсичности поверхностно-активных веществ (ПАВ), используемых для стабилизации наночастиц. Наночастицы используются в виде водных растворов, в которых, помимо самих наночастиц, присутствуют также другие компоненты, вводимые в систему или образующиеся в процессе синтеза, включая стабилизатор в заметных концентрациях. Как отмечено недавно в работе [1], раствор наночастиц представляет собой скорее смесь наночастиц со стабилизаторами и сосуществующими с ними молекулами. Под стабилизаторами здесь имелись в виду ПАВ, которые, как показано в ряде исследований растворов наночастиц золота и серебра [2—4], оказывали токсическое действие на клетки. Между тем, контрольные эксперименты с растворами стабилизаторов не всегда считаются обязательными, даже в тех случаях, когда ставится задача определить влияние состава стабилизирующей оболочки на биологическое действие наночастиц [5]. Таким образом, в исследованиях цитотоксичности растворов наночастиц возникает необходимость выяснения механизма действия на клетки не только наночастиц, но и самого стабилизатора как индивидуального компонента. При этом следует также иметь в виду, что водные растворы ПАВ (в том числе и применяемых при синтезе наночастиц) уже давно используются для других целей, прежде всего в медицине в качестве противовирусных и антибактериальных средств и механизм их действия представляет интерес для повышения их эффективности и уменьшения опасности негативных последствий [6, 7].

В наших исследованиях токсический эффект стабилизатора был выявлен при действии растворов наночастиц серебра (НЧС), стабилизированных анионным ПАВ (аэрозолем-ОТ, АОТ) на культуры нормальных и злокачественных клеток [8—10]. Токсичность АОТ определяли по результатам параллельных измерений жизнеспособности клеток при инкубации с наночастицами и водными растворами АОТ в тех же исходных концентрациях и разведениях, что и в опытах с наночастицами. При этом предполагалось, как и в подобных же экспериментах, известных из литературы, что использование водного раствора ПАВ в той же концентрации, что и в растворе наночастиц, позволяет правильно оценить отличие действия стабилизатора и самих наночастиц. Однако в ходе недавних исследований цитотоксичности НЧС на клетках Jurkat мы привлекли имеющиеся в литературе данные о связи цитотоксичности некоторых ПАВ (в том числе по структуре родственных АОТ) с величиной их критической концентрации мицеллообразова-

ния (ККМ) [6]. Поскольку известно, что ККМ заряженных ПАВ зависит от ионной силы раствора, а ионный состав раствора наночастиц отличен от такового для дистиллированной воды, возник вопрос, насколько отличаются значения ККМ нашего стабилизатора в воде и в растворе наночастиц и насколько значительно может быть соответствующее различие в токсичности стабилизатора. Поскольку ККМ для АОТ невозможно измерить непосредственно в растворе наночастиц, мы использовали для этого модельный раствор, подходящий по ионному составу и с ионной силой, равной таковой в растворе наночастиц.

*Целью настоящей работы* была проверка правильности контроля токсичности стабилизатора по его раствору в воде с концентрацией, равной таковой в исследуемом растворе НЧС. Для этого было проведено сравнение токсичности раствора АОТ в дистиллированной воде и в модельном растворе нитрата калия с той же ионной силой, что и в растворе наночастиц. Вначале определяли ККМ для АОТ в дистиллированной воде и в модельном растворе, затем оценивали изменение жизнеспособности клеток Jurkat после инкубации с этими растворами АОТ с помощью МТТ теста.

## Методика

*Приготовление растворов АОТ.* Исследовали 3 мМ растворы АОТ (бис(2-этилгексил) сульфосукцината натрия, 96%, «Merck», Германия), которые служили в качестве контрольных при инкубации клеток с растворами НЧС, синтезированных в водном растворе по недавно разработанной процедуре [11] с 3 мМ АОТ в качестве стабилизатора. Готовили растворы АОТ в воде и в растворе  $KNO_3$  (х.ч., «Рехахим», Россия); использовали дистиллированную воду, как и при синтезе НЧС.

*Определение ККМ для АОТ в воде и в растворах  $KNO_3$ .* Для определения ККМ проводили измерения электропроводности на кондуктометре HI 8733 («Hanna Instruments», США). Значения ККМ находили из зависимостей электропроводности от концентрации АОТ, вводимого из концентрированного (20 мМ) раствора в воду или в 8 мМ раствор нитрата калия, используемый в качестве модельного для определения ККМ АОТ в растворе НЧС.

Выбор  $KNO_3$  был обусловлен тем, что эта соль позволяла минимизировать отклонения от ионных взаимодействий в растворе НЧС, которые могли влиять на цитотоксичность АОТ: ионы  $NO_3^-$  были те же, что и в растворе НЧС, а ионы  $K^+$ , согласно литературным данным, имеют низкую константу связывания с ионизуемыми группами анионных ПАВ [12],

что обеспечивает их слабое влияние на подвижность молекул или мицелл АОТ. Для определения нужной концентрации раствора  $\text{KNO}_3$  вначале измеряли электропроводность раствора НЧС на приборе «ZetaPALS» («Brookhaven Instruments», США), затем готовили раствор  $\text{KNO}_3$  с концентрацией, при которой его электропроводность была равна электропроводности раствора НЧС. Для НЧС с 3 мМ АОТ концентрация  $\text{KNO}_3$  была равна 8 мМ.

**Инкубация клеток с растворами АОТ.** Клетки Jurkat получали из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), субкультивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, как описано ранее [10], высевали на 96-луночный планшет в концентрации  $2,5 \times 10^5$  кл./мл и выращивали 21 час. Затем клетки инкубировали с растворами АОТ в воде или в 8 мМ  $\text{KNO}_3$ . Растворы АОТ вводили в лунки из исходных 3 мМ растворов в разведениях, соответствующих разведениям раствора НЧС с 3 мМ АОТ, при которых получали концентрации НЧС в диапазоне 1—7 мкг/мл с интервалом в 1 мкг/мл. Затем среду с клетками и растворами АОТ перемешивали и инкубировали 24 часа при 37°C. В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду и 8 мМ  $\text{KNO}_3$ .

**Определение жизнеспособности клеток после инкубации с растворами АОТ.** Жизнеспособность клеток оценивали с помощью стандартного теста МТТ с незначительными изменениями, как описано ранее в [10]. После инкубации среду с АОТ удаляли из планшета, клетки промывали фосфатно-солевым буфером и помещали в свежую среду. Раствор МТТ вводили в каждую лунку до концентрации 500 мкг/мл. Клетки инкубировали 4 часа, затем среду заменяли на диметилсульфоксид (100 мкл на лунку). Оптическую плотность раствора формазана измеряли при 544 нм на фотометре «Chameleon V» («Hidex», Финляндия). Жизнеспособность клеток определяли как отношение оптической плотности опытных и контрольных клеток, инкубированных с водой (в %).

## Результаты и обсуждение

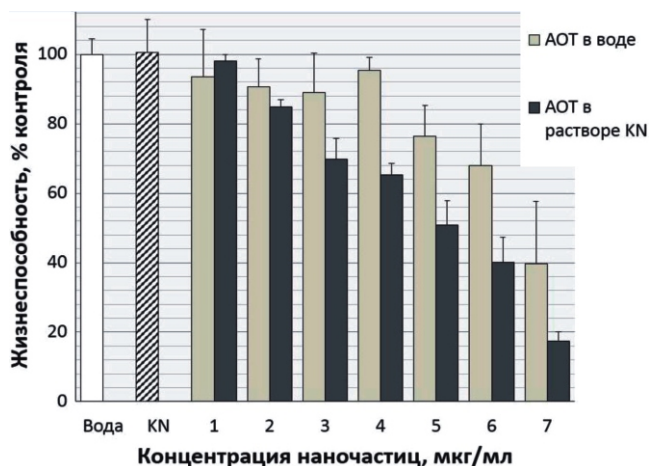
Результаты измерений жизнеспособности клеток после инкубации с растворами АОТ в воде и 8 мМ  $\text{KNO}_3$  показаны на рисунке. В обоих случаях концентрации АОТ в клеточной среде были одинаковыми и соответствовали разведениям раствора НЧС до концентраций наночастиц, указанных на оси абсцисс. Как видно из рисунка, практически во всем исследованном диапазоне концентраций (кроме наименьшей, соответствующей разведению НЧС до 1 мкг/мл) АОТ, введенный из раствора в нитрате калия, является более токсичным,

чем введенный из раствора в воде. При этом контрольные измерения демонстрируют полное отсутствие токсичности 8 мМ раствора  $\text{KNO}_3$ .

По нашему мнению, причиной наблюдаемого различия в токсичности растворов АОТ может быть различие в величинах ККМ: по результатам наших измерений ККМ для АОТ в воде и 8 мМ  $\text{KNO}_3$  оказалась равной соответственно 2,81 мМ и 1,7 мМ. Отсюда следует, что, при одинаковой общей концентрации АОТ (3 мМ), эти растворы заметно различаются по соотношению концентраций его молекул (мономеров) и мицелл. А именно, в водном растворе это отношение равно  $2,81/0,19 = 14,79$ , тогда как в растворе нитрата калия оно составляет  $1,7/1,3 = 1,3$ . Иначе говоря, в водном растворе АОТ присутствует почти исключительно в виде мономеров, тогда как в растворе  $\text{KNO}_3$  концентрация мицелл лишь немногим меньше, чем концентрация мономеров. Таким образом, увеличение токсичности АОТ может быть следствием увеличением вклада мицелл, что указывает на их более высокую токсичность для клеток.

## Заключение

Сравнение действия на жизнеспособность клеток Jurkat стабилизатора наночастиц (АОТ) путем инкубации с разведениями его исходных растворов в воде и в 8 мМ нитрате калия показало, что токсичность стабилизатора зависит от ионной силы исходного раствора. Предполагается, что такая зависимость обусловлена изменением соотношения молекул и мицелл АОТ в исходном растворе; отсюда вытекает, что в механизмах действия ПАВ на клетки важную роль может играть соотношение двух основных форм его



Влияние растворов АОТ в воде и 8 мМ  $\text{KNO}_3$  на жизнеспособность клеток Jurkat. По оси абсцисс указаны концентрации НЧС, соответствующие разведениям используемых растворов АОТ. Контроль — дистиллированная вода и 8 мМ  $\text{KNO}_3$  (KN).

существования в растворе. Полученные данные дают основание заключить, что контроль токсичности заряженного ПАВ, используемого в качестве стабилизатора наночастиц, следует проводить с учетом различия его ККМ в воде и в растворе наночастиц.

### Литература (п.п. 1—9 см. References)

10. Каба С.И., Соколовская А.А., Глупова З.А., Егорова Е.М. Цитотоксическое действие наночастиц серебра с различным поверхностным зарядом по отношению к клеткам линии Jurkat. *Патогенез*. 2016; 14(3): 317.

11. Егорова Е.М. Несогласие экспериментальных изменений потенциала с предсказаниями теории Гуи-Чапмена в разбавленных растворах 1:1 электролитов. I. Феноменология проблемы. *Коллоидный журнал*. 2000(62); 284-96.

### References

1. Zhang Y, Li X, Yu H. Toxicity of nanoparticle surface coating agents: Structure-cytotoxicity relationship. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2016; 34(3): 204-215. DOI: 10.1080/10590501.2016.1202762.

2. Yang, L, Watts DJ. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 2005; 158(2): 122-32. DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.03.003

3. Wang S., Lu W., Tovmachenko O., Rai U.S., Yu H., Ray P.C. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. *Chem. Phys. Lett.* 2008;463(1-3): 145-49. DOI: 10.1016/j.cplett.2008.08.039

4. Lu W., Senapati D., Wang S., Tovmachenko O., Singh A.K., Yu H., Ray P.C. Effect of Surface Coating on the Toxicity of Silver Nanomaterials on Human Skin Keratinocytes. *Chem. Phys. Lett.* 2013; 18(9): 1199-216. DOI: 10.1016/j.cplett.2010.01.027

5. Brkic Ahmed L., Milic M., Pongrac I.M., Marjanovic A.M., Mlinaric H., Pavicic I., Gajovic S., Vinkovic Vrcek I. Impact of surface functionalization on the uptake mechanism and toxicity effects of silver nanoparticles in HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 2017; 107: 349-361. DOI: 10.1016/j.fct.2017.07.016

6. Inacio A.S., Mesquita K.A., Baptista M., Ramalho-Santos J., Vaz W.L.C., Vieira O.V. In vitro surfactant structure-toxicity relationships: Implications for surfactant use in sexually transmitted infection prophylaxis and contraception. *PLoS One*. 2011; 6(5): e19850. DOI: 10.1371/journal.pone.0019850.

7. Bradai M., Han J., Omri A.E. Cytotoxic effect of linear alkylbenzene sulfonate on human intestinal Caco-2 cells: associated biomarkers for risk assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014; 21(18): 10840-51. DOI: 10.1007/s11356-014-3074-6.

8. Kaba S.I., Egorova E.M. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2015; 8: 19-29. DOI: 10.2147/NSA.S78134

9. Egorova E.M., Kaba S.I., Tlupova S.A. Assessment of the Cytotoxicity of Silver Nanoparticles with Different Surface Charge. In: Bartul Z, Trenor J, eds. *Advances in Nanotechnology*. New York: Nova Science Publishers; 2016: 25-48.

10. Kaba S.I., Sokolovskaya A.A., Tlupova Z.A., Egorova E.M. [The cytotoxic effects of silver nanoparticles with different surface charge in Jurkat cells]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2016; 14(3): 31-7. (in Russian)

11. Egorova E.M. [Disagreement between experimental potential changes and the Gouy-Chapman theory predictions for dilute 1:1 Electrolyte solutions. I. Phenomenology of a problem]. *Kolloidnyj zhurnal [Colloid Journal]*. 2000; 62: 284-96. (in Russian)

### Сведения об авторах:

Егорова Елена Михайловна, доктор хим. наук, гл. науч. сотр. лаб. нанопатологии и биомедицинских нанотехнологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Каба Саид Ибрагимович, науч. сотр. лаб. нанопатологии и биомедицинских нанотехнологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»



Шатохина С.Н., Уварова Д.С., Шабалин В.Н.

## Новые представления о течении нефролитиаза

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

**Актуальность.** Среди урологических заболеваний одним из ведущих является нефролитиаз. Существует несколько теорий его возникновения, однако ряд аспектов, касающихся вероятных причин его возникновения и механизмов развития, остаются актуальными для исследования и в настоящее время. **Цель:** представить динамику нефролитиаза по структурам твёрдой фазы мочи с интерпретацией диагностического значения основных морфологических образований. **Методы.** Формирование твёрдофазных структур мочи осуществлялось методом клиновидной дегидратации (технология «Литос-Система»). Количественное распределение химических элементов в различных зонах фаций мочи проводилось методом рентгеноспектрального микроанализа. **Результаты.** Технология исследования твёрдофазных структур мочи позволяет диагностировать процесс камнеобразования в почках, определять степень его активности и состав камнеобразующих солей мочи. Показано, что активность нефролитиаза определяется степенью сродства (прочностью связей) камнеобразующих солей с молекулами белка. **Заключение.** Изучение структур твёрдой фазы мочи у больных нефролитиазом позволило получить качественно новую диагностическую информацию о взаимодействии двух основных составляющих мочи — минеральной и органической. Механизм возникновения и развития нефролитиаза объясняется формированием аномально прочных молекулярных взаимосвязей между органической и минеральной составляющей мочи, что создаёт условия для появления патологических органо-минеральных агрегатов. Метод клиновидной дегидратации биологических жидкостей позволяет обнаружить эти агрегации в виде макроструктур, доступных для визуального анализа. Основное клиническое значение технологии «Литос-Система» состоит в её возможности чёткого контроля за течением нефролитиаза и формированием наиболее эффективных терапевтических программ.

**Ключевые слова:** нефролитиаз; камнеобразование; структуры твёрдой фазы мочи; метод клиновидной дегидратации; технология «Литос-Система».

**Для цитирования:** Шатохина С.Н., Уварова Д.С., Шабалин В.Н. Новые представления о течении нефролитиаза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 273—276.

DOI:

**Для корреспонденции:** Шатохина Светлана Николаевна, e-mail: sv\_n@list.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.08.2018

Shatokhina S.N., Uvarova D.S., Shabalin V.N.

## New ideas about the course of nephrolithiasis

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

**Aim.** Among urological diseases a leading one is nephrolithiasis. There are several theories of its occurrence; however, studying many aspects of probable causalities and developmental mechanisms is still relevant. **Objective:** to determine the dynamics of nephrolithiasis by structure of urine solid phase and to interpret the diagnostic value of major morphological formations. **Methods.** Urine solid phase structures were formed using the method of cuneiform dehydration (Lithos-System technology). Quantitative distribution of chemical elements in different urine facie zones was determined using the X-ray microanalysis. **Results.** The technology of studying urine solid-phase structures allows to detect the process of stone formation in the kidneys and to determine the process intensity and the composition of urinary stone-forming salts. It was shown that nephrolithiasis activity was determined by the degree of affinity (bond strength) of stone-forming salts to protein molecules. **Conclusion.** Studying structures of the urine solid phase in patients with nephrolithiasis provided qualitatively new diagnostic information about the interaction between two main components of urine, the mineral and organic ones. The mechanism for nephrolithiasis onset and development can be attributed to formation of abnormally strong molecular relationships between organic and mineral components, which creates conditions for emergence of pathological organo-mineral aggregates. The method of cuneiform dehydration of biological fluids allows detecting these aggregates in the form of macrostructures available for visual analysis. The main clinical value of the Litos-System technology is its ability to accurately monitor the course of nephrolithiasis and to support development of most effective therapeutic programs.

**Keywords:** nephrolithiasis; stone formation; urine solid phase structures; cuneiform dehydration method; Lithos-System technology.

**For citation:** Shatokhina S.N., Uvarova D.S., Shabalin V.N. New ideas about the course of nephrolithiasis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 273—276 (in Russian).

**DOI:**

**For correspondence:** Shatokhina Svetlana Nikolaevna, e-mail sv\_n@list.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

**Received** 20.08.2018

### Введение

Возникновение и развитие мочекаменной болезни объясняется сложной чередой нарушений биохимических процессов, происходящих в организме [1—3]. Однако уловить эти нарушения традиционными способами диагностики не удается. До сих пор диагноз *нефролитиаза* устанавливается либо в момент почечной колики, т.е. в отдаленном периоде развития заболевания, либо в виде случайной находки при инструментальных методах обследования пациента. В конце прошлого столетия нами был открыт феномен патологической кристаллизации солей мочи в белковой среде, который характеризовал наличие процесса камнеобразования в почках [4]. За последующий тридцатилетний период изучения фаций (высушенные плёнки) мочи больных нефролитиазом, нами детально изучена динамика процесса камнеобразования, в том числе еще за 2—3 года до формирования конкремента в почках. В связи с этим *цель настоящего сообщения* — представить динамику нефролитиаза по структурам твёрдой фазы мочи с интерпретацией диагностического значения основных морфологических образований.

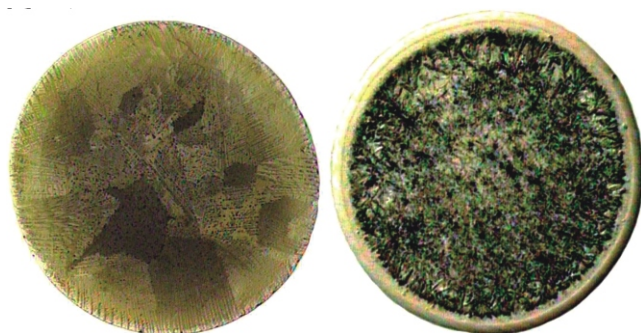
### Методика

Исследовано свыше 15000 образцов мочи больных нефролитиазом, в том числе в динамике наблюдения за течением заболевания, и более 5000 образцов пациентов без признаков нефролитиаза. Использован метод клиновидной дегидратации биологической жидкости (раздел технологии «Литос-Система») [5]. Количественное распределение химических элементов в различных зонах дегидратированной капли мочи (фации) проводилось методом рентгеноспектрального микроанализа (РСМА). Технология «Литос-Система» имеет разрешение официальных органов на применение в клинической практике и включает в себя диагностику наличия или отсутствия процесса камнеобразования в почках, степени активности камнеобразования и определение состава камнеобразующих солей (в том числе их смены в развитии заболевания).

### Результаты и обсуждение

Диагностику камнеобразования по структурам фации мочи проводили по закристаллизованности её краевой белковой зоны. При отсутствии процесса камнеобразования краевая белковая зона (при наличии протеинурии или добавления белкового Литос-реагента в безбелковую мочу) оставалась свободной от кристаллических структур (рис. 1).

В результате длительного наблюдения за больными нефролитиазом по морфологической картине фаций мочи было выявлено, что в процессе перехода активного процесса камнеобразования в фазу покоя (ремиссии), сплошная закристаллизованность белковой зоны фации сменяется частичной закристаллизованностью и далее кристаллизация солей в белковой зоне фации постепенно полностью исчезает (рис. 2). Остановка процесса камнеобразования у больного нефролитиазом сопровождается выделением мочи с повышенной концентрацией солей, т.е. происходит выброс минеральных веществ разрушающегося конкремента, его фрагментов или цельного конкремента.



**Рис. 1.** Вид фаций мочи с белковым Литос-реагентом у больного нефролитиазом: слева — в фазу активного камнеобразования в почках (кристаллизация солей в краевой белковой зоне); справа — в фазу покоя (отсутствие кристаллизации солей в краевой белковой зоне). Ув. 15.

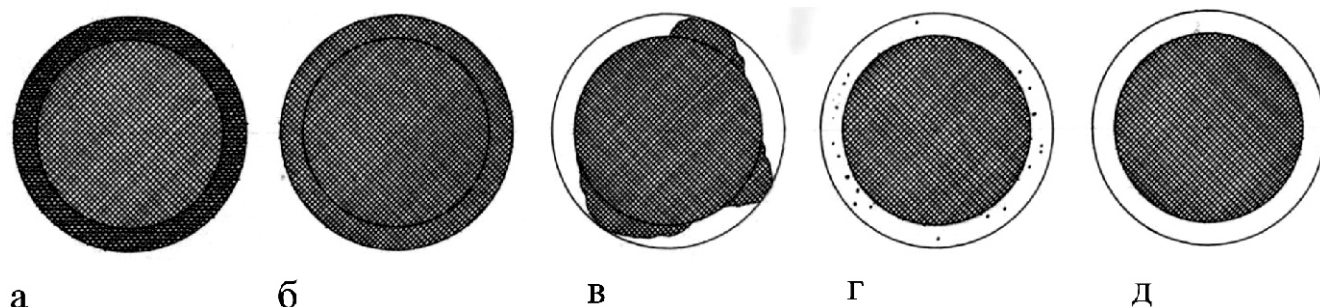


Рис. 2. Вид фаций мочи (с добавленным белковым Литос-реагентом) с различной степенью насыщения кристаллами солей краевой аморфной зоны (схема): а — более насыщенная по сравнению с центральной зоной, б — одинаковая по всей фации, в — представлена отдельными конгломератами, г — представлена единичными кристаллами, д — кристаллы солей отсутствуют (для сравнения).

Для определения вида камнеобразующих солей мочи методом РСМА исследовали состав химических элементов в различных зонах фации мочи. Метод даёт возможность определить элементный состав как по площади фации, так и в различных локусах в размере около  $1 \text{ мкм}^2$  с помощью электронного микрозонда (рис. 3). Сравнительный анализ элементного состава показал значительные различия по зонам фации. В качестве иллюстрации в таблице представлен элементный состав двух сравниваемых зон фаций мочи трех больных нефролитиазом в активную фазу литогенеза.

Результаты РСМА фации мочи больной А. (таблица) показывают, что кальций является основным камнеобразующим химическим элементом за счет его высокого содержания в краевой зоне по сравнению с центральной. Это означает, что конкремент формируется из оксалата кальция.

В фациях мочи больного В. процентное содержание в краевой зоне двух элементов — фосфора и кальция значительно выше по сравнению с центральной. Эти элементы являются камнеобразующими, т.е. конкремент имеет смешанный состав — фосфатно-кальциевый.

Если РСМА фаций мочи пациентов с высокой степенью активности камнеобразования не демонстрирует преобладания каких-либо химических элементов в краевой зоне по сравнению с центральной (пациент С.), то это означает, что камнеобразующей солью является мочевая кислота ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ ). Прибор, используемый в наших исследованиях, не регистрировал «легкие» химические элементы — С, Н, О и N, поэтому уратная природа камня устанавливалась путем исключения. В дальнейшем 127 фаций мочи пациентов, у которых состав камнеобразующих солей на основании данных РСМА, был отнесён к мочевой кислоте, были исследованы электронно-зондовым микроанализатором «Superov-8100» (фирмы «Jeol», Япония), позволяющим проводить количественное определение «легких» химических элементов. Во всех случаях данные, полу-

ченные с помощью обоих приборов, показали полное совпадение.

Возникновение феномена патологической кристаллизации солей в белковой среде объясняется формированием аномально прочных молекулярных взаимосвязей между органической и минеральной составляющей мочи. В процессе клиновидной дегидратации, в результате системной организации мочи, образующиеся белково-солевые микроагрегаты (в связь вступают камнеобразующие соли) смещаются в краевую зону фации и там кристаллизуются. Соли, не вступившие в связь с белками, кристаллизуются в центре фации. Можно предположить, что инициаторами формирования патологических белково-солевых связей в качестве посредников выступают структурно измененные белковые молекулы и их фрагменты собственных тканей больного, а также белки грибковой, бактериальной или вирусной микрофлоры, которые обитают в органах мочевой системы больного. Результаты исследований 13 белков, выделенных из образцов различных типов почечных конкрементов (оксалаты, ураты, смешанный состав) показали, что 9 из них присутствовали во всех типах исследованных образцов [6]. Авторы придали сывороточному альбумину особое значение в формировании конкремента по его способности формировать прочные ассоциативные связи с мочевыми белками непосредственно самого почечного конкремента.

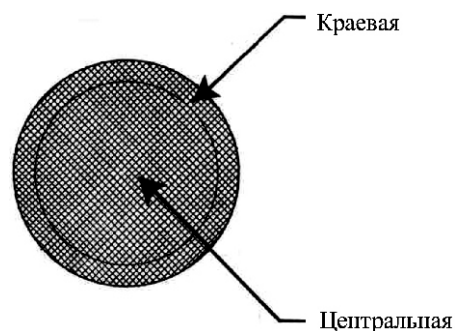


Рис. 3. Зоны исследования для определения состава камнеобразующих солей в фации мочи с протеинурией (или с белковым Литос-реагентом). Схема.

Таблица

Содержание химических элементов в краевой и центральной зонах фаций мочи больных нефролитоэзом (примеры для иллюстрации)

Пациент	Зона	Содержание элементов (масс%)								
		Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca	Zn	Si
А	Краевая	22,7	0	13,1	12,2	23,3	20,2	<b>5,5</b>	0	1,1
	Центральная	31,5	0	13,2	12,6	23,8	15,0	<b>0</b>	0	1,0
В	Краевая	13,6	2,3	<b>28,5</b>	5,6	15,7	13,3	<b>20,5</b>	0	0
	Центральная	30,2	2,1	<b>9,7</b>	1,9	46,6	5,5	<b>3,9</b>	0	0
С	Краевая	24,6	1,1	<b>7,6</b>	5,5	46,4	8,2	<b>0</b>	0	0
	Центральная	26,4	0	<b>8,2</b>	6,8	47,4	10,8	<b>0</b>	0	0

Установлено, что высокая активность камнеобразования на любом этапе может получить обратный вектор направленности под влиянием различных факторов (водный и пищевой режимы, физическая нагрузка, соответствующие лекарственные средства), что чётко контролируется технологией «Литос-Система». Одновременно технология позволяет выявить индукторы активности камнеобразования: избыточное употребление в пищу животных белков (источник мочевой кислоты), длительное применение поливитаминов или различных медикаментозных препаратов и др.

### Заключение

Таким образом, морфологический анализ фаций мочи и количественное определение состава химических элементов в локусах молекулярных нарушений органических и минеральных структур предоставляет возможность диагностировать мочекаменную болезнь на любых стадиях ее проявления, включая самые ранние. Это качественно новая диагностическая информация, которая не могла быть получена ранее известными методами. Основное значение технологии «Литос-Система» состоит в том, что она открывает возможность чёткого контроля за течением нефролитоэза и формированием наиболее эффективных терапевтических программ.

Интеллектуальный приоритет отечественной технологии по диагностике мочекаменной болезни подтвержден также патентами США, Европы (17 стран), Канады, Австралии и других стран мира.

### Сведения об авторах

Шатохина Светлана Николаевна, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. биокристалломики ФГБНУ НИИОПП;

Уварова Дарья Сергеевна, ст. науч. сотр. лаб. биокристалломики ФГБНУ НИИОПП;

Шабалин Владимир Николаевич, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, гл. науч. сотр. лаб. биокристалломики ФГБНУ НИИОПП.

### Литература (п.п. 6 см. References)

1. *Нефрология: национальное руководство* / Под ред. Н.А. Мухина. М.; ГЭОТАР-Медиа, 2009.
2. Мухин Н.А., Тареева И.Е., Шилов Е.М. *Диагностика и лечение болезней почек*. М.; ГЭОТАР-Медиа, 2002.
3. *Нефрология* / Под ред. Е.М. Шилова. М.; ГЭОТАР-Медиа, 2007.
4. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Феномен патологической кристаллизации камнеобразующих солей мочи при уролитоэзе. *Журнал урологии и нефрологии*. 1998; 2: 16-9.
5. Шатохина С.Н., Шабалин В.Н. *Атлас структур неклочных тканей человека в норме и патологии. Том 1. Морфологические структуры мочи*. Тверь: Триада, 2011.

### References

1. *Nephrology: national leadership [Nefrologiya: natsionalnoe rukovodstvo]*. / Ed. N.A. Mukhin. Moscow; GEOTAR-Media, 2009. (in Russian)
2. Mukhin N.A., Tareeva I.E., Shilov E.M. *Diagnosis and treatment of kidney disease [Diagnostika i lechenie bolezney почек]*. Moscow; GEOTAR-Media, 2002. (in Russian)
3. *Nephrology [Nefrologiya]*. / Ed. E.M. Shilov. Moscow; GEOTAR-Media, 2007. (in Russian)
4. Shabalin V.N., Shatokhina S.N. The phenomenon of pathological crystallization of stone-forming urine salts in urolithiasis. *Zhurnal nefrologii i urologii. [Journal of Urology and nephrology]*. 1998; 2: 16-9. (in Russian)
5. Shatokhina S.N., Shabalin V.N. *Atlas of the structures of non-cellular human tissues in health and disease. Volume 1. [Atlas struktur nekletochnykh tkaney cheloveka v norme i patologii. Tom 1. Morfologicheskie struktury mochi]*. Tver': Triada, 2011. (in Russian)
6. Lafitte D., Dussol B., Andersen S., Vazi A., Dupuy P., Jensen O.N., Berdland Y., Verdier J.M. Optimized preparation of urine samples for two-dimensional electrophoresis and initial application to patient samples. *Clin. Biochem.* 2002; 35: 581-9.

Карганов М.Ю.<sup>1,2</sup>, Панкова Н.Б.<sup>1</sup>, Карандашов В.И.<sup>2</sup>, Черепов А.Б.<sup>1</sup>

## Профилактическая фототерапия в синем диапазоне оптического излучения при подготовке к подводной деятельности

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр лазерной медицины им. О.К. Скобелкина Федерального медико-биологического агентства». 121165, Москва, Россия, улица Студенческая, д. 40

Исследовали эффекты профилактического оптического излучения в синем диапазоне в течение четырех недель на функциональное состояние кардио-респираторной системы человека. При тестировании использовали нагрузочные пробы. Эффекты фототерапии проявились в отсутствии изменений ряда показателей сердечно-сосудистой системы, характерных для периода максимального прироста светового дня.

**Ключевые слова:** профилактическая фототерапия; кардио-респираторная система; функциональные пробы.

**Для цитирования:** Карганов М.Ю., Панкова Н.Б., Карандашов В.И., Черепов А.Б. Профилактическая фототерапия в синем диапазоне оптического излучения при подготовке к подводной деятельности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 277—280.

DOI:

**Для корреспонденции:** Карганов Михаил Юрьевич, e-mail: mkarganov@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 26.08.2018

Karganov M.Yu.<sup>1,2</sup>, Pankova N.B.<sup>1</sup>, Karandashov V.I.<sup>2</sup>, Cherepov A.B.<sup>1</sup>

## Preventive phototherapy in the blue range of optical radiation in preparation for underwater activities

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> O.K. Skobelkin Scientific Center of Laser Medicine at the Federal Biomedical Agency, Studencheskaya Str. 40, Moscow 121165, Russian Federation

Effects of preventive optical radiation in the blue range on the functional state of the human cardiorespiratory system were studied for four weeks using loading tests. The effects of phototherapy were evident as the absence of changes in several cardiovascular indexes characteristic for the period of maximum increase in daylight hours.

**Keywords:** preventive phototherapy; cardiorespiratory system; functional tests.

**For citation:** Karganov M.Yu., Pankova N.B., Karandashov V.I., Cherepov A.B. Preventive phototherapy in the blue range of optical radiation in preparation for underwater activities. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 277—280 (in Russian).

DOI:

**For correspondence:** Karganov Mikhail Yur'evich, e-mail: mkarganov@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

Received: 26.08.2018

### Введение

Целью нашего исследования стало изучение возможных эффектов светового излучения с длиной волны  $470 \pm 10$  нм [1] для подготовки участников экспедиции к подводной деятельности в условиях резкого изменения климато-географических условий и профилактики десинхронозов при смене часовых поясов.

### Методика

В исследовании приняли участие 11 человек, их них 6 вошли в контрольную группу (3 мужчины и 3 женщины, средний возраст  $55,6 \pm 1,8$  года), 5 человек — в экспериментальную (3 мужчины и 2 женщины, средний возраст  $55,7 \pm 3,0$  лет). Участники исследования, входившие в экспериментальную группу, ежедневно применяли браслет автономный светоизлучающий (БАСИ) (регистрационное удостоверение №ФСР 2012/13206), разработанный в Центре лазерной медицины ФМБА. Воздействие состояло из двух сеансов по 15 мин и осуществлялось в интервал 8.00—9.00 ч утра, ежедневно в течение 4 недель. Тестирование функционального состояния

кардио-респираторной системы проведено дважды, до начала профилактических мероприятий (февраль), и по окончании их проведения (март), в период максимального прироста длительности светового дня.

Оценку функционального состояния кардио-респираторной системы проводили с использованием следующих показателей:

- измерение частоты сердечных сокращений (ЧСС) и артериального давления (АД) аускультативным методом на плече при помощи тонометра UA-777 (A&D Medical, Япония). Данные параметры оценивали в состоянии покоя и при выполнении функциональных нагрузочных проб (Штанге, Генчи);

- измерение текущей ЧСС и пальцевого АД (пАД) с последующим расчетом спектральных показателей variability сердечного ритма и пАД, сердечной производительности и чувствительности спонтанного артериального барорефлекса (ЧБР) методом САКР (спиреокардиокардиографии) [2].

Данные параметры оценивали в состоянии покоя и при выполнении дыхательных проб: тестирование в спирометрической маске с произвольным или контролируе-

Таблица

Результаты тестирований функционального состояния участников контрольной группы (данные представлены в виде медианы и квартилей)

Показатель	Февраль	Март	p (по парному критерию Вилкоксона)
<b>Функциональные пробы и измерения тонометром</b>			
Проба Штанге, с	49 (36; 74)	67 (49; 101)	0,074
Пробы Генчи, с	31 (23; 38)	34 (27; 50)	0,046
АД систолическое, мм рт.ст.	130 (115; 138)	122 (113; 131)	0,027
АД диастолическое, мм рт.ст.	70 (68; 74)	73 (68; 79)	0,916
<b>Метод САКР без спирометрической маски</b>			
пАД систолическое max, мм рт.ст.	137 (125; 146)	152 (145; 172)	0,345
пАД систолическое min, мм рт.ст.	109 (102; 120)	119 (107; 133)	0,341
пАД систолическое размах, мм рт.ст.	25 (23; 32)	36 (32; 43)	0,027
ЧБР, мс/ мм рт.ст.	6,5 (4,3; 8,4)	3,4 (2,5; 5,8)	0,046
<b>Метод САКР в маске с произвольным дыханием</b>			
Длительность R-R max, мс	865 (859; 984)	839 (779; 902)	0,079
Длительность R-R min, мс	755 (430; 758)	740 (711; 768)	0,463
Длительность R-R размах, мс	121 (102; 139)	96 (68; 103)	0,046
УО, мл	60 (58; 62)	59 (57; 60)	0,046
<b>Метод САКР в маске с контролируемым дыханием 6 циклов в минуту</b>			
пАД систолическое, мм рт.ст.	127 (122; 133)	133 (124; 145)	0,248
пАД диастолическое, мм рт.ст.	74 (65; 80)	71 (63; 76)	0,248
пАД пульсовое, мм рт.ст.	47 (43; 59)	70 (51; 74)	0,046
Мощность диапазона LF спектра пАД систолического, мм рт.ст. <sup>2</sup>	69 (43; 171)	78 (22; 140)	0,463
Мощность диапазона LF спектра пАД систолического, %	76 (69; 81)	67 (49; 71)	0,046

мым (6 дыхательных циклов в минуту) дыханием. Длительность каждой регистрации составляла 2 минуты [3].

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрических критериев (Манн—Уитни для независимых выборок, парный критерий Вилкоксона для повторных изменений), динамику оценивали по алгоритму Repeated measures ANOVA.

### Результаты и обсуждение

Выявлено, что за 4 недели эксперимента в контрольной группе улучшились результаты выполнения дыхательных проб, снизились величины систолического АД (по Короткову); возросли размах колебаний систолического пАД и величина ЧБР при тестировании на приборе САКР без спирометрической маски; снизились величины размаха колебаний ЧСС и УО при тестировании в маске с произвольным дыханием; возросли величины пульсового пАД и относительной мощности диапазона LF в спектре вариабельности систолического пАД — что является естественной хронобиологической динамикой при максимальном приросте длительности светового дня (таблица).

В экспериментальной группе динамика большинства показателей была аналогичной, за некоторыми исключениями. Так, при тестировании без маски — отсутствовало изменение размаха колебаний систолического пАД (отличия динамики показателя от таковой в контрольной группе статистически значимы,  $F = 8,395$ ,  $\rho = 0,017$ ), при тестировании в маске с произвольным дыханием — отмечена тенденция к отсутствию изменений УО ( $F = 4,061$ ,  $\rho = 0,074$ ), при тестировании в маске с контролируемым дыханием 6 циклов в минуту — была тенденция к отсутствию изменений пульсового пАД ( $F = 3,802$ ,  $\rho = 0,082$ ).

### Заключение

Полученные данные свидетельствуют о возрастании устойчивости сердечно-сосудистой системы участников эксперимента к влиянию климатогеографиче-

ских факторов, что может быть следствием использования профилактической фототерапии [4].

### Литература

1. Карганов М.Ю., Панкова Н.Б., Карандашов В.И., Хлебникова Н.Н., Алчинова И.Б., Полякова М.В. Эффекты профилактической фототерапии в синем диапазоне спектра в условиях высокоширотной морской экспедиции. *Лазерная медицина*. 2018, 22(1): 38-43.
2. Панкова Н.Б., Лебедева М.А., Курнешова Л.Е., Пивоваров В.В., Карганов М.Ю. Спироартериокардиоритмография — новый метод изучения состояния сердечно-сосудистой системы. *Патогенез*. 2003; 1(2): 84-8.
3. Панкова Н.Б., Архипова Е.Н., Алчинова И.Б., Карганов М.Ю., Фесенко А.Г., Фесюн А.Д., Терновой К.С., Абакумов А.А. Сравнительный анализ методов экспресс-оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы. *Вестник восстановительной медицины*. 2011; 6 (46): 60-3.
4. Карандашов В.И. Особенности оптического излучения в синем диапазоне спектра и перспективы использования его в практической медицине. *Лазерная медицина*. 2013; 17(2): 49-55.

### References

1. Karganov M.Yu., Pankova N.B., Karandashov V.I., Alchinova I.B., Polyakova M.V. The effect of prophylactic phototherapy in the blue range of the spectrum in terms of high-latitude marine expedition. *Lazernaya Meditsina [Lazer Medicine]*. 2018; 22(1): 38-43. (In Russian)
2. Pankova N.B., Lebedeva M.A., Kurneshova L.E., Pivovarov V.V., Karganov M.Yu. Spiroarteriocardiorhythmography — a new method for investigation of cardio-vascular system state. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2003; 1(2): 84-8. (In Russian)
3. Pankova N.B., Arkhipova E.N., Alchinova I.B., Karganov M.Yu., Fesenko A.G., Fesyun A.D., Ternovoy K.S., Abakumov A.A. A comparative analysis of the functional state of the cardiovascular system express-evaluation methods. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny [Journal of restorative medicine and rehabilitation]*. 2011; 6(46): 60-3. (In Russian)
4. Karandashov V.I. Peculiarities of optic irradiation in the blue range of spectrum and perspectives of its application in practical medicine. *Lazernaya Meditsina [Lazer Medicine]* 2013; 17(2): 49-55. (In Russian)

### Сведения об авторах:

Карганов Михаил Юрьевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Панкова Наталья Борисовна, доктор биол. наук, доцент, гл. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Карандашов Владимир Иванович, доктор мед. наук, проф., руководитель отд-ния лазерных биотехнологий и клинической фармакологии ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины им. О.К. Скобелкина Федерального медико-биологического агентства»;

Черепов Антон Борисович, науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2018  
УДК 616-092

Кубышкин А.В.<sup>1</sup>, Литвицкий П.Ф.<sup>2</sup>, Чурилов Л.П.<sup>3</sup>, Пеханова О.<sup>4</sup>, Уразова О.И.<sup>5</sup>, Коваленко Е.П.<sup>1</sup>

## Молекулярные и генетические механизмы развития патологических процессов (о VIII Конгрессе Международного общества патофизиологов)

<sup>1</sup> Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

<sup>4</sup> Центр экспериментальной медицины Института нормальной и патологической физиологии Академии наук Словакии, Братислава

<sup>5</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск

В статье приводятся данные об основных тенденциях и направлениях развития патофизиологии как науки и образовательной дисциплины, представленных на VIII конгрессе Международного общества патофизиологов в Братиславе.

Работа поддержана грантом Правительства РФ, договор 14.W03.31.0009.

Kubyschkin A.V.<sup>1</sup>, Litvitsky P.F.<sup>2</sup>, Churilov L.P.<sup>3</sup>, Pechanova O.<sup>4</sup>, Urazova O.I.<sup>5</sup>, Kovalenko E.P.<sup>1</sup>

## Molecular and genetic mechanisms of pathological processes development (VIII Congress of the International Society of Pathophysiology)

<sup>1</sup> V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Medical Academy, Simferopol

<sup>2</sup> First Moscow Medical State University named after I.M. Sechenov Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow

<sup>3</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg

<sup>4</sup> Center of Experimental Medicine, Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava

<sup>5</sup> Siberian State Medical University, Tomsk

The article provides information of the main trends and directions of development of Pathophysiology as a science and educational discipline, which presented at the VIII Congress of the International Society of Pathophysiology in Bratislava.

С 5 по 8 сентября 2018 года в Братиславе (Словакия) состоялся очередной VIII Всемирный конгресс по патофизиологии (ICP 2018). В этот раз конгресс вернулся на европейский континент и был организован при участии Центра экспериментальной медицины Института нормальной и патологической физиологии Академии наук Словакии. Оргкомитет под руководством своего председателя и Президента конгресса Ольги Пехановой (Olga Pechanova) координировал подготовку и всю работу конгресса. Россию в оргкомитете конгресса представлял проректор по научной деятельности Крымского федерального университета Анатолий Кубышкин.

Следует отметить, что организационный комитет рассчитывал на большее представительство стран, принимая решение о проведении конгресса на европейском континенте. Ведь в настоящее время Международное общество по патофизиологии (МОП) объединяет ученых и специалистов из 53 стран мира. В братиславском конгрессе приняли участие представители

25 стран, что составило почти половину коллективных членов МОП и практически совпало с представительством на предыдущем конгрессе в Рабате (Марокко). Общее количество делегатов превысило 200 человек. В итоге более 200 представленных ими научных работ, были опубликованы в специальном выпуске журнала «Pathophysiology» [1]. Публикации включали материалы 88 устных и 119 стендовых докладов, представленных на Конгрессе.

Россия была представлена патофизиологами из Москвы, Санкт-Петербурга, Томска, Ижевска и Крыма. Российскими делегатами было организовано 2 симпозиума, посвященных патофизиологии внутриклеточной регуляции и межклеточной регуляции (Pathophysiology of intra- & intercellular regulation), на которых было представлено 11 устных сообщений. Кроме того, представителями России были прочитана пленарная лекция (Б.В. Крылов), представлены 3 устных сообщения на симпозиумах и ряд стендовых сообщений. К сожалению, из постсоветских стран в работе конгресса



ресса участвовали лишь представители Армении, Беларуси, России и Украины, причем от Армении и Украины было только по одному делегату.

Научная программа включала разнообразные направления. Обратил на себя внимание растущий интерес патофизиологов к использованию клеточных, молекулярных и генетических подходов в научных исследованиях по расшифровке механизмов развития различных патологических процессов и социально значимых болезней человека. Так, первая пленарная лекция на конгрессе была представлена экс-президентом МОП Павлом Хаметом (Pavel Hamet, Канада). Она была посвящена сравнению роли клинических и генетических факторов в развитии осложнений сахарного диабета. В лекции подчеркивалось, что выявление генетических маркеров предрасположенности к развитию той или иной формы патологии должно учитываться в комплексе с оценкой других ее этиологических факторов и механизмов.

Всего на конгрессе было прочитано 5 пленарных лекций. Блестящая пленарная лекция была представлена профессором Рриан Тоуз (Rhian M. Touyz, Великобритания). Она касалась молекулярных механизмов повреждения сосудов при артериальной гипертензии. В лекции была обоснована важная роль воспалительных изменений в сосудистой стенке. При этом подчеркивалось, что воспаление, скорее всего, является не причиной, а следствием реализации механизмов прогрессирования развивающихся нарушений, приводящих к стабилизации повышенного уровня артериального давления.

Большой интерес вызвала лекция Самуэля Цяна (Samuel H.H. Cyan, Тайвань, Китай), посвященная исследованию ранее малоизученных механизмов повреждения мозга, проявляющихся нарушением реализации жизненно важных рефлексов. В лекции были сформулированы подходы к диагностике и коррекции поражений мозга при преагональных состояниях и агонии.

Интересная пленарная лекция была представлена профессором Борисом Крыловым из Института физиологии имени И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург), посвященная изучению механизмов формирования патологической боли. В лекции освещались исследования, направленные на изучение первичного сенсорного кодирования ноцицептивной информации через мембранные механизмы. В частности, были продемонстрированы 2 новых мембранных мишени, осуществляющих модуляцию медленных натриевых каналов, что позволило разносторонне подойти к изучению ноцицептивной системы на мембранном, клеточном, тканевом и организменном уровнях. Причем изучались не только особенности триггерных механизмов внутриклеточных сигнальных каскадов, но

также патогенетические факторы, контролирующие экспрессию генов, отвечающих за синтез компонентов этих каналов.

Лекция, представленная профессором Мин Сю (Ming Xu, Китай), была посвящена значению G-квадруплексных структур ДНК генов, связанных с регуляцией функции сердца. Подчеркивалось, что эти исследования позволяют не только разработать новые подходы к диагностике, но и в перспективе послужат основой для использования квадруплексов нуклеиновых кислот в качестве новых терапевтических агентов.

Кроме пленарных лекций, в рамках конгресса было организовано 16 симпозиумов и 11 постерных сессий по актуальным проблемам патофизиологии, которые в своем большинстве модерировались представителями национальных обществ по патофизиологии различных стран, в том числе России. Три симпозиума организовали патофизиологи — клиницисты различных специальностей.

Отметим, что Российское научное общество патофизиологов, при активном участии профессора А.В. Кубышкина (Крымский федеральный университет) и профессора С.Н. Орлова, представлявшего МГУ им. М.В. Ломоносова и Томский государственный университет, организовало симпозиум из двух сессий по проблемам патофизиологии внутри- и межклеточной регуляции. В рамках первой части симпозиума большой интерес вызвал доклад Жоан Трамбле (Johanne Tremblay, Канада), посвященный изучению роли гена в развитии злокачественных новообразований. Отметим также сообщение Павола Янеги (Pavol Janega, Словакия) по исследованию регуляторных путей и новых терапевтических мишеней в лечении меланомы. В докладе Анатолия Кубышкина были представлены оригинальные результаты совместных исследований с НМИЦ имени В.А. Алмазова (А.И. Тюкавин, Санкт-Петербург), посвященных изучению возможности использования стволовых клеток и апоптотических телец кардиомиоцитов для стимулирования процессов репарации миокарда после его повреждения. Еще 2 доклада были представлены сотрудниками Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Заведующая лабораторией защитных механизмов клетки д-р биол. наук Ирина Гужова охарактеризовала роль шаперонов как целевых молекул при онкологических и нейродегенеративных заболеваниях. Сотрудник этой же лаборатории д-р биол. наук Борис Маргулис доложил об участии механизмов межклеточных взаимодействий в развитии прионовых форм патологии.

На 2-й сессии симпозиума Российского научного общества по патофизиологии доклад о ранее неизвестных иммунологических механизмах патогенеза ато-

пических заболеваний сделал Александр Казимирский (РНИМУ имени Н.И. Пирогова). Сообщение профессора Ижевской медицинской академии Ирины Брындиной было посвящено роли сфинголипидов в реализации сигнальных путей мышечной регуляции, в том числе в длительно нефункционирующей мышце. Изучение активации и взаимодействия миокинов при физической нагрузке различной продолжительности и интенсивности было темой сообщения Леонида Каплевича (Томск). Доклад, в котором на молекулярно-генетическом уровне были продемонстрированы взаимосвязи симпатического стресса и повреждения миокарда, был представлен Хан Сяо (Han Xiao, Китай).

Довольно много внимания на конгрессе было уделено научным исследованиям, посвященным патологии сердца и нервной системы. Интересные доклады состоялись на симпозиумах по изучению регуляции редокс-потенциала при сердечно-сосудистой и нейродегенеративной патологии (сопредседатели Samuel H.H. Chan, Taiwan, China; Ima Dovinova, Slovakia), по новым направлениям в изучении психических заболеваний (сопредседатели Spiridione Masaraki, Italy; Yuko Urakami, Japan) и аутизма (сопредседатели Daniela Ostatnikova, Katarina Babinska, Slovakia), по молекулярным механизмам развития психических расстройств (сопредседатели Jianzhi Wang, China; Igor Riecsansky, Slovakia) и нейропсихических нарушений (сопредседатели Daniela Jezova, Slovakia; Artem Grigoryan, Armenia). В рамках последнего симпозиума был заслушан доклад Леонида Чурилова (Санкт-Петербург), посвященный ключевым иммунноэндокринным звеньям патогенеза психических расстройств, сопровождающих тиреоидит Хасимото. Патология аутоиммунных и иммунопатологических заболеваний была широко представлена также в постерных сессиях конгресса.

Отдельный симпозиум касался механизмов повреждения сосудов (председатели Concepcion Peiro, Silvia Arribas, Spain), а также экспериментальной артериальной гипертензии (председатели Ivana Vaneczkova, Czech Republic; Iveta Bernatova, Slovakia). Специальный симпозиум был посвящен изучению молекулярных механизмов действия биологически активных продуктов природного происхождения (председатели Patricia I. Oteiza, USA; Vittorio Calabrese, Italy).

По хорошей российской традиции, перенятой международным патофизиологическим сообществом, в рамках конгресса был организован симпозиум, посвященный вопросам совершенствования методов, форм и средств преподавания. Модераторами симпозиума были Angelika Puzserova, Slovakia и Georgi M. Sarov, Bulgaria. В рамках обсуждения профессор Зденко Ковач (Zdenko Kovac, Хорватия) доложил

новые материалы по использованию интегративных подходов к преподаванию патофизиологии с применением клиничко-патофизиологического анализа историй болезни и этиопатогенетических кластеров. Артем Григорян (Армения) представил оригинальный подход с использованием компонентов игры для преподавания отдельных тем при изучении патофизиологии опухолевого роста. Профессор Петр Литвицкий (Москва) аргументировал системно-последовательный подход к обучению клинической патофизиологии в медицинском вузе. Эта система включает:

- 1) освоение студентами базовых понятий клинической патофизиологии на 2—3 курсе вуза;
- 2) проведение цикла клинической патофизиологии по изучению синдромов недостаточности органов и систем на 4—5 курсах;
- 3) организацию цикла клинической патофизиологии, посвященного социально-значимым болезням человека на выпускном курсе.

Была обоснована система обучения патофизиологии, базирующаяся на решении студентами, под контролем преподавателя, профессиональных врачебных задач, а также на проведении отдельных занятий и заседаний научного студенческого кружка на базах клиник университетов и/или их базовых лечебных и научных учреждений клинического профиля. Георгий Саров (Болгария) и Роман Бедначка (Словакия) подчеркнули в своих выступлениях незаменимость общего курса патофизиологии, поскольку общезологические понятия, а также типовые патологические процессы не изучаются ни одной другой дисциплиной учебного плана медицинского образования. Леонид Чурилов (Санкт-Петербург), основываясь на опыте междисциплинарного преподавания патофизиологии и клинических дисциплин в СПбГУ, высказал мнение о возможности выстроить учебный план таким образом, чтобы элементы патофизиологии преподавались, начиная со второго по заключительный год обучения, а не концентрировались только в течение одного года учебного плана. По его мнению, современная патофизиология переросла рамки своего исторического названия и может рассматриваться как системная патофизиология в комплексе медицинских наук. В изучении основ патофизиологии нуждаются, по его мнению, и студенты немедицинских специальностей (биологи, химики, физики, инженеры), которые будут по роду своей будущей деятельности вовлечены в исследовательские и клиничко-диагностические проекты медицинской направленности.

Подводя итоги, Конгресс в Братиславе решил ряд организационных вопросов работы МОП. Было отмечено, что за период после последнего конгресса в Марокко многие ранее принятые решения не были воплощены в жизнь. В связи с этим большие надеж-

ды возлагаются на нового Президента общества, которым стала Olga Rechanova (Братислава, Словакия). При этом президиум МОП высоко оценил работу возглавлявшегося ею оргкомитета, по подготовке конгресса в Братиславе.

На расширенных заседаниях Президиума МОП обсуждались пути совершенствования деятельности общества. На состоявшейся в последний день генеральной ассамблеи МОП были приняты решения по работе общества на следующие 4 года, в течение которых руководить обществом будет президиум МОП в составе 17 членов, представляющих 11 стран. Вице-президентами МОП стали Pavel Hamet, Johanne Tremblay (Канада), Zdenko Kovac (Хорватия), Jianzhi Wang (Китай). От России в состав президиума вошли Леонид Чурилов и Анатолий Кубышкин.

Основными приоритетами в работе нового президента и состава президиума были названы:

- укрепление и консолидация международного общества по патофизиологии;
- создание нового интерактивного вебсайта МОП;
- активизация работы национальных обществ по патофизиологии и стимулирование индивидуального членства;
- укрепление финансовой базы общества;
- привлечение к работе в обществе молодых ученых путем проведения под эгидой МОП региональных научных школ, тренингов и конференций для молодых исследователей.

Большее внимание планируется уделять развитию публикационной активности членов МОП в научном журнале общества — «Pathophysiology», главным ре-

дактором которого является Steven Alexander (США). Поставлена задача повысить его импакт-фактор и обеспечить переход журнала во второй квартал рейтинга научных изданий (Q2).

Планируется также продолжить при участии авторского коллектива из разных стран реализацию проекта Зденко Ковача и Леонида Чурилова по созданию истории развития мировой патофизиологии в ракурсе наиболее важных достижений биологии и медицины.

IX Конгресс МОП решено провести через 4 года в России в г. Москва на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Символично, что более чем через 30 лет конгресс вернется в город, где на учредительном конгрессе в 1990 году основателем Международного общества патофизиологов академиком Г.Н. Крыжановским были заложены основные принципы его функционирования. Сегодня патофизиология встречается с новыми вызовами, но по праву, существуя во всем мире под разными названиями, остается одной из ключевых базовых дисциплин в подготовке врача и фундаментом для проведения научных исследований в области интенсивно развивающейся трансляционной, прецизионной и восстановительной медицины.

## Литература

1. Abstracts of 8<sup>th</sup> International Congress of Pathophysiology. *Pathophysiology*. 2018; 25(3): 159-84.