

**ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:**

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

Редакция журнала  
«Патологическая физиология  
и экспериментальная терапия».  
Home page: www.pfiet.ru  
E-mail: path.physiol@yandex.ru

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

ЛР №010215 от 29.04.97.

Издатель: Иришкин Дмитрий  
E-mail: genius-me dia@mail.ru

Входит в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК России для публикации значимых результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

**5-летний ИФ РИНЦ 2015 0,690**

Журнал включен в базу данных Scopus  
Журнал «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» индексируется в следующих иностранных изданиях:  
*Pub Med; 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 15.02.2019  
Подписано в печать 11.03.2019

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и exper. тер.  
2019. Том 63. № 1. 1—124

Перепечатка материалов и использование их в любой форме, в том числе и в электронных СМИ, возможны только с письменного разрешения издателя.

За содержание рекламных публикаций ответственность несет рекламодатель.

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2019.

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 63, № 1, 2019

январь–март

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

### Главный редактор Б.Б. Мороз

Ю.В. Архипенко, Е.И. Асташкин, С.В. Грачев,  
Н.С. Гурко (ответственный секретарь), Т.А. Гуськова,  
И.С. Гущин (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)

### Редакционный 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](http://www.pfiet.ru)  
E-mail: [path.physiol@yandex.ru](mailto:path.physiol@yandex.ru)

ISSN 0031-2991

Publisher: Irishkin Dmitry  
e-mail: [genius-media@mail.ru](mailto:genius-media@mail.ru)

Pathological physiology  
and experimental therapy  
2019. Vol. 63. № 1. 1-124



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*

**TOM 63, № 1, 2019**  
**january–march**

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

**Assistant editors in chief:**

I.S. Gushchin, V.K. Reshetnyak

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

**Members of editorial board:**

Yu.V. Archipenko, E.I. Astashkin, 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

## CONTENTS

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Байке Е.В., Уразова О.И.* Полиморфизм генов цитокинов как фактор предрасположенности к развитию хронического гнойного среднего отита. .... 4
- Крохалева Ю.А., Страмбовская Н.Н., Кузник Б.И.* Агрегационная активность тромбоцитов у больных ишемическим инсультом – носителей генетического полиморфизма некоторых толл – подобных рецепторов. .... 15
- Лебедев В.Г., Дешевоу Ю.Б., Темнов А.А., Астрелина Т.А., Rogov К.А., Насонова Т.А., Лыршикова А.В., Добрынина О.А., Склифас А.Н., Мхитаров В.А., Трофименко А.В., Мороз Б.Б.* Изучение эффектов стромально-васкулярной фракции, культивированных стволовых клеток жировой ткани и паракринных факторов кондиционной среды при терапии тяжелых лучевых поражений кожи у крыс ..... 24
- Анохин П.К., Веретинская А.Г., Давыдова Т.В., Шамакина И.Ю.* Агонисты дофаминовых D2-рецепторов в фармакотерапии экспериментального алкоголизма ..... 33
- Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Юсупова В.Ч., Примакова Е.А.* Изучение Хоуминга мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток после резекции печени ..... 40
- Генкель В.В., Салашенко А.О., Алексеева О.А., Шапошник И.И.* Биомеханические факторы риска поражения сосудов у пациентов с гипертонической болезнью в зависимости от ультразвуковой морфологии атеросклероза периферических артерий ..... 46
- Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г.* Специфичность токсичность кальций-фосфатных бионов для культур венозных и артериальных эндотелиальных клеток человека ..... 53
- Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Барская Л.О.* Роль холемии в развитии кардиодепрессии после субтотальной резекции печени у крыс ..... 62
- Шибкова Д.З., Шилкова Т.В., Овчинникова А.В.* Эффекты влияния электромагнитного поля радиочастотного диапазона на органы кроветворения у экспериментальных животных ..... 69
- Стрелкова Л.Б., Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Панина М.И.* Гепатопротективное действие экстракта володушки при экспериментальном тетрациклиновом гепатите ..... 77
- Гяглоева Э.М., Брин В.Б., Скупневский С.В., Боцьева Н.В., Молдован Т.В.* Влияние хлорида никеля на показатели гемокоагуляции и липопероксидации у крыс в эксперименте ..... 83

### ОБЗОРЫ

- Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В.* Адаптивная изменчивость суммарной РНК лимфоидных клеток как причина невоспроизводимости вызываемых ею эффектов ..... 91

### МЕТОДИКА

- Кудина О.В., Асадуллаева Н.Я., Зайченко А.В.* Экспериментальное моделирование гестоза у крыс ..... 99
- Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Самоделькин А.Г., Золотова М.В., Шабалин М.А., Грачева Е.А.* Диагностические возможности электрофоретической подвижности эритроцитов и клеток буккального эпителия при стрессе ..... 106

### ВОПРОСЫ ПРЕПОДАВАНИЯ

- Караогланова Т.Э., Падалко В.В.* Методика проблемного обучения как способ обучения в медицинском ВУЗе ..... 112

### ИНФОРМАЦИЯ

- Мальцева Л.Д., Горбачёв Н.А., Морозова О.Л.* Новейшая история кафедры патофизиологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета): на рубеже XX-XXI веков (к 170-летию кафедры) ..... 118

### ORIGINAL ARTICLE

- Bayke E.V., Urazova O.I.* Cytokine gene polymorphism as a factor of predisposition to development of chronic purulent otitis media ..... 4
- Krokhaleva Yu.A., Stambovskaya N.N., Kuznik B.I.* Platelet aggregation activity in patients with ischemic stroke, carriers of a genetic polymorphism of some toll-like receptors ..... 15
- Lebedev V.G., Deshevoy Yu.B., Temnov A.A., Astrelina T.A., Rogov K.A., Nasonova T.A., Lirschikova A.V., Dobrynina O.A., Sklifas A.N., Mkhitarov V.A., Trofimenko A.V., Moroz B.B.* Study of the effects of the stromal vascular fraction and cultured adipose-derived stem cells and paracrine factors of the conditioned medium in the treatment of severe radiation injuries of skin in rats ..... 24
- Anokhin P.K., Veretinskaya A.G., Davidova T.V., Shamakina I.Yu.* Dopamine D2 agonists in the treatment of experimental alcoholism ..... 33
- Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Yusupova V.Ch., Primakova E.A.* The study of MMSC Homing after liver resection ..... 40
- Genkel V.V., Salashenko A.O., Alekseeva O.A., Shaposhnik I.I.* Biomechanical risk factors for vascular disease in hypertensive patients according to ultrasound morphology of peripheral artery atherosclerosis ..... 46
- Shishkova D.K., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G.* Specific toxicity of calcium phosphate bions for human venous and arterial endothelial cells ..... 53
- Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O.* The role of cholemia in development of cardiodepression after subtotal liver resection in rats ..... 62
- Shibkova D.Z., Shilkova T.V., Ovchinnikova A.V.* The effects of an electromagnetic field radio frequency on hematopoietic organs in experimental animals ..... 69
- Strelkova L.B., Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Panina M.I.* Hepatoprotective effect of the thoroughwax extract in experimental tetracycline-induced hepatitis ..... 77
- Gagloeva I.M., Brin V.B., Skupnevsky S.V., Botchieva N.V., Moldovan T.V.* Effects of nickel chloride on indices of hemocoagulation and lipid peroxidation in rats in experiment (?) ..... 83

### REVIEWS

- Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V.* Adaptive variability of total RNA in lymphoid cells as a cause for non-reproducibility of its effects ..... 91

### METHODS

- Kudina O.V., Asadullayeva N.Ya., Zaychenko A.V.* An experimental model of gestosis in rats ..... 99
- Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatyev P.S., Samodelkin A.G., Zolotova M.V., Shabalin M.A., Gracheva E.A.* Diagnostic capabilities of electrophoretic mobility of erythrocytes and buccal cells under stress ..... 106

### THE TEACHING

- Karaoglanova T.E., Padalko V.V.* The technique of problem-based learning as a way of teaching in the medical university ..... 112

### INFORMATION

- Maltseva L.D., Gorbachev N.A., Morozova O.L.* The newest history of department of pathophysiology of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University): at the turn of the 20th and 21st centuries (in honor 170th anniversary of department) ..... 118

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.28-008-07

Байке Е.В.<sup>1,2</sup>, Уразова О.И.<sup>2</sup>

# Полиморфизм генов цитокинов как фактор предрасположенности к развитию хронического гнойного среднего отита

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 672090, г. Чита, Россия, ул. Горького, 39а;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 634050, г. Томск, Россия, Московский тракт, д. 2

В последние десятилетия распространенность хронического гнойного среднего отита (ХГСО) заметно выросла. Значительная роль при воспалении, в том числе в патогенезе ХГСО, отводится клеточным медиаторам — цитокинам. Доказана роль полиморфизма генов цитокинов в развитии заболеваний, ассоциированных с воспалительными процессами. **Цель работы** — проанализировать взаимосвязь полиморфизма генов *IL1B* (*C3953T*, *C511T*, *T31C*), *IL10* (*G1082A*, *C592A*, *C819T*), *IL6* (*C174G*) и *TNFA* (*G308A*) с развитием ХГСО и возрастным фактором начальных его проявлений. **Методика.** Распределение генотипов аллельных вариантов генов цитокинов (*IL-1*, *IL-6*, *IL-10* и *TNF-α*) анализировали у 299 пациентов с ХГСО в зависимости от сроков начала заболевания (в возрасте до 14 лет, от 15 до 30 лет, старше 30 лет). Контрольную группу составили 183 здоровых добровольца с сопоставимым распределением по полу и возрасту. Для определения полиморфных вариантов генов *IL1B* (*-3953*, *-511*, *-31*), *IL10* (*-1082*, *-592*, *-819*), *IL6* (*-174*) и *TNFA* (*-308*) применяли метод ПЦР в режиме реального времени. Об ассоциации генотипов с заболеванием судили по величине отношения шансов (*Odds Ratio* (OR)) и коэффициентов Юла (Q) и контингенции (Phi, Φ). За критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался  $p \leq 0,05$ . **Результаты.** Выявлено, что к развитию ХГСО предрасполагают полиморфные варианты генов цитокинов *IL1B*, *IL10* и *TNFA*. Наиболее значимыми в формировании предрасположенности к развитию заболевания являются генотипы *C/C* полиморфизмов *C3953T* и *T31C* гена *IL1B*, *A/A* полиморфизма *G1082A* и *T/T* полиморфизма *C819T* гена *IL10*. Полиморфные варианты генов *IL1B* (генотип *C/C* полиморфизмов *C3953T* и *T511C*) и *IL10* (генотип *A/A* полиморфизма *G1082A*) сочетаются с дебютом ХГСО в возрасте до 14 лет. Полиморфизм *C174G* гена *IL6* не оказывает предрасполагающего влияния на развитие болезни. Протективный эффект в отношении развития ХГСО связан с носительством гомозиготного генотипа *T/T* полиморфизмов *C511T* и *T31C* гена *IL1B* и гомозиготного генотипа *G/G* полиморфизма *G1082A* гена *IL10*. **Заключение.** К развитию ХГСО предрасполагают полиморфизмы генов про- и противовоспалительных цитокинов, дисбаланс которых обуславливает патологическое течение иммунного ответа и раннюю (в детском возрасте) клиническую манифестацию болезни.

**Ключевые слова:** цитокины, полиморфизм генов, хронический гнойный средний отит.

**Для цитирования:** Байке Е.В., Уразова О.И. Полиморфизм генов цитокинов как фактор предрасположенности к развитию хронического гнойного среднего отита. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(1):4-14.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.4-14

**Для корреспонденции:** Байке Елена Викторовна, канд. мед. наук, ассистент каф. оториноларингологии ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России, e-mail: elenabayke@yandex.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента РФ для ведущих научных школ НШ-2690.2018.7.

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

**Поступила** 30.01.2018

Bayke E.V.<sup>1,2</sup>, Urazova O.I.<sup>2</sup>

## Cytokine gene polymorphism as a factor of predisposition to development of chronic purulent otitis media

<sup>1</sup>Chita State Medical Academy, Gorkogo Str. 3a, Chita 672090, Russian Federation;

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Moskovskiy Trakt 2, Tomsk 634050, Russian Federation

In recent decades, prevalence of chronic purulent otitis media has increased markedly. A significant role in inflammation, including the pathogenesis of chronic purulent otitis media, is assigned to the cellular mediators, cytokines. The predisposing role of cytokine gene polymorphism in development of inflammatory-associated diseases has been proven. **Aim.** To analyze the relationship of *IL1B*

(C3953T, C511T, T31C), IL10 (G1082A, C592A, C819T), IL6 (C174G), and TNFA (G308A) gene polymorphisms with development of chronic purulent otitis media and the age of its primary manifestation. **Methods.** Distribution of genotypes of allelic variants in cytokine (IL-1, IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ ) genes was analyzed in 299 patients (129 men and 170 women aged  $38.0 \pm 4.3$ ) based on the age of disease onset (with chronic purulent otitis media diagnosed at age of 14, from 15 to 30, and older than 30). The control group consisted of 183 sex- and age matched healthy volunteers. Genomic DNA was isolated from whole blood leukocytes. Real-time PCR was used for determination of polymorphic variants in *IL1B* (-3953, -511, -31), *IL10* (-1082, -592, -819), *IL6* (-174), and *TNFA* (-308) genes. The association of genotypes with the disease was evaluated by the odds ratio (OR) and the values of Yule (Q) and contingent (Phi,  $\Phi$ ) coefficients. The critical significance level for the statistical hypotheses tests was taken as  $\leq 0.05$ . **Results.** *IL1B*, *IL10*, and *TNFA* cytokine gene polymorphisms predisposed to development of chronic purulent otitis media. The genotypes C/C of C3953T and T31C polymorphisms in the *IL1B* gene, A/A of G1082A polymorphism, and T/T of C819T polymorphism in the *IL10* gene are the most significant ones in the predisposition to disease development. Polymorphic variants of *IL1B* (C/C genotype of C3953T and T511C polymorphisms) and *IL10* (A/A genotype of G1082A polymorphism) genes are associated with the onset of chronic purulent otitis media at age of 14. The C174G polymorphism in the *IL6* gene does not predispose to the disease. Protection from the development of chronic purulent otitis media is associated with carriage of the T/T homozygous genotype of C511T and T31C polymorphisms in the *IL1B* gene and the G/G homozygous genotype of G1082A polymorphism in the *IL10* gene. **Conclusion.** Polymorphisms of pro- and anti-inflammatory cytokine genes predispose to the development of chronic purulent otitis media. An imbalance of these cytokines results in a pathological course of immune response and early (children) clinical manifestation of the disease.

**Keywords:** cytokines, polymorphism of genes, chronic purulent otitis media.

**For citation:** Bayke E.V., Urazova O.I. Cytokine gene polymorphism as a factor of predisposition to development of chronic purulent otitis media. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal)*. 2019; 63(1): 4-14.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.4-14

**For correspondence:** Elena V. Bayke, PhD, assistant of otolaryngology division in Chita State Medical Academy, doctoral student of pathophysiology division in Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation, e-mail: elenabayke@yandex.ru

**Acknowledgments.** This work was supported by the Council for grants of the President of the Russian Federation for leading scientific schools NSh-2690.2018.7.

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

**Information about authors:**

Urazova O.I., <http://orcid.org/0000-0002-9457-8879>

Bayke E.V., <https://orcid.org/0000-0002-2480-9256>

**Received** 30.01.2018

В России распространенность хронического гнойного среднего отита (ХГСО) составляет до 39,2 случаев на 1000 человек взрослого населения, а в различных возрастных группах — от 15,3 до 52,0 или 0,8-4% среди всего населения [1]. В последние десятилетия случаи ХГСО среди детей стали встречаться в более раннем возрасте, а течение заболевания заметно изменилось, оно стало более агрессивным с риском возникновения опасных для жизни обострений, являющихся причиной внечерепных и внутричерепных осложнений. Смертность от осложнений ХГСО, вызванных обострениями заболевания, достигает 16,1% [2, 3]. В связи с этим, вопросы ранней диагностики с выбором тактики лечения и необходимого объема хирургического вмешательства с последующим послеоперационным ведением пациента до сих пор являются актуальными. Решение поставленных задач тесно связано с пониманием всех аспектов этиологии и патогенеза ХГСО, в том числе и состояния иммунологической реактивности индивида [4].

Одной из основных функций иммунной системы является защита организма от внедрения чужеродных антигенов (к примеру, инфекционных патогенов) и уда-

ление собственных клеток — аутореактивных, старых («отработанных») и модифицированных болезнетворными факторами. При внедрении в организм патогена активируется каскад иммунологических реакций с участием факторов врожденного и приобретенного иммунитета, приводящих к развитию воспаления [5]. В развитии воспаления принимают участие иммунокомпетентные клетки (моноциты/макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты, тромбоциты и др.) и широкий спектр медиаторов, в том числе система комплемента и цитокины (интерлейкины (IL), интерфероны (INF), факторы некроза опухоли (TNF) и др.), опосредующие инициацию, развитие воспалительного процесса и быстрое его завершение после удаления патогена (флоггена). Согласно исследованиям последних лет, индуцированный синтез медиаторов воспаления зависит от полиморфизма их генов [6, 7]. Так, у лиц, гомо- или гетерозиготных по «высокопродуцирующему» (ассоциированному с увеличением образования белкового продукта) аллелю *C3953T* гена *IL1B*, секретируется соответственно в 2 и 4 раза больше этого цитокина, чем у лиц, гомозиготных по аллелю *T* [7]. По мнению ряда ав-

торов, в зависимости от комбинации «высокопродуцирующих» и «низкопродуцирующих» полиморфных вариантов генов цитокинов характер воспалительного ответа может быть провоспалительным (у носителей «высокопродуцирующих» полиморфизмов генов провоспалительных цитокинов и «низкопродуцирующих» полиморфизмов генов противовоспалительных цитокинов) или противовоспалительным (у носителей «низкопродуцирующих» полиморфизмов генов провоспалительных цитокинов и «высокопродуцирующих» полиморфизмов генов противовоспалительных цитокинов) [6, 8, 9]. Таким образом, полиморфизм генов медиаторов может оказывать существенное влияние на предрасположенность к возникновению ассоциированных с воспалением заболеваний и обуславливать тяжесть их протекания [8].

**Цель** – анализ взаимосвязи полиморфизма генов *IL1B* (*C3953T*, *C511T*, *T31C*), *IL10* (*G1082A*, *C592A*, *C819T*), *IL6* (*C174G*) и *TNFA* (*G308A*) с развитием хронического гнойного среднего отита (ХГСО) и возрастным периодом начальных его проявлений (сроками первичной манифестации).

### Методика

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 академии. Обследовано 299 пациентов европеоидной расы, в том числе 129 (43,1%) мужчин и 170 (56,9%) женщин в возрасте 35–40 лет с ХГСО, проживающих на территории Забайкальского края и находившихся на лечении в ЛОР-отделении ГУЗ «Краевой клинической больницы № 1» Читы. Больные были распределены на 3 возрастные группы. Пациенты с началом заболевания в возрасте до 14 лет (178 человек) составили 1-ю группу, 2-ю – пациенты от 15 до 30 лет (81 человек), 3-ю – пациенты с первичной манифестацией ХГСО в возрасте старше 30 лет (40 человек). В контрольную группу были включены 183 здоровых добровольца (79 мужчин и 104 женщины в возрасте 30–40 лет) без патологии среднего уха. Группы были сопоставимыми по полу и возрасту.

При проведении молекулярно-генетического анализа у обследуемых геномную ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс – кровь» («Литех», г. Москва). Определение *SNP* промотора генов осуществлялось методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с использованием наборов для определения полиморфизмов в геноме че-

ловека НПФ «Литех» (Москва). Амплификация фрагментов гена проводилась на амплификаторе «ДТ-96» (Москва, Россия).

Результаты анализа позволяли дать 3 типа заключений: нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота.

Полученные данные обрабатывали с помощью пакетов программ *BIOSTAT*, *STATISTICA 10.0* (StatSoft Inc., США).

При статистическом анализе оценивали частоту встречаемости полиморфных вариантов генов цитокинов. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга. Сравнение частот распределения генотипов в группах исследования проводили с помощью критерия  $\chi^2$  (Пирсона) с поправкой Йейтса на непрерывность с использованием 4-польной таблицы сопряженности; если ожидаемых явлений в одной из ячеек было меньше 5, применяли точный критерий Фишера. В случаях отклонения от равновесия Харди-Вайнберга использовали общую или аддитивную модель наследования – тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов. Об ассоциации генотипов с заболеванием судили по величине отношения шансов (*Odds Ratio* (OR)) с расчетом 95% доверительного интервала. При  $OR < 1$  судили об отрицательной связи между признаками, при  $OR > 1$  – о положительной их связи. Дополнительно для подтверждения и анализа силы связи генотипов с ХГСО на основе принципа взаимной сопряженности рассчитывали коэффициент Юла (Q-коэффициент) по формуле  $K_a = a \times d - b \times c / a \times d + b \times c$  и коэффициент контингенции (Фи,  $\Phi$ ) по формуле  $K_k = a \times d - b \times c / \sqrt{(a+b) \times (b+d) \times (a+c) \times (c+d)}$ . При отсутствии связи между признаками значения Q и  $\Phi$  близки к 0, при ее наличии могут варьировать от «-1» (при полной обратной связи) до «1» (при полной прямой связи). Связь между признаками считали установленной, если абсолютные значения Q и  $\Phi$  находились в пределах от 0,5 до 1 [10].

Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался как  $p$  менее 0,05.

### Результаты и обсуждение

Общее распределение частоты встречаемости полиморфизмов генов *IL1B* (*C3953T* (*rs1143634*), *T511C* (*rs16944*), *T31C* (*rs1143627*)), *IL10* (*G1082A* (*rs1800896*), *C592A* (*rs1800872*), *C819T* (*rs1800871*)), *IL6* (*C174G* (*rs1800795*)) и *TNFA* (*G308A* (*rs1800629*)) у больных ХГСО и здоровых лиц Забайкальского края отражено в табл. 1.

Наибольший процент носителей «высокопродуцирующих» аллелей полиморфных вариантов генов про-

воспалительных цитокинов определялся среди лиц, страдающих ХГСО.

Так, частота встречаемости гомозиготного генотипа *C/C* полиморфного варианта *C3953T* гена *IL1B* у больных ХГСО была в 2 раза выше по сравнению с его частотой в группе контроля (табл. 1). При этом носители гетерозиготного *C/T* и гомозиготного *T/T* генотипов полиморфизма *C3953T* гена *IL1B* в группе больных ХГСО встречались реже на 13,5 и 13,2% соответственно, чем обладатели аналогичных генотипов среди здоровых добровольцев (табл. 1).

Гетерозиготный генотип *T/C* гена *IL1B* в полиморфном локусе *-511* обнаруживался на 22,1% чаще среди больных с ХГСО, чем среди здоровых лиц. При этом в контрольной группе чаще (в 2,9 раза) встречались обладатели гомозиготного варианта *T/T* полиморфизма *C511T* гена *IL1B* (табл. 1).

Количество больных ХГСО, имеющих гомозиготный генотип по аллелю *C* полиморфного локуса *-31* гена *IL1B*, превышало число здоровых носителей генотипа *C/C* данного полиморфизма в 2,4 раза. В то же время, обладателей гомозиготного генотипа по аллелю *T* полиморфизма *T31C* гена *IL1B* среди них было в 2,3 раза меньше, чем среди лиц группы контроля (табл. 1).

По данным литературы, носительство полиморфных локусов *-174* гена *IL6* и *-308* гена *TNFA* ассоциировано с воспалением среднего уха [11]. Однако в ходе проведенных нами молекулярно-генетических исследований статистически значимых различий в частоте встречаемости полиморфизма гена *IL6* (*C174G*) среди лиц контрольной группы и группы больных ХГСО выявлено не было (табл. 1). Наряду с этим, при анализе SNP гена *TNFA* (*G308A*) обнаружено, что носителей гомозиготного генотипа *G/G* полиморфного локуса *-308* гена *TNFA* было больше в группе больных с ХГСО (на 11,4%), а обладателей гетерозиготного генотипа *G/A* – в контрольной группе (на 10,2%) (табл. 1). К диаметрально противоположным выводам пришли авторы, показавшие, что риск развития острого среднего отита после перенесенной острой вирусной инфекции у носителей генотипа *A/A* полиморфизма гена *TNFA* (*G308A*) на 42% выше, чем у обладателей генотипа *G/G* ( $OR=1,43$ ) [12].

Полученные результаты согласуются с расчетами отношения шансов ( $OR$ ), свидетельствующими в пользу того, что носительство гомозиготного генотипа *C/C* полиморфных локусов *-3953* и *-31* гена *IL1B* ( $OR=3,206$  [95% CI: 2,141-4,800] и  $OR=3,127$  [95% CI: 1,950-5,016] соответственно), гетерозиготного генотипа *T/C* полиморфизма *T511C* гена *IL1B* ( $OR=2,468$  [95% CI: 1,689-3,606]) и гомозиготного генотипа *G/G* полиморфизма *G308A* гена *TNFA* ( $OR=1,791$  [95% CI: 1,184-2,711]) ас-

социированы с развитием ХГСО и могут рассматриваться как факторы риска развития заболевания (табл. 1).

Длительность и тяжесть воспалительного ответа в среднем ухе зависят от секреции клетками очага воспаления и концентрации в сыворотке крови противовоспалительных цитокинов, в частности  $IL-10$ , синтез которого ассоциирован с полиморфизмом гена *IL10* [6].

Анализ частоты распределения генотипов полиморфизма гена *IL10* (*G1082A*) среди больных ХГСО выявил снижение частоты носительства гомозиготного генотипа *G/G* (в 2,4 раза) и увеличение числа обладателей гомозиготного генотипа *A/A* (в 2,4 раза) по сравнению с таковыми у здоровых лиц (табл. 1).

Гомозиготный генотип *C/C* полиморфного варианта *C819T* гена *IL10* у больных ХГСО обнаруживался в 3,7 чаще, а гомозиготный генотип *T/T* данного полиморфизма – наоборот, в 2,4 раза реже, чем среди здоровых лиц (табл. 1).

Частота встречаемости генотипов полиморфизма *C592A* гена *IL10* у здоровых доноров и больных ХГСО была сопоставимой (табл. 1).

Показано, что наибольшее содержание противовоспалительного цитокина  $IL-10$  в сыворотке крови ассоциируется с носительством генотипов *G/G* и *T/T* полиморфных локусов *-1082* и *-819* гена *IL10* [13, 14]. Однако в ходе нашего исследования у больных ХГСО чаще, чем у здоровых доноров, обнаруживались генотипы *A/A* и *C/C* полиморфизмов *G1082A* и *C819T* гена *IL10* соответственно, обуславливающих, напротив, низкий уровень секреции цитокина, что позволяет расценивать носительство гомозиготного генотипа *A/A* полиморфизма *G1082A* ( $OR=3,127$  [95% CI: 1,950-5,016]) и гомозиготного генотипа *C/C* полиморфизма *C819T* ( $OR=5,335$  [95% CI: 3,108-9,158]) гена *IL10* как факторы предрасположения к развитию ХГСО (табл. 1).

Для подтверждения установленных ассоциаций полиморфизмов генов *IL1B* (*C3953T*, *C511T*, *T31C*) и *IL10* (*G1082A*, *C819T*) с ХГСО и определения силы их связи рассчитывались коэффициенты ассоциации ( $Q$ ) и контингенции ( $\Phi$ ) (табл. 2).

По результатам, представленным в таблице 2, выявлено, что наличие у жителей Забайкальского края гомозиготного генотипа *C/C* полиморфизмов *C3953T* и *T31C* гена *IL1B* ( $Q=0,6$ ), гомозиготного генотипа *A/A* полиморфизма *G1082A* ( $Q=0,7$ ;  $\Phi=0,5$ ) и гомозиготного генотипа *T/T* полиморфизма *C819T* ( $Q=0,5$ ) гена *IL10* связано с развитием ХГСО (значения коэффициентов 0,5 и более), т.е. является фактором предрасположения к болезни. В случае с полиморфизмом *G308A* гена *TNFA* обнаруживалась связь с ХГСО незначительной силы (значения коэффициентов ассоциации ( $Q$ ) и контингенции ( $\Phi$ ) близки к 0), следовательно при-

Таблица 1

Частота распределения генотипов полиморфизмов генов *IL1B (C3953T, C511T, T31C)*, *IL10 (G1082A, C592A, C819T)*, *IL6 (C174G)* и *TNFA (G308A)* у больных с хроническим гнойным средним отитом:

Полиморфизм генов	Здоровые доноры (n=183) Абс. (%), ( $\chi^2$ , p)	Больные ХГСО (n=299) Абс. (%), ( $\chi^2$ , p)	OR (95% CI)
<i>IL1B(C3953T)</i>			
<i>C/C</i>	46 (25,1)	155 (51,8) ( $\chi^2=32,206$ , $p_1<0,001$ )	3,206 (2,141-4,800)
<i>C/T</i>	103 (56,2)	128 (42,7) ( $\chi^2=7,728$ , $p_1=0,004$ )	0,581 (0,401-0,843)
<i>T/T</i>	34 (18,7)	16 (5,5) ( $\chi^2=19,966$ , $p_1<0,001$ )	0,248 (0,132-0,464)
<i>IL1B(T511C)</i>			
<i>T/T</i>	75 (41,0)	42 (14,2) ( $\chi^2=43,357$ , $p_1<0,001$ )	0,235 (0,152-0,365)
<i>T/C</i>	66 (36,0)	174 (58,1) ( $\chi^2=12,784$ , $p_1<0,001$ )	2,468 (1,689-3,606)
<i>C/C</i>	42 (23,0)	83 (27,7)	1,290 (0,841-1,978)
<i>IL1B(T31C)</i>			
<i>T/T</i>	90 (49,2)	65 (21,8) ( $\chi^2=37,935$ , $p_1<0,001$ )	0,287 (0,193-0,428)
<i>T/C</i>	66 (36,0)	129 (43,2)	1,345 (0,921-1,965)
<i>C/C</i>	27 (14,8)	105 (35,0) ( $\chi^2=22,658$ , $p_1<0,001$ )	3,127 (1,950-5,016)
<i>IL6 (C174G)</i>			
<i>C/C</i>	24 (13,1)	47 (15,9)	1,236 (0,727-2,100)
<i>C/G</i>	84 (45,9)	145 (48,6)	1,110 (0,767-1,605)
<i>G/G</i>	75 (41,0)	107 (35,5)	0,802 (0,550-1,171)
<i>IL10 (G1082A)</i>			
<i>G/G</i>	87 (47,5)	59 (19,9) ( $\chi^2=40,269$ , $p_1<0,001$ )	0,265 (0,176-0,397)
<i>G/A</i>	69 (37,7)	135 (45,0)	1,360 (0,934-1,980)
<i>A/A</i>	27 (14,8)	105 (35,1) ( $\chi^2=22,658$ , $p_1<0,001$ )	3,127 (1,950-5,016)
<i>IL10 (C819T)</i>			
<i>C/C</i>	87 (47,5)	110 (36,8) ( $\chi^2=40,914$ , $p_1<0,001$ )	5,335 (3,108-9,158)
<i>C/T</i>	78 (42,6)	129 (43,2)	1,021 (0,704-1,481)
<i>T/T</i>	18 (9,9)	60 (20,0) ( $\chi^2=39,140$ , $p_1<0,001$ )	0,277 (0,185-0,415)
<i>IL10 (C592A)</i>			
<i>C/C</i>	81 (44,3)	133 (44,5)	1,009 (0,697-1,461)
<i>C/A</i>	96 (52,4)	163 (54,6)	1,086 (0,751-1,571)
<i>A/A</i>	6 (3,3)	3 (0,9)	0,299 (0,074-1,210)
<i>TNFA(G308A)</i>			
<i>G/G</i>	123 (67,2)	235 (78,6) ( $\chi^2=7,113$ , $p_1=0,007$ )	1,791 (1,184-2,711)
<i>G/A</i>	57 (31,1)	63 (20,9) ( $\chi^2=5,638$ , $p_1=0,017$ )	0,590 (0,388-0,897)
<i>A/A</i>	3 (1,7)	1 (0,4)	0,201 (0,021-1,950)

Примечание.  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров.



частность носительства полиморфных вариантов *G/G* и *G/A (G308A)* гена *TNFA* к развитию ХГСО является относительной (табл. 1, 2).

Наряду с этим, на основании результатов вычисления отношения шансов OR и коэффициента Q можно утверждать, что протективный эффект в отношении развития ХГСО связан с носительством гомозиготного генотипа *T/T* полиморфизмов *C511T* (OR=0,235 [95% CI: 0,152-0,365]; Q=-0,6) и *T31C* (OR=0,287 [95% CI: 0,193-0,428]; Q=-0,5) гена *IL1B* и гомозиготного генотипа *G/G* полиморфного локуса *-1082* гена *IL10* (OR=0,265 [95% CI: 0,176-0,397]; Q=-0,6) (табл. 1, 2).

Следующим этапом нашего исследования явилось определение ассоциативности носительства изучаемых полиморфизмов генов про- и противовоспалительных цитокинов с возрастными периодами начальных проявлений ХГСО (по данным анамнеза, из амбулаторных карт по результатам посещения оториноларинголога).

Анализ распределения полиморфных генотипов генов *IL1B (C3953T, C511T, T31C)* и *IL10 (G1082A, C819T)* у лиц 1-й группы с манифестацией ХГСО в возрасте до 14 лет (табл. 3) показал, что гомозиготный генотип *C/C* полиморфизма в локусе *-3953* гена *IL1B* у них встречался в 2,1 и 14,1 раза чаще, чем у пациентов с дебютом ХГСО в возрасте от 15 до 30 лет (2-я группа) и старше 30 лет (3-я группа) соответственно (табл. 3). При этом носителей генотипа *C/C* данного полиморфизма в 3-й группе было в 6,7 раза меньше, а генотипа *T/T*, напротив, в 6,0 раз больше, чем во 2-й группе. Частота встречаемости гетерозиготного генотипа *C/T* полиморфного локуса *-3953* гена *IL1B* среди лиц 2-й и 3-й групп превышала таковую в 1-й группе более чем в 2 раза (табл. 3).

В группе пациентов с начальными проявлениями ХГСО в возрасте старше 30 лет количество носителей гомозиготного варианта *T/T* полиморфизма *C511T* гена *IL1B* было в 108,3 и 3,5 раза больше по сравнению с пациентами 1-й и 2-й групп соответственно. При этом разница в частоте встречаемости среди больных ХГСО 1-й и 2-й возрастных групп также была значительной (табл. 1). Носителей гетерозиготного генотипа *T/C* полиморфизма *C511T* гена *IL1B* среди лиц с дебютом ХГСО до 14 лет и в возрасте от 15 до 30 лет было в 3,3 и 2,9 раза соответственно больше, чем среди пациентов с началом заболевания после 30 лет. Также в 1-й возрастной группе было обнаружено практически двукратное преобладание лиц, имеющих гомозиготный генотип *C/C* полиморфного варианта гена *IL1B (T511C)*, по сравнению с 3-й группой (табл. 3).

Среди больных ХГСО с манифестацией заболевания в возрасте до 14 лет частота встречаемости гомозиготного генотипа *C/C* полиморфного локуса *-31* гена *IL1B* была выше, чем среди лиц с дебютом ХГСО в возрасте от 15

до 30 лет и старше 30 лет (в 5,4 и 21,6 раза соответственно) (табл. 3). В то же время, носительство генотипа *T/T* данного полиморфизма в 3-й возрастной группе регистрировалось чаще, чем во 2-й и 1-й группах (в 5,5 и 13,0 раза соответственно). Гетерозиготный генотип *T/C* полиморфного варианта гена *IL1B (T31C)* чаще обнаруживался среди больных ХГСО 2-й группы (табл. 3).

Что касается полиморфизмов гена противовоспалительного *IL-10*, то среди больных ХГСО в группе с началом заболевания в возрасте до 14 лет частота встречаемости гомозиготного по аллелю *A* генотипа полиморфного локуса *-1082* гена *IL10* была в 3,8 и 10,3 раза выше, чем среди пациентов 2-й и 3-й групп соответственно (табл. 3). При этом наиболее частое носительство гомозиготного генотипа *G/G* данного полиморфизма обнаруживалось среди пациентов группы с дебютом ХГСО в возрасте старше 30 лет (табл. 3). Обладателей гетерозиготного генотипа *G/A* полиморфизма *G1082A* гена *IL10* было больше среди больных с манифестацией ХГСО в возрасте от 15 до 30 лет, чем среди лиц в 1-й (в 2,0 раза) и 3-й (в 7,7 раза) группах. В то же время частота встречаемости гетерозиготного генотипа *G/A* в 1-й группе была выше, чем среди пациентов 3-й группы – в 3,9 раза (табл. 3).

Количество носителей гомозиготного генотипа *C/C* полиморфного локуса *-819* гена *IL10* среди лиц с дебютом заболевания после 30 лет было более чем в 2 раза больше, чем среди лиц 1-й и 2-й групп соответственно (табл. 3). При этом частота встречаемости гетерозиготного генотипа *C/T* у больных ХГСО 3-й группы выявлялась в 2,4 и 2,2 раза реже по сравнению с частотой

Таблица 2

**Ассоциативность полиморфизмов гена *IL1B (C3953T, C511T, T31C)* и гена *IL10 (G1082A, C819T)* с хроническим гнойным средним отитом**

Полиморфизм генов генотипы	Больные с хроническим гнойным средним отитом (n=299)	
	Коэффициент ассоциации Юла (Q)	Коэффициент контингенции Фи (Φ)
<i>IL1B (C3953T)</i>		
<i>C/C</i>	0,6	0,4
<i>C/T</i>	-0,4	-0,1
<i>IL1B (T511C)</i>		
<i>T/C</i>	0,4	0,2
<i>T/T</i>	-0,6	-0,1
<i>IL1B (T31C)</i>		
<i>T/T</i>	-0,5	-0,3
<i>C/C</i>	0,6	0,3
<i>IL10 (G1082A)</i>		
<i>G/G</i>	-0,6	-0,1
<i>A/A</i>	0,7	0,5
<i>IL10 (C819T)</i>		
<i>T/T</i>	0,5	0,3

Таблица 3

Частота распределения генотипов полиморфизмов генов *IL1B* (*C3953T*, *C511T*, *T31C*), *IL10* (*G1082A*, *C592A*, *C819T*), *IL6* (*C174G*) и *TNFA* (*G308A*) у больных с хроническим гнойным средним отитом в зависимости от срока первично установленного диагноза

Полиморфизм генов	1 группа больных ХГСО с первичной мани- фестацией болезни в возрасте до 14 лет (n=178) Абс. (%), ( $\chi^2$ , p)	2 группа больных ХГСО с первичной мани- фестацией болезни в возрасте от 15 до 30 лет (n=81) Абс. (%), ( $\chi^2$ , p)	3 группа больных ХГСО с первичной манифестацией болез- ни в возрасте старше 30 лет (n=40) Абс. (%), ( $\chi^2$ , p)
<i>IL1B (C3953T)</i>			
<i>C/C</i>	126 (70,7) ( $\chi^2=73,563$ , $p_1<0,001$ )	27 (33,3) ( $\chi^2=30,768$ , $p_2<0,001$ )	2 (5,0) ( $\chi^2=10,293$ , $p_3<0,001$ ) ( $\chi^2=55,630$ , $p_4<0,001$ )
<i>C/T</i>	52 (29,3) ( $\chi^2=25,895$ , $p_1<0,001$ )	50 (61,7) ( $\chi^2=30,768$ , $p_2<0,001$ )	26 (65,0) ( $\chi^2=16,679$ , $p_4<0,001$ )
<i>T/T</i>	0	4 (5,0)	12 (30,0) ( $\chi^2=12,793$ , $p_3<0,001$ )
<i>IL1B (T511C)</i>			
<i>T/T</i>	1 (0,6) ( $\chi^2=86,290$ , $p_1<0,001$ )	15 (18,6) ( $\chi^2=27,783$ , $p_2<0,001$ ) ( $\chi^2=11,631$ , $p_1<0,001$ )	26 (65,0) ( $\chi^2=6,702$ , $p_1=0,010$ ) ( $\chi^2=23,790$ , $p_3<0,001$ ) ( $\chi^2=119,108$ , $p_4<0,001$ )
<i>T/C</i>	119 (66,8) ( $\chi^2=33,014$ , $p_1<0,001$ )	47 (58,0)	8 (20,0) ( $\chi^2=14,119$ , $p_3<0,001$ ) ( $\chi^2=27,589$ , $p_4<0,001$ )
<i>C/C</i>	58 (32,6)	19 (23,4)	6 (15,0) ( $\chi^2=4,059$ , $p_4=0,044$ )
<i>IL1B (T31C)</i>			
<i>T/T</i>	13 (7,3) ( $\chi^2=75,562$ , $p_1<0,001$ )	14 (17,3) ( $\chi^2=22,609$ , $p_1<0,001$ ) ( $\chi^2=4,918$ , $p_2=0,026$ )	38 (95,0) ( $\chi^2=26,340$ , $p_1<0,001$ ) ( $\chi^2=62,860$ , $p_1<0,001$ ) ( $\chi^2=135,307$ , $p_4<0,001$ )
<i>T/C</i>	69 (38,8)	59 (72,8) ( $\chi^2=29,000$ , $p_1<0,001$ ) ( $\chi^2=24,513$ , $p_2<0,001$ )	1 (2,5) ( $\chi^2=16,035$ , $p_1<0,001$ ) ( $\chi^2=50,220$ , $p_3<0,001$ ) ( $\chi^2=18,074$ , $p_4<0,001$ )
<i>C/C</i>	96 (53,9) ( $\chi^2=59,926$ , $p_1<0,001$ )	8 (9,9) ( $\chi^2=43,148$ , $p_2<0,001$ )	1 (2,5) ( $\chi^2=32,931$ , $p_4<0,001$ )
<i>IL6 (C174G)</i>			
<i>C/C</i>	29 (16,3)	12 (14,8)	6 (15,0)
<i>C/G</i>	85 (47,7)	41 (50,6)	19 (47,5)
<i>G/G</i>	64 (36,0)	28 (34,6)	15 (37,5)
<i>IL10 (G1082A)</i>			
<i>G/G</i>	17 (9,5) ( $\chi^2=61,659$ , $p_1<0,001$ )	8 (9,9)	34 (85,0) ( $\chi^2=17,010$ , $p_1<0,001$ ) ( $\chi^2=63,408$ , $p_1<0,001$ ) ( $\chi^2=99,576$ , $p_4<0,001$ )
<i>G/A</i>	69 (38,8)	62 (76,5) ( $\chi^2=30,292$ , $p_2<0,001$ )	4 (10,0) ( $\chi^2=10,219$ , $p_1=0,002$ ) ( $\chi^2=45,176$ , $p_3<0,001$ ) ( $\chi^2=10,875$ , $p_4<0,001$ )
<i>A/A</i>	92 (51,7)	11 (13,6) ( $\chi^2=32,173$ , $p_2<0,001$ )	2 (5,0) ( $\chi^2=27,151$ , $p_4<0,001$ )
<i>IL10 (C819T)</i>			
<i>C/C</i>	54 (30,3) ( $\chi^2=10,509$ , $p_1=0,002$ )	27 (33,3) ( $\chi^2=4,059$ , $p_1=0,044$ )	29 (72,5) ( $\chi^2=7,223$ , $p_1=0,008$ ) ( $\chi^2=14,984$ , $p_3<0,001$ ) ( $\chi^2=22,870$ , $p_4<0,001$ )

Продолжение табл. 3 см. на стр. 11

Продолжение табл. 3.

Полиморфизм генов	1 группа больных ХГСО с первичной мани- фестацией болезни в возрасте до 14 лет (n=178) Абс. (%), ( $\chi^2$ , p)	2 группа больных ХГСО с первичной мани- фестацией болезни в возрасте от 15 до 30 лет (n=81) Абс. (%), ( $\chi^2$ , p)	3 группа больных ХГСО с первичной манифестацией болез- ни в возрасте старше 30 лет (n=40) Абс. (%), ( $\chi^2$ , p)
<i>C/T</i>	85 (47,7)	36 (44,4)	8 (20,0) ( $\chi^2=6,168$ , $p_1=0,014$ ) ( $\chi^2=5,848$ , $p_3=0,015$ ) ( $\chi^2=9,181$ , $p_4=0,002$ )
<i>T/T</i>	39 (22,0) ( $\chi^2=9,006$ , $p_1=0,003$ )	18 (22,3) ( $\chi^2=6,300$ , $p_1=0,013$ )	3 (7,5)
<i>IL10 (C592A)</i>			
<i>C/C</i>	76 (42,7)	38 (46,9)	19 (47,5)
<i>C/A</i>	102 (57,3)	42 (51,9)	19 (47,5)
<i>A/A</i>	0	1 (1,2)	2 (5,0)
<i>TNFA (G308A)</i>			
<i>G/G</i>	141 (79,2) ( $\chi^2=6,016$ , $p_1=0,015$ )	61 (75,3)	33 (82,5)
<i>G/A</i>	37 (20,8) ( $\chi^2=4,642$ , $p_1=0,032$ )	19 (23,4)	7 (17,5)
<i>A/A</i>	0	1 (1,3)	0

*Примечание.*  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров,  $p_2$  – у больных в 1-й и 2-й группах,  $p_3$  – у больных во 2-й и 3-й группах,  $p_4$  – у больных в 1-й и 3-й группах; абс. – абсолютные значения.

той его обнаружения среди пациентов с манифестацией заболевания до 14 лет и в возрасте от 15 до 30 лет соответственно (табл. 3).

В то же время, межгрупповых различий в распределении генотипов полиморфного варианта -308 гена *TNFA* в зависимости от возрастного периода манифестации ХГСО нами не было выявлено (табл. 3).

Формирование сосцевидного отростка височной кости, в частности его пневматизация, и структур среднего уха происходит от начала перинатального периода жизни человека до пубертатного возраста. Процесс определяется генетически и зависит от окружающих условий, в том числе и от воспалительных заболеваний среднего уха в младенчестве и раннем детстве [12]. Согласно эндодермальной теории J. Wittmaack (1918), эпизодический случай перенесенного острого отита в младенческом и раннем детском возрасте становится причиной ограниченной пневматизации клеток сосцевидного отростка [15]. Планиметрические измерения рентгенограмм, проведенные D. Diamant (1940) на представительной группе пациентов с заболеванием среднего уха, продемонстрировали результат ограниченной пневматизации височной кости в дальнейшей жизни индивида в виде развития воспалительных процессов в слизистой среднего уха. Таким образом, тип строения сосцевидного отростка на протяжении дальнейшей жизни субъекта предрасполагает к развитию

среднего отита и влияет на течение уже имеющих место эпизодов острого отита, способствуя хронизации патологического процесса в среднем ухе. Благополучное же завершение острой воспалительной реакции зависит от цитокинового профиля индивида. Цитокиновый дисбаланс, возникающий в результате дисрегуляторной патологии иммунной системы и обусловленный полиморфизмом генов про- и противовоспалительных цитокинов, приводит к нарушению стадийности иммунных реакций и продолжительному воспалительному ответу. Логично предположить, что в формировании патологического процесса в среднем ухе генетическая составляющая играет не менее важную роль, чем другие внутренние (предрасполагающие к ее развитию) факторы, такие как воспалительная патология полости и придаточных пазух носа, дисфункция евстахиевой трубы, патология носоглоточного кольца, а также внешние условия – социальные и климатические [9, 12, 16].

По результатам ранее выполненных работ нами показано, что у больных ХГСО присутствие в геноме определенных сочетаний полиморфных вариантов генов цитокинов оказывает существенное влияние на соотношение провоспалительных и противовоспалительных медиаторов в крови, что является одной из главных причин дисрегуляции воспалительного ответа среднего уха [17].

В настоящем исследовании у большинства пациентов с ХГСО нами выявлено носительство ассоциированных с развитием заболевания полиморфизмов *C3953T*, *T511C*, *T31C* гена провоспалительного *IL-1β* по «высокопродуцирующим» аллелям и полиморфизма *C819T* гена противовоспалительного *IL-10* по «низкопродуцирующему» аллелю. При этом ранняя манифестация ХГСО среди пациентов детского возраста сочеталась с наибольшей (сравнительно с другими возрастными периодами дебюта заболевания) частотой встречаемости гомозиготного по аллелю *C* генотипа полиморфизмов *C3953T*, *T31C* гена *IL1B* и гомозиготного по аллелю *A* генотипа полиморфизма *G1082A* гена *IL10*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что индивидуальное носительство «высокопродуцирующих» и «низкопродуцирующих» полиморфных вариантов генов про- и противовоспалительных цитокинов, обладающих плейотропным действием, может оказывать влияние на характер течения патологического процесса в среднем ухе с формированием профиля воспалительного ответа по гиперергическому типу [6].

Показано, что основополагающая роль в реализации местной воспалительной реакции и острофазового ответа на системном уровне отводится *IL-1β* за счет активирующего его влияния на Т-лимфоциты-хелперы типа 1 (*Th1*), цитотоксические Т-лимфоциты, натуральные киллеры (НК-клетки), моноциты/макрофаги, нейтрофилы и тромбоциты, их эмиграцию в очаг воспаления, в том числе посредством активации экспрессии молекул адгезии на клетках крови и эндотелия в зоне его повреждения при действии флогогена и других медиаторов. При этом уровень синтеза *IL-1β* и выраженность опосредованных им эффектов, в том числе фагоцитарная активность и окислительный потенциал лейкоцитов, во многом зависят от полиморфизмов гена *IL1B* [5]. Стимулирующий эффект цитокина на костную резорбцию за счет индукции экспрессии коллагеназы в фибробластах показан у больных с кариозно-деструктивным течением патологического процесса в среднем ухе. Так, установлены ассоциации между концентрацией *IL-1β* в сыворотке крови и степенью выраженности костной деструкции в среднем ухе при ХГСО [4, 18]. Нами также установлена связь «высокопродуцирующих» генотипов полиморфизмов *C3953T*, *C511T*, *T31C* гена *IL1B* с развитием ХГСО, в том числе в раннем возрасте — до 14 лет. Наиболее значимыми в этом отношении оказались полиморфные варианты генов *C3953T* и *T511C* гена *IL1B*.

По данным литературы, под влиянием *IL-1β*, равно как и компонентов бактериального происхождения, усиливается синтез *TNF-α* [19]. Участие *TNF-α* в противомикробной защите при воспалении среднего уха проявляется реализацией цитотоксического эффекта путем

инициации реакций «респираторного взрыва» в лейкоцитах, эмигрирующих в очаг воспаления вследствие хемоаттрактантных свойств цитокина и его способности повышать сосудистую проницаемость. Однако обусловленные эффектами *TNF-α* развитие тромбоза приносящих кровеносных сосудов в очаге воспаления приводит к состоянию гипоксии, стимулирует разрушение матрикса кости, ингибирует синтез коллагена и протеогликанов. Перечисленные эффекты обосновывают результаты исследований, в которых обнаружена прямая связь повышения концентрации *TNF-α* в сыворотке крови с длительностью и тяжестью воспалительных заболеваний разных локализаций [13, 20].

Наряду с полиморфизмами генов, определяющими вариабельность продукции *IL-1β*, полиморфизмы генов *TNF-α* и иных провоспалительных цитокинов (*IL-6*, *IL-8* и др.) также могут оказывать влияние на характер воспалительного ответа [9, 13]. Наиболее значимыми в данном аспекте считаются два полиморфных участка с единичными нуклеотидными заменами: *-308 (G→A)* и *-238 (G→A)*, которые влияют на количество синтезируемого продукта. В связи с наличием аллеля *A* полиморфизма *G308A* экспрессия гена *TNFA* и синтез *TNF-α* возрастают в десятки раз, что в определенных условиях может отражаться на иммунных реакциях организма с формированием системных проявлений воспалительного процесса, вплоть до септического шока [21]. Полиморфизм *-308 (G→A)* гена *TNFA* является маркером неблагоприятного прогноза у больных с малярией, менингококковой инфекцией, циррозом печени при гепатите С [22, 23]. Вместе с этим, в нашем исследовании с развитием ХГСО оказалось связанным наличие генотипа *G/G* полиморфизма *G308A* гена *TNFA* (OR=1,791), однако эту связь мы рассматриваем как слабую (коэффициенты ассоциации и контингенции близки к 0). При этом связи SNP гена *TNFA G308A* с возрастным периодом манифестации ХГСО не выявлено. Различий по распределению генотипов полиморфного локуса *-174* гена *IL6* у здоровых лиц и больных ХГСО также обнаружено не было, что предполагает отсутствие влияния полиморфизма *C174G* гена *IL6* на развитие среднего отита.

Полиморфизмы *G1082A*, *C592A*, *C819T* гена *IL-10* ассоциированы с низким уровнем синтеза этого интерлейкина, что может приводить к избыточному образованию провоспалительных цитокинов *IL-1β*, *IL-6*, *TNF-α*, реактивных интермедиатов кислорода и азота клетками ретикулоэндотелиальной системы и к повышенной смертности от ряда заболеваний, связанных с развитием асептического воспаления [24]. *IL-10* подавляет развитие *Th1*-ассоциированных реакций и активацию В-лимфоцитов, «респираторный взрыв» в лей-

коцитах, их адгезивные свойства, продукцию ими провоспалительных цитокинов и процессы свободно-радикального окисления липидов. При этом в условиях нормергического воспалительного ответа секреция *IL-10* толерогенными макрофагами и Т-регуляторными лимфоцитами с иммуносупрессорной активностью (Treg) направлена на ограничение степени выраженности и продолжительности иммунного ответа [25]. В случае гиперпродукции противовоспалительного цитокина происходит снижение противоинфекционной защиты, хронизация или генерализация воспалительного процесса. Так, отмечено, что повышенная секреция *IL-10* на микробный раздражитель в сочетании с носительством гомозиготного генотипа *G/G (G1082A)* гена *IL10* может приводить к подавлению воспаления на начальных этапах, способствует отягощению течения заболевания за счет отрицательного влияния цитокина на процессы репаративной регенерации тканей [13]. В ходе ранее проведенных исследований нами показано, что у больных ХГСО носительство генотипов *A/A* и *C/C* гена *IL10* в полиморфных локусах *-1082* и *-819* соответственно сочетается со сниженной концентрацией *IL-10* в сыворотке крови [26]. Этот факт объясняет наличие установленной нами связи ХГСО с наличием у больных гомозиготного генотипа *A/A* полиморфизма *G1082A* (OR=3,127; Q=0,7 и  $\Phi=0,5$ ) и гомозиготного генотипа *C/C* полиморфизма *C819T* (OR=5,335; Q=0,5) гена *IL10*.

### Заключение

Полиморфизм генов цитокинов *IL1B*, *IL10* и *TNFA* предрасполагает к развитию ХГСО. При этом наиболее значимыми в формировании предрасположения к развитию заболевания (по величине отношения шансов, коэффициентов ассоциации и контингенции) являются генотипы *C/C* полиморфизмов *C3953T* и *T31C* гена *IL1B*, *A/A* полиморфизма *G1082A* и *T/T* полиморфизма *C819T* гена *IL10*. Кроме того, полиморфные варианты генов *IL1B (C3953T, T511C)* и *IL10 (G1082A)* являются предиктором генетически обусловленного предрасположения к раннему клиническому проявлению заболевания и могут рассматриваться как один из этиологических факторов и (в перспективе) диагностических маркеров развития патологии среднего уха в возрасте до 14 лет.

### Литература

1. Миронов А.А. Хронический гнойный средний отит. *Вестник оториноларингологии* 2011; (5): 72-6.
2. Богомильский М.Р., Баранов К.К. Обострения хронического гнойного среднего отита в детском возрасте. *Вестник оториноларингологии* 2015; (3): 71-4.

3. Вишняков В.В., Лежнев Д.А., Саракуева А.Р. Конусно-лучевая компьютерная томография в диагностике хронического гнойного среднего отита. *Вестник оториноларингологии* 2014; (1): 52-4.
4. Власова Г.В., Егоров Л.В., Котов А.Ю., Варюшина Е.А., Симбирцев А.С. Особенности общей и местной иммунологической реактивности у детей с хроническими средними отитами. *Цитокины и воспаление* 2005; 4(4): 39-44.
5. Тимчук Л.Э., Янов Ю.К., Семенюк Д.Ю. Влияние полиморфизма генов *IL-1b* на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов. *Российская оториноларингология*. 2009; (6): 107-12.
6. Симбирцев А.С., Громова А.Ю., Рыдловская А.В. Роль полиморфизма генов цитокинов в регуляции воспаления и иммунитета. *Медицинский академический журнал* 2006; 6(1): 144-9.
7. Pociot F., Molvig J., Wogensen L. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* 1992; (22): 396-402.
8. Громова А.Ю., Чаплыгин А.В., Матшин В.О., Казаков А.А., Рыдловская А.В., Самцов А.В. Полиморфизм генов семейства интерлейкина-1 при псориазе. *Журнал кожных и венерических болезней*. 2007; (3): 4-8.
9. Ризванова Ф.Ф., Пикуза О.И., Файзуллина Р.А., Гайфуллина Р.Ф., Ризванов А.А., Кравцова О.А. Генетическая диагностика: полиморфизм генов цитокинов. *Практическая медицина*. 2010; (45): 42-3.
10. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. *Прикладная медицинская статистика*. СПб; Фолиант; 2006.
11. Patel J.A. Association of proinflammatory cytokine gene promoter polymorphisms with susceptibility to otitis media. *Pediatrics*. 2006; 118 (6): 2273-9.
12. Revai K., Patel J.A., James J., Nair S. Association between cytokine gene polymorphisms and risk for upper respiratory tract infection and acute otitis media. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49 (2): 257-61.
13. Совалкин В.И., Поморгайло Е.Г., Сабитова О.Н. Роль полиморфизма генов фактора некроза опухолей  $\alpha$  G-308A, интерлейкина-1 $\beta$  C511T и интерлейкина-10 G-1082A в развитии затяжного течения внебольничной пневмонии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2013; 6: 54-61.
14. Емельянова А.Н., Витковский Ю.А. Полиморфизм генов цитокинов *IL2 (T330G)*, *IL10 (C819T)* и *IL10 (G1082A)* при хроническом вирусном гепатите С. *Молекулярная медицина*. 2013; 3: 41-4.
15. Тос М. *Руководство по хирургии среднего уха*. Под ред. А.В. Староха. Томск: СибГМУ; 2005.
16. Бобашко М.Ю., Лопотко А.И. *Слуховая труба*. СПб; Диалог; 2014.
17. Байке Е.В., Витковский Ю.А., Дутова А.А. Влияние полиморфизма генов интерлейкинов и фактора некроза опухолей на уровень цитокинов в сыворотке крови у больных хроническим гнойным средним отитом. *Вестник оториноларингологии*. 2017; (3): 14-8.
18. Шпотин В.П., Галимзянов К.М., Еремина Н.В., Проскурин А.И. Оценка цитокинового статуса у больных хроническим гнойным средним отитом. *Цитокины и воспаление*. 2012; 11(4): 82-4.
19. Сенников С.В., Лопатникова Ю.А., Киреев Ф.Д., Голикова Е.А. Аутоантитела к цитокинам: биологическая и патогенетическая роль. *Цитокины и воспаление*. 2015; 14(2): 5-11.
20. Wassilew G.I., Lehnigk U., Duda G.N., Taylor W.R., Matziolis G., Dynybil C. The expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in the membranes of patients with osteoarthritis compared with traumatic knee disorders. *Arthroscopy*. 2010; 8(26): 1096-104.

21. Wilcox C.S., Welch W.J. Citotoxic cell. *Acta Physiol. Scand.* 2000; 20: 119-24.
22. Vasilescu A. Genomic analysis of Th1-Th2 cytokine genes in an AIDS colon: identification of IL4 and IL10 haplotypes associated with the disease progression. *Genes and Immunity.* 2003; (4): 441-9.
23. Yee L.J., Tang J., Gibson A.W. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology.* 2001; 3: 708-12.
24. Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Максимов В.Н. Комплекс генотипов цитокинов как генетический фактор риска развития инфаркта миокарда у мужчин европеоидного населения России. *Кардиология.* 2012; 52(7): 22-9.
25. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. *Цитокины.* СПб.; ООО «Издательство Фолиант»; 2008.
26. Байке Е.В., Витковский Ю.А. Влияние комбинаций полиморфизмов генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов на течение хронического гнойного среднего отита. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2017; 37(1): 32-40.
11. Patel J.A. Association of proinflammatory cytokine gene promoter polymorphisms with susceptibility to otitis media. *Pediatrics.* 2006; 118 (6): 2273-9.
12. Revai K., Patel J.A., James J., Nair S. Association between cytokine gene polymorphisms and risk for upper respiratory tract infection and acute otitis media. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49(2): 257-61.
13. Sovalkin V.I., Pomorgaylo Ye.G., Sabitova O.N. The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  G-308A, interleukin-1 $\beta$  C-511T and interleukin-10 G-1082A gene polymorphism in the development of slowly resolved course of community-acquired pneumonia *Byulleten' sibirskoy meditsiny.* 2013; 6: 54-61.
14. Emelyanova A.N., Vitkovsky Yu.A. Polymorphism of cytokine genes IL2 (T330G), IL10 (S819T) and IL10 (G1082A) in chronic viral hepatitis C. *Molekulyarnaya meditsina.* 2013; 3: 41-4. (In Russian)
15. Tos M. *Manual on the surgery of the middle ear.* Eds. A.V. Starokha. Tomsk; SibGMU; 2005. (In Russian)
16. Boboshko M.Yu., Lopotko A.I. *Eustachian tube. [Slukhovaya truba].* St. Petersburg; Dialog; 2014. (In Russian)
17. Bayke E.V., Vitkovskiy Yu.A., Dutova A.A. The influence of interleukin gene polymorphism on the serum cytokine level in the patients presenting with chronic suppurative otitis media. *Vestnik otorinolaringologii.* 2017; (3): 14-8. (In Russian)
18. Shpotin V.P., Galimzyanov Kh.M., Eremina N.V., Proskurin A.I. Evaluation of cytokine status in patients with chronic purulent otitis media. *Tsitokiny i vospalenie.* 2012; 11(4): 82-4. (In Russian)
19. Sennikov S.V., Lopatnikova J.A., Kireev F.D., Golikova E.A. Auto-antibodies to cytokines: biological and pathogenetic role. *Tsitokiny i vospalenie.* 2015; 14(2): 5-11. (In Russian)
20. Wassilew G.I., Lehnigk U., Duda G.N., Taylor W.R., Matziolis G., Dymybil C. The expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in the membranes of patients with osteoarthritis compared with traumatic knee disorders. *Arthroscopy.* 2010; 8(26): 1096-104.
21. Wilcox C.S., Welch W.J. Citotoxic cell. *Acta Physiol. Scand.* 2000; 20: 119-24.
22. Vasilescu A. Genomic analysis of Th1-Th2 cytokine genes in an AIDS colon: identification of IL4 and IL10 haplotypes associated with the disease progression. *Genes and Immunity.* 2003; (4): 441-9.
23. Yee L.J., Tang J., Gibson A.W. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology.* 2001; 3: 708-12.
24. Konenkov V.I., Shevchenko A.V., Prokof'ev V.F., Maksimov V.N. Complex of Genotypes of Cytokines as a Genetic Factor of Risk of Development of Myocardial Infarction of in European Population of Russia Men. *Kardiologiya.* 2012; 52(7): 22-9. (In Russian)
25. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. *Cytokines. [Tsitokiny].* St. Petersburg; «Izdatel'stvo Foliant»; 2008. (In Russian)
26. Bayke E.V., Vitkovskiy Yu.A. Influence of combinations of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms on the course of chronic purulent otitis media. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal.* 2017; 37(1): 32-40. (In Russian)

### References

1. Mironov A.A. Chronic purulent otitis media. *Vestnik otorinolaringologii.* 2011; (5): 72-6. (In Russian)
2. Bogomil'sky M.R., Baranov K.K. Exacerbation of chronic suppurative otitis media in the childhood. *Vestnik otorinolaringologii.* 2015; (3): 71-4. (In Russian)
3. Vishniakov V.V., Lezhnev D.A., Sarakueva A.R. The use of cone beam computed tomography for diagnostics of chronic suppurative otitis media. *Vestnik otorinolaringologii.* 2014; (1): 52-4. (In Russian)
4. Vlasova G.V., Egorov L.V., Kotov A.Yu., Varyushina E.A., Simbirtsev A.S. Features of systemic and local immune reactivity in children with chronic otitis media. *Tsitokiny i vospalenie.* 2005; 4(4): 39-44. (In Russian)
5. Timchuk L.Y., Yanov Yu.K., Semenyuk D.Yu. Influence of polymorphism of genes on functional activity neutrophily granulocytes. *Rossiyskaya otorinolaringologiya.* 2009; (6): 107-12. (In Russian)
6. Simbircev A.S., Gromova A.Yu., Rydlovskaya A.V. Cytokine gene polymorphism in the regulation of inflammation and immunity. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal.* 2006; 6(1): 144-9. (In Russian)
7. Pociot F., Molvig J., Wogensen L.A. TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* 1992; (22): 396-402.
8. Gromova A.Ju., Chaplygin A.V., Matygin V.O., Kazakov A.A., Rydlovskaja A.V., Samcov A.V. Interleukin-1 family gene polymorphism in psoriasis. *Zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney.* 2007; (3): 4-8. (In Russian)
9. Rizvanova F.F., Pikuza O.I., Fayzullina R.A., Gayfullina R.F., Rizvanov A.A., Kravcova O.A. Genetic diagnosis: polymorphism of cytokine genes. *Prakticheskaya meditsina.* 2010; (45): 42-3. (In Russian)
10. Zaycev V.M., Liflyandskiy V.G., Marinkin V.I. *Applied Medical Statistics. [Prikladnaya meditsinskaya statistika].* S-Pb.; Foliant; 2006. (In Russian)

### Сведения об авторах:

**Байке Елена Викторовна**, канд. мед. наук, ассистент каф. оториноларингологии ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России, докторант каф. патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России;

**Уразова Ольга Ивановна**, доктор мед. наук, проф., член-корреспондент РАН, зав. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Крохалева Ю.А.<sup>1</sup>, Страмбовская Н.Н.<sup>2</sup>, Кузник Б.И.<sup>2</sup>

## Агрегационная активность тромбоцитов у больных ишемическим инсультом — носителей генетического полиморфизма некоторых толл-подобных рецепторов

<sup>1</sup>ГУЗ «Краевая клиническая больница», 672038, Забайкальский край, г. Чита, Россия, ул. Коханского, д. 7;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», 672000, Забайкальский край, г. Чита, Россия, ул. Горького, 39а

**Цель** – изучение генетического полиморфизма толл-подобных рецепторов при ишемическом инсульте и его влияние на агрегационную активность тромбоцитов.

**Методика.** В исследовании приняли участие 115 больных ишемическим инсультом, в возрасте 55-65 лет и 94 сопоставимых по возрасту здоровых респондента. Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови. Первичный гемостаз (спонтанная и индуцированная агрегатометрия) изучался на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов АЛАТ-2. **Результаты** показали, что предикторами ишемического инсульта являются аллели: 753Arg TLR2, 249Pro TLR6, 1237C TLR9 и генотипы 753Arg/Arg TLR2, 299Asp/Asp TLR4, 249Pro/Pro TLR6 с отношением шансов от 1,49 до 3,35. Для развития инсульта имеет значение не только качество полиморфных маркеров, но и количество предикторных аллельных вариантов. У больных ишемическим инсультом в острейший период и в период формирования инфаркта мозга отмечается увеличение скорости и степени спонтанной агрегации тромбоцитов с последующим снижением к концу острого периода. При внесении АДФ (5 и 1,25 мкг/мл) и коллагена наблюдается снижение скорости и степени агрегации на 1-е и 10-е сут инсульта с увеличением таковых к 21-м сут. У больных – обладателей двух и более предиктивных аллелей полиморфизма толл-подобных рецепторов в геноме в динамике инсульта отмечаются сравнительно низкие показатели степени и скорости индуцированной агрегации тромбоцитов с увеличением радиуса агрегатов.

**Ключевые слова:** толл-подобные рецепторы; генетический полиморфизм; агрегация тромбоцитов; ишемический инсульт.

**Для цитирования:** Крохалева Ю.А., Страмбовская Н.Н., Кузник Б.И. Агрегационная активность тромбоцитов у больных ишемическим инсультом – носителей генетического полиморфизма некоторых толл – подобных рецепторов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 15-23.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.15-23

Для корреспонденции: **Крохалева Юлия Александровна**, врач клинично-диагностической лаборатории, e-mail: yulia.shalashowa@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.08.2017

Krokhaleva Yu.A.<sup>1</sup>, Stambovskaya N.N.<sup>2</sup>, Kuznik B.I.<sup>2</sup>

## PLATELET AGGREGATION ACTIVITY IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE, CARRIERS OF A GENETIC POLYMORPHISM OF SOME TOLL — LIKE RECEPTORS

<sup>1</sup>Territorial Clinical Hospital,

Kokhanskogo Str. 7, Chita 672038, Trans-Baikal Territory, Russian Federation;

<sup>2</sup>Chita State Medical Academy,

Gorkogo Str. 39a, Chita 672000, Trans-Baikal Territory, Russian Federation

**Aim.** To study genetic polymorphism of toll-like receptors in ischemic stroke and the polymorphism effect on the platelet aggregation ability. **Methods.** The study involved 115 patients with ischemic stroke aged 55-65 and 94 age-matched healthy respondents. DNA samples isolated from peripheral blood leukocytes were used for molecular genetic analysis of TLR2 (Arg753Gln), TLR3 (Phe412Leu), TLR4 (Asp299Gly), TLR6 (Ser249Pro), TLR9 (T - 1237 C). Primary hemostasis (spontaneous and induced aggregatometry) was studied using an ALAT-2 two-channel laser analyzer of platelet aggregation. **Results.** The study showed that predictors of ischemic stroke included the 753Arg TLR2, 249Pro TLR6, 1237C, and TLR9 alleles and the -753Arg/Arg TLR2, 299Asp/Asp TLR4, and 249Pro/Pro TLR6 genotypes with odds ratios from 1.49 to 3.35. Not only the quality of polymorphic markers but also the number of predictive allelic variants are important for the development of stroke. In patients with ischemic stroke in the acute phase and during the formation of cerebral infarction, increased rate and degree of spontaneous platelet aggregation were observed with a

subsequent decrease by the end of acute period. Addition of ADP (5 and 1.25 mg/ml) and collagen decreased the rate and degree of platelet aggregation on days 1 and 10 of stroke with an increase in both by day 21. In patients carrying two or more predictive alleles of the toll-like receptor polymorphism in the genome, relatively low rate and degree values of induced platelet aggregation with increased radius of the aggregates were observed in the dynamics of stroke

**Keywords:** toll-like receptors; genetic polymorphism; platelet aggregation; ischemic stroke.

**For citation:** Krokhalova Yu.A., Stambovskaya N.N., Kuznik B.I. PLATELET AGGREGATION ACTIVITY IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE, CARRIERS OF A GENETIC POLYMORPHISM OF SOME TOLL — LIKE RECEPTORS. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63 (1): 15-23. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.15-23

**For correspondence:** Krokhalova Julia Alexandrovna, doctor of kliniko-diagnostic laboratory, e-mail: yulia.shalashowa@yandex.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

Received 17.08.2017

## Введение

По данным Всемирной федерации неврологических обществ, ежегодно в мире регистрируется не менее 15 млн инсультов, в России — свыше 450 тыс. эпизодов [1]. В последние годы острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) начали выявляться у лиц моложе 40 лет. Высокий риск инвалидизации, серьезные экономические и социальные последствия делают эту проблему весьма актуальной.

Открытые сравнительно недавно толл-подобные рецепторы привлекли внимание ученых всего мира, поскольку проведенные многочисленные исследования доказали первостепенную роль этих белков в патогенезе как инфекционных, так и неинфекционных заболеваний [2, 3]. Встречаясь первыми на пути патогенов, они активируют синтез цитокинов, от которых зависит интенсивность воспалительной реакции, течение и исход заболевания. В настоящее время интенсивно изучается роль этих белков в развитии сердечно-сосудистых заболеваний — гипертонии, ишемической болезни сердца и атеросклероза, являющихся факторами риска ОНМК. В последние годы в литературе появились работы по изучению роли генетического полиморфизма толл-подобных рецепторов в патогенезе церебральных инсультов [4—8]. Результаты оказались достаточно противоречивыми, что вызывает особый интерес к изучению генетического полиморфизма toll-like рецепторов при ишемическом инсульте и его влиянии на отдельные патогенетические звенья.

Цель исследования — изучение генетического полиморфизма толл-подобных рецепторов при ишемическом инсульте и его влияние на агрегационную активность тромбоцитов.

## Методика

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 Читинской государственной медицинской академии (протокол № 30).

В исследовании приняли участие 115 больных ишемическим инсультом (ИИ) в возрасте 55-65 лет и 94 здоровых сопоставимых по возрасту респондента. Первичный гемостаз (спонтанная и индуцированная агрегатометрия) изучался на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 (НПФ «БИОЛА», Россия) с реактивами фирмы ООО «Технология стандарт». Запись агрегатограммы проводилась при 37 °С в течение 7 мин. Исследования крови пациентов с ИИ проводили в 1-е, 10-е и 21-е сут заболевания. У лиц контрольной группы кровь на исследование брали однократно.

**Используемые реактивы.** В качестве индуктора использовали следующие реагенты: АДФ в конечных концентрациях 5 мг/мл и 1,25 мг/мл; коллаген — 1 мг/мл; адреналин — 5 мг/мл; ристомидин — 15 мг/мл. Последующий анализ агрегационной кривой включал в себя оценку типа агрегатограммы и определение следующих показателей: степени агрегации (максимальный процент светопропускания плазмы и размер радиуса агрегатов, опт. ед.) и скорости агрегации (опт. ед.). Ввиду того, что вторая волна повышения агрегации регистрировалась в небольшом числе случаев, расчет степени и времени агрегации на всех кривых проводился по отношению к первой агрегационной волне.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови (реагенты ДНК-Экспресс-кровь, НПФ «Литех», Москва). Амплификацию фрагментов генов проводили в термоциклере «Бис-М112» (ООО «Бис-Н», Новосибирск). Визуализация продуктов амплификации выполнена с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в про-



ходящем ультрафиолетовом свете. Полученные результаты трактовали согласно инструкции производителя. Забор крови для данного исследования осуществлялся однократно у пациентов в обеих группах наблюдения.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программ Microsoft Excel 2007, BIOSTAT, Statistica 6,0 (StatSoft Inc., USA). Вычисляли индивидуальный генетический индекс (IGI), являющийся ранжированной величиной, характеризующей совокупный эффект носительства изучаемого генетического полиморфизма (кумулятивная полимерия) в группе. Учитывали, что нормальная гомозигота – это «1», гетерозигота – «2», мутантная гомозигота – «3» для *TLR6 (Ser249Pro)* и *TLR9 (T1237-C)*, для *TLR2 (Arg753Gln)* и *TLR4 (Asp299Gly)* нормальная гомозигота принималась за «3», гетерозигота – за «2», мутантная гомозигота – за «1» [9].

Формула расчета:

индивидуальный генетический индекс (IGI) у отдельного пациента:

$$IGI_A = \frac{A_{HP1} + A_{HP2} + A_{HPn} + \dots}{N}$$

После унификации и суммации баллов находили M и сравнивали с подобными контрольными значениями с помощью критерия  $\chi^2$ .

## Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что различия аллелей и генотипов изучаемых толл-рецепторов в группе больных и контрольной группе по генотипу *753Arg/Arg TLR2* с статистически значимо большей частотой встречаются у больных ИИ ( $p=0,02$ ). Генотип *753Arg/Gln TLR2* и аллель *753Gln* данного рецептора чаще встречался у здоровых резидентов ( $p=0,02$ ;  $p=0,01$  соответственно) (табл. 1). Относительный риск развития ИИ у носителей генотипа *Arg/Arg* составил 2,41 [CI 95%: 1,33 – 4,36], для обладателей генотипа *Arg/Gln* – 0,44 [CI 95%: 0,24 – 0,81]. RR для лиц, имеющих дикий аллель, равен 2,21 [CI 95%: 1,29 – 3,78], для резидентов, несущих мутантный аллель – 0,45 [CI 95%: 0,26 – 0,78].

Следует отметить, что у мышей с дефектом *TLR2* при ишемическом/реперфузионном повреждении отмечается существенно более слабый воспалительный

Таблица 1

Генетический полиморфизм toll-like рецепторов у больных ишемическим инсультом

Полиморфизм	Генотип, аллель	Частота генотипа, аллеля, n (%)		p	$\chi^2$	RR [95% CI:]
		Клиническая группа (n=115)	Контрольная группа (n=94)			
<i>TLR2 (Arg753Gln) rs 5743708</i>	<i>Arg/Arg</i>	95 (82,6)	62 (66)	0,02	7,78	2,45[1,29–4,67] 0,4[0,21 – 0,77] 0,82[0,05–13,2]
	<i>Arg/Gln</i>	19 (16,5)	31 (33)			
	<i>Gln/Gln</i>	1 (0,9)	1 (1)			
	<i>Arg</i>	0,909	0,824	0,01	6,52	2,12[1,18–3,80] 0,47[0,26–0,85]
	<i>Gln</i>	0,091	0,176			
<i>TLR3 (Phe412Leu) rs 3775291</i>	<i>Phe/Phe</i>	53 (46)	47 (50)	0,31	2,35	0,85[0,50–1,48] 1,43[0,82–2,48] 0,56[0,22–1,47]
	<i>Phe/Leu</i>	54 (47)	36 (38,3)			
	<i>Leu/Leu</i>	8 (7)	11 (11,7)			
	<i>Phe</i>	0,696	0,691	0,93	0,01	1,02[0,67–1,55] 0,98[0,65–1,49]
	<i>Leu</i>	0,304	0,309			
<i>TLR4 (Asp299Gly) rs 4986790</i>	<i>Asp/Asp</i>	84 (72,2)	45 (47,9)	$p<0,001$	30,23	2,82[1,59–5,02] 0,16[0,08–0,33] 2,72[1,03–7,16]
	<i>Asp/Gly</i>	14 (12,2)	43 (45,7)			
	<i>Gly/Gly</i>	18 (15,7)	6 (6,4)			
	<i>Asp</i>	0,783	0,707	0,08	3,11	1,49[0,96–2,32] 0,67[0,43–1,05]
	<i>Gly</i>	0,217	0,293			
<i>TLR6 (Ser249Pro) rs 5743810</i>	<i>Ser/Ser</i>	20 (17,4)	23 (24,5)	$p=0,0002$	16,99	0,65[0,33–1,27] 0,38[0,21–0,69] 3,2[1,81 – 5,67]
	<i>Ser/Pro</i>	26 (22,6)	41 (43,6)			
	<i>Pro/Pro</i>	69 (60)	30 (31,9)			
	<i>Ser</i>	0,287	0,463	$p=0,0002$	13,78	0,47[0,31–0,70] 2,14[1,43–3,21]
	<i>Pro</i>	0,713	0,537			
<i>TLR9 (T1237C) rs 5743836</i>	<i>T/T</i>	80 (69,5)	77 (81,9)	0,1	4,58	0,5[0,26 – 0,97] 1,8[0,91 – 3,54] 3,35[0,37–30,5]
	<i>T/C</i>	31 (27)	16 (17)			
	<i>C/C</i>	4 (3,5)	1 (1,1)			
	<i>T</i>	0,830	0,904	0,03	4,79	0,52[0,29–0,94] 1,93[1,06–3,50]
	<i>C</i>	0,170	0,096			

ответ и менее выраженная инфильтрация лейкоцитами канальцев почек [10]. Установлено, что генотип *Arg/Arg TLR2 (Arg753Gln)* при ряде заболеваний связан с возникновением воспалительной реакции [11, 12]. Исследование идентичного полиморфизма у китайского населения, страдающего ИБС, показало отсутствие мутантного аллеля [13]. Согласно выводам британских ученых, экспрессия *TLR2* наблюдается в атеросклеротических бляшках, что, в свою очередь, вызывает развитие воспалительного процесса стенки сосуда, что в последующем приводит к отрыву бляшек и тромбов [12]. Учитывая данные литературы и результаты собственных исследований, можно высказать предположение, что наличие дикого аллеля *TLR2 (Arg753Gln)*, особенно в гомозиготном состоянии, должно способствовать развитию мощной воспалительной реакции в сосудистой стенке.

У больных ОНМК нами обнаружено более частое носительство нормального аллеля *TLR4 (Asp299Gly)* – 0,783 против 0,707 у здоровых респондентов ( $p < 0,0001$ ). Генотип *Gly/Gly TLR4* наблюдался чаще у больных с ОНМК. Степень риска развития ишемического инсульта у носителей генотипа *Asp/Asp* составила 2,82 [CI 95%: 1,59 – 5,02], у гетерозигот – 0,16 [CI 95%: 0,08 – 0,33], у мутантных гомозигот – 2,72 [1,03–7,16]. У носителей дикого аллеля RR составил 1,49 [CI 95%: 0,96 – 2,32], для носителей минорного аллеля – 0,67 [CI 95%: 0,43 – 1,05]. В литературе имеются данные о том, что маркер *299Gly* гена *TLR4* ассоциирован со снижением иммунного ответа на ЛПС бактерий в результате уменьшения клеточной экспрессии и дальнейшего прекращения взаимодействия *TLR4* с ЛПС [14]. Доказано участие *TLR4* в развитии экспериментального церебрального инфаркта [15]. Более того, ряд авторов [11, 16] отмечает, что наличие аллеля *299Gly* гена *TLR4* вносит существенный вклад в процесс атерогенеза. Столь противоречивые результаты не позволяют сделать однозначных выводов, но дают нам возможность предположить, что носительство генотипа *Asp/Asp* и *Asp*-аллеля *TLR4 (Asp299Gly)* повышает риск развития атеросклероза, а впоследствии и инсульта. Гетерозиготное носительство аллелей несет защитную функцию, предотвращая возникновение инсульта, либо способствуя течению ОНМК в более легкой форме [2].

Среди больных значительно чаще встречались носители *Pro/Pro*-генотипа и *Pro*-аллеля *TLR6* ( $p = 0,0002$ ), для которых степень риска развития заболевания составила 3,2 [CI 95%: 1,81–5,67] и 2,14 [CI 95%: 1,43–3,21] соответственно. Гетерозигот среди больных оказалось меньше, чем в группе контроля ( $p = 0,0002$ ), для них степень риска развития инсульта равна 0,38 [CI 95%: 0,21 – 0,69]. Носителей дикого аллеля *TLR6*

(*Ser249Pro*) было больше среди здоровых респондентов ( $p = 0,0002$ ), *RR* для развития цереброваскулярной патологии составил 0,47 [CI 95%: 0,31–0,7]. Подобные результаты были получены у жителей Кавказа с ИБС. Высказано предположение, что *Ser*-аллель *TLR6* защищает сосуды от развития атеросклероза [17]. Нормальный аллель *TLR6 (Ser249Pro)* приводит к уменьшению числа так называемых «функциональных карманов» в *LRR* домене рецептора, что делает белок менее доступным для связывания с лигандами. Напротив, *Pro*-аллель увеличивает количество «карманов». *Ser/Ser* генотип снижает активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и выработку ИЛ-6, тем самым уменьшая риск развития атеросклероза [17]. Таким образом, *Pro*-аллель имеет предикторную направленность к ОНМК, а *Ser*-аллель обладает протективными свойствами.

У лиц группы больных ИИ по отношению к контролю отмечалось более частое носительство мутантного аллеля *TLR9 (T1237C)* ( $p = 0,03$ ). При этом относительный риск заболевания для больных с ОНМК оказался равным 1,93 [CI 95%: 1,06–3,5], а для обладателей аллеля 1237C в гомозиготном состоянии данный показатель составил 3,35 [CI 95%: 0,37–30,51], (табл. 1). Следовательно, носительство мутантного аллеля как в гомо-, так и в гетерозиготном состоянии может предрасполагать к цереброваскулярной патологии [2, 15]. Считается, что С-аллель полиморфного маркера *TLR9 (T1237C)* создает повышенное сродство к NF $\kappa$ B, увеличивающее транскрипционную активность генов и, как следствие, рост продукции цитокинов и хемокинов [18].

Нами установлено, что IGI в пределах 2,2–2,4 (то есть наличие в геноме более 2 рисков аллелей изучаемого полиморфизма) чаще наблюдался у больных ИИ ( $\chi^2 = 9,5$ ;  $p = 0,02$ ), в то время как IGI = 1,4–1,6 встречался реже, чем в контрольной группе ( $\chi^2 = 8,9$ ;  $p = 0,03$ ) (табл. 2). Таким образом, чем больше количество аллельных вариантов, повышающих риск возникновения ИИ, тем выше риск развития данного заболевания.

У пациентов группы больных ИИ на протяжении всего острого периода инсульта в сравнении с контролем степень индуцированной агрегации тромбоцитов при внесении адреналина оказалась существенно усиленной ( $p < 0,05$ ), но статистически значимо снижалась при добавлении АДФ в концентрациях 5 и 1,25 мкг/мл, а также коллагена. Спонтанная агрегация тромбоцитов была выше у больных на 10-е сут заболевания, чем в контрольной группе (табл. 3). Скорость агрегации тромбоцитов у больных ИИ по отношению к здоровым респондентам снижалась при внесении коллагена, АДФ (1,25 мкг/мл) и адреналина ( $p < 0,05$ ). В динамике заболевания скорость агрегации тромбоцитов, ин-

дуцированной АДФ (5 и 1,25 мкг/мл) и адреналином, увеличивалась к концу острого периода, скорость же спонтанной агрегации значимо снижалась ( $p < 0,05$ ) (табл. 4). Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей [10, 19, 20].

Таким образом, у больных ишемическим инсультом в острейший период и в период формирования инфаркта мозга отмечалось увеличение скорости и степени спонтанной агрегации и ее снижение к концу острого периода. При внесении АДФ (5 и 1,25 мкг/мл) и коллагена скорость и степень агрегации в 1-е и 10-е сут инсульта была снижена, но увеличивалась к 21 сут.

У больных, носителей дикого аллеля *TLR2* (*Arg753Gln*), по сравнению с данными контроля, при внесении АДФ (1,25 мкг/мл) наблюдались более низкие показатели степени агрегации, а при добавлении АДФ (5 мкг/мл) и адреналина степени и скорости агрегации ( $p < 0,05$ ). Отмечено, что степень спонтанной агрегации в период формирования инфаркта мозга была выше у больных-носителей минорного аллеля *TLR2* (*Arg753Gln*), нежели у больных-носителей нормально-го аллеля *TLR2* (*Arg753Gln*) ( $p < 0,05$ ). У обладателей

*753Arg*-аллеля степень и скорость агрегации при внесении АДФ 5 мкг/мл увеличивалась к концу острого периода инсульта, у носителей *753Gln*-аллеля отмечалась более высокая степень спонтанной агрегации тромбоцитов в период формирования инфаркта мозга по сравнению с острейшим периодом нарушения мозгового кровообращения.

У носителей как нормального, так и рискованного аллеля *TLR3* (*Phe412Leu*) степень агрегации, индуцированной АДФ (1,25 мкг/мл), степень и скорость агрегации при внесении АДФ (5 мкг/мл) или адреналина, а также скорость агрегации при добавлении коллагена была меньше, чем у здоровых респондентов ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что степень агрегации, индуцированной коллагеном, у обладателей *412Phe*-аллеля *TLR3* (*Phe412Leu*) на 21-е сут инфаркта мозга превышала таковую у носителей аналогичного аллеля контрольной группы ( $p < 0,05$ ). У носителей дикого аллеля *TLR3* (*Phe412Leu*) степень агрегации при внесении АДФ 5 мкг/мл имела тенденцию к снижению, в то время как при добавлении адреналина к концу острого периода отмечалось статистически значимое ее увеличение

Таблица 2

## Индивидуальный генетический индекс у больных ишемическим инсультом

Группы наблюдения	Индивидуальный генетический индекс			
	1,4–1,6	1,8–2	2,2–2,4	Более 2,4
Клиническая группа (n=115)	5,2% ( $\chi^2=8,9$ ; $p=0,03$ ) <sup>1</sup>	37,4%	48,7% ( $\chi^2=9,5$ ; $p=0,02$ ) <sup>1</sup>	8,7%
Контрольная группа (n=94)	14,9%	48,9%	28,7%	7,5%

Примечание.  $\chi^2$ <sup>1</sup>- сравнение показателей между больными ишемическим инсультом и здоровыми исследуемыми.

Таблица 3

## Степень спонтанной и индуцированной агрегации тромбоцитов в крови у больных ишемическим инсультом, Ме [P25–P75]

Группы наблюдения		Коллаген 1 мг/мл		АДФ 5 мкг/мл		АДФ 1,25 мкг/мл		Адреналин 5 мг/мл		Спонтанная	
		Опт.ед.	%	Опт.ед.	%	Опт.ед.	%	Опт.ед.	%	Опт.ед.	%
Клиническая группа (n=100)	1 сут.	7,05 (5,27; 9,32)	54,8 (40,77; 76,22)	5,52 (4,13; 7,97)	14,1 (3,54; 33,85) <sup>1</sup>	5,29 (4,04; 6,78) <sup>1</sup>	26,65 (10,82; 58,65) <sup>1</sup>	5,85 (3,81; 7,51) <sup>1</sup>	73,4 (31,85; 100) <sup>1</sup>	1,16 (1,04; 1,46)	1,99 (1,11; 3,28)
	10 сут.	6,54 (5,67; 9,18)	53,7 (33,45; 67,8)	6,31 (4,34; 7,97)	20 (7,5; 36,6) <sup>1,2</sup>	6,03 (5,09; 7,12) <sup>1</sup>	25,6 (14,42; 40,27) <sup>1</sup>	5,62 (4,29; 7,11)	77,9 (50,35; 88,75) <sup>1</sup>	1,27 (1,13; 1,48) <sup>1</sup>	1,96 (1,12; 2,79)
	21 сут.	8,23 (6,52;9,51)	59,8 (38,27;69,7) <sup>1</sup>	6,64 (5,53;9,04)	16,4 (6,11; 36,32) <sup>1</sup>	6,46 (4,64; 8,48) <sup>3</sup>	22,5 (17,65; 37,1) <sup>1</sup>	6,5 (5,56; 7,75)	92 (78,8; 120,25) <sup>1</sup>	1,15 (1,03; 1,42)	1,37 (0,99; 2,78) <sup>4</sup>
Контрольная группа (n=89)		7,89 (6,01;9,77)	71 (53,5; 79,8)	7,23 (5,39;9,15)	41,25 (11; 63,72)	6,21 (4,72; 7,79)	58,2 (22,7; 79,6)	6,47 (4,81; 7,93)	73,9 (56,32; 91,05)	1,13 (1,01; 1,44)	1,99 (1,23; 3,48)

Примечание.  $u$ <sup>1</sup>–  $p < 0,05$  – сравнение показателей клинической группы с показателями контрольной группы;  $u$ <sup>2</sup>–  $p < 0,001$  – различия показателей, полученных на 10-е сут инсульта, и данных в 1-е сут заболевания при добавлении АДФ 5 мкг/мл;  $u$ <sup>3</sup>–  $p < 0,001$  – сравнение показателей, полученных на 21-е сут инсульта, с показателями в 1-е сут при добавлении АДФ 1,25 мкг/мл;  $u$ <sup>4</sup>–  $p < 0,001$  – отличия между показателями спонтанной агрегации на 21-е и 1-е сут ОНМК.

( $p < 0,001$ ). При индукции агрегации коллагеном и АДФ (1,25 мкг/мл) зарегистрировано повышение ее скорости на 10-е сут ишемического инсульта, что отличалось от значений, полученных в 1-е и 21-е сут заболевания ( $p < 0,05$ ).

Степень и скорость агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ (5 и 1,25 мкг/мл) и адреналином, у пациентов-носителей 299Asp-аллеля ( $p < 0,05$ ) и 299Gly-аллеля ( $p < 0,001$ ) TLR4 (Asp299Gly) оказались более низкими, чем в контрольной группе. У обладателей как нормального, так и минорного аллеля TLR4 (Asp299Gly), страдающих ИИ, по сравнению со здоровыми, при внесении коллагена установлены существенно более высокие значения степени агрегации. В то же время при добавлении к плазме коллагена скорость агрегации у носителей дикого аллеля TLR4 (Asp299Gly) по сравнению с таковой в контроле статистически значимо снижалась. У больных, имеющих 299Gly-аллель TLR4 (Asp299Gly), при внесении коллагена и адреналина размер агрегатов был статистически значимо больше, чем у больных-носителей нормального аллеля. В динамике заболевания статистически значимые отличия были выявлены у носителей рискованного аллеля TLR4 (Asp299Gly), у которых скорость агрегации, индуцированной АДФ (1,25 мкг/мл) и адреналином, была максимальной к окончанию периода формирования инфаркта мозга и, соответственно, значимо отличалась от значений, полученных в 1-е и 21-е сут инсульта.

У носителей предиктивных аллелей генетического полиморфизма толл-подобных рецепторов параметры агрегации тромбоцитов оказались разнонаправленными. Сравнительный анализ показателей агрегации в зависимости от генетического индекса в группе контроля не дал значимых результатов, однако радиус агрегатов как при спонтанной, так и индуцированной различными активаторами агрегации у здоровых респондентов с IGI от 2,0 оказался выше, чем у наблюдаемых с индексом менее 2,0. У больных с IGI, в пределах 1,4–1,8 отмечалось увеличение степени и скорости спонтанной агрегации в 1-е сут и снижение скорости агрегации, индуцированной АДФ (5 мкг/мл), на 10-е сут в отличие от пациентов с IGI=2–2,2. В динамике заболевания у обладателей IGI=1,4–1,8 при внесении АДФ (5 мкг/мл) наблюдалась тенденция к увеличению агрегации тромбоцитов к концу острого периода. В группе больных ИИ с IGI=2,4 и более, в отличие от лиц с IGI= 2–2,2, наблюдалась низкая степень и скорость агрегации, индуцированной коллагеном. В течение острого периода ОНМК у больных с IGI=2,4 и более отмечалось снижение скорости агрегации к концу периода формирования инфаркта мозга (табл. 5). У пациентов с IGI более 2.0 в динамике заболевания независимо от используемых индукторов радиус агрегатов увеличивался, тогда, как у больных с показателем IGI менее 2.0 картина была разнородной.

Таблица 4

**Скорость спонтанной и индуцированной агрегации тромбоцитов в крови у больных ишемическим инсультом, Ме [P25–P75]**

Группы наблюдения	Коллаген 1 мг/мл		АДФ 5 мкг/мл		АДФ 1,25 мкг/мл		Адреналин 5 мг/мл		Спонтанная		
	Опт.ед.	%	Опт.ед.	%	Опт.ед.	%	Опт.ед.	%	Опт.ед.	%	
Клиническая группа (n=100)	1 сут	10,4 (4,74; 16,4) <sup>1</sup>	71,5 (30,9; 119,5)	16,9 (9,6; 25,45)	65,4 (46,57; 93,92)	9,69 (6,81; 19,3) <sup>1</sup>	27,5 (12,22; 53,1) <sup>1</sup>	3,88 (2,21; 5,98) <sup>1</sup>	15,6 (7,77; 34,4) <sup>1</sup>	0,25 (0,17; 0,42)	2,08 (1,33; 3,5)
	10 сут	10 (4,12; 13,8) <sup>1</sup>	61,4 (37,8; 86,55) <sup>2</sup>	18 (12,75; 24,05)	66,7 (49,15; 105,5)	13,7 (7,62; 20,9)	33,55 (20,3; 67,9)	5,85 (3,82; 8,67)	15,4 (8,52; 30,1) <sup>1,4</sup>	0,24 (0,18; 0,36)	1,71 (1,11; 2,61) <sup>5</sup>
	21 сут	8,31 (5,81; 15,02)	74,1 (51,9; 160,7)	19,7 (15,12; 27,05) <sup>2</sup>	78,4 (54; 102,05)	12,6 (9,47; 23,72) <sup>3</sup>	25,8 (11,37; 57,82)	5,33 (3,79; 9,61) <sup>4</sup>	15,2 (9,9; 23,5) <sup>1</sup>	0,22 (0,18; 0,37)	1,75 (1,28; 2,77)
Контрольная группа (n=89)	14,1 (8; 19,45)	86,8 (64,07; 132)	21,5 (11,8; 28,6)	70,7 (53,1; 90,1)	16,2 (9,4; 22,2)	40,9 (22,860,37)	5,49 (3,2; 8)	42,5 (16; 62,3)	0,24 (0,14; 0,43)	1,79 (1,3; 3,05)	

Примечание.  $u_1^1$  –  $p < 0,05$  – сравнение показателей больных ишемическим инсультом и здоровых респондентов;  $u_2^2$  –  $p < 0,001$  – различия показателей, полученных на 21-е сут инсульта, и данных агрегации в 1-е сут заболевания при добавлении АДФ 5 мкг/мл;  $u_3^3$  –  $p < 0,001$  – сравнение показателей, полученных на 21-е сут инсульта, с показателями в 1-е сутки при добавлении АДФ 1,25 мкг/мл;  $u_4^4$  –  $p < 0,001$  – отличия между показателями агрегации, индуцированной адреналином, с 1-ми сут ОНМК;  $u_5^5$  –  $p < 0,001$  – отличия между показателями спонтанной агрегации на 10-е и 1-е сут ОНМК.

Таблица 5

## Скорость и степень агрегации тромбоцитов в зависимости от генетического индекса у больных ишемическим инсультом, Ме [P25–P75]

Индукторы агрегации			Клиническая группа						Контрольная группа	
			индекс 1,4–2			индекс более 2			индекс 1,4–2	индекс более 2
			1 сут	10 сут	21 сут	1 сут	10 сут	21 сут		
коллаген 1 мг/мл	степень	оп. ед	6,68 (4,22; 7,82)	5,98 (4,32; 7,41)	5,03 (4,59; 7,95)	5,22 (3,64; 6,85)	5,6 (4,22; 7,13)	6,73 (5,86; 7,31) <sup>3</sup>	6,43 (4,81; 8,15)	6,52 (4,97; 7,17)
		%	81,1 (49,18; 109,5) <sup>5</sup>	68,5 (50,22; 83,73)	80 (78,7; 160)	69,2 (23,05; 92,7)	79,35 (47,6; 87,83)	95,3 (79,2; 119,5) <sup>3,5</sup>	75,1 (59,9; 92,7)	68,7 (52,7; 80,1)
	скорость	оп. ед	13,3 (5,69; 19,43) <sup>6</sup>	10,45 (4,2; 16,95)	8,08 (4,6; 16,7)	<b>9</b> (4,44; 14) <sup>1</sup>	9,1 (3,71; 12,03) <sup>1</sup>	10,1 (7,85; 13,05)	13,1 (8,24; 19,3)	14,9 (4,36; 19,5)
		%	94,25 (58,83; 126,75) <sup>6</sup>	59,95 (41; 86,15) <sup>2,3</sup>	61,9 (51,6; 166)	<b>58,1</b> (21,65; 97,7)	63,7 (32,48; 79,7)	76,5 (57,95; 147)	88,6 (64,3; 132)	86,7 (38,1; 132)
АДФ 5 мкг/мл	степень	оп. ед	6,79 (4,58; 9,23)	6,49 (5,67; 9,19)	8,54 (7,25; 9,95)	7,13 (5,4; 9,44)	7,69 (5,97; 9,67)	7,56 (6,8; 6,69)	7,76 (5,99; 9,13)	8,96 (6,02; 10,3)
		%	55,9 (39,3; 77)	53,95 (36,08; 59,35) <sup>2</sup>	60,7 (39,4; 63,7)	53,6 (42,3; 4,5)	51,75 (21,25; 68,88) <sup>1</sup>	50,7 (29,07; 74,43)	71 (53,65; 81,5)	69,05 (53,45; 77,6)
	скорость	оп. ед	18,2 (9,06; 24,5)	18,5 (11,73; 23,05)	19,7 (14,8; 25,7)	15,4 (10,5; 25,6)	18,75 (16,58; 24,63)	22,7 (14,3; 26,85)	19,7 (10,9; 27,75)	25,35 (14,78; 32,08)
		%	69,6 (48,75; 93,05)	67,8 (55,7; 83,05)	70,1 (52,9; 90,2)	62,8 (44,6; 100)	60,65 (43,05; 106,25)	81,55 (42,35; 113,3)	70,1 (50,75; 90,2)	71,25 (53,73; 82,48)
АДФ 1,25 мкг/мл	степень	оп. ед	5,69 (4,2; 8,62)	7,36 (5,94; 8,09) <sup>6</sup>	8,65 (6,46; 9,05) <sup>4</sup>	5,44 (3,91; 7,72) <sup>2</sup>	<b>5</b> (3,98; 7,26) <sup>2</sup>	6,07 (3,27; 8,47)	7,02 (5,33; 9,06)	7,86 (6,57; 9,49)
		%	14 (5,34; 34)	26,1 (15,1; 44,55)	23,6 (9,54; 30,4)	14,4 (3,39; 33,6) <sup>2</sup>	17,45 (4,48; 31,65) <sup>2</sup>	8,44 (2,23; 48,65) <sup>2</sup>	33,25 (5,6; 64,55)	47,15 (17,2; 61,93)
	скорость	оп. ед	11,4 (7,07; 22,85)	16,4 (10,55; 22)	15,5 (11; 24,4)	9,02 (6,13; 18) <sup>2</sup>	11,1 (5,04; 17,57) <sup>1</sup>	12,5 (5,35; 21,68)	14,8 (8,54; 20,38)	18,15 (13,85; 23,15)
		%	28,7 (14,55; 50)	41,3 (28,75; 80,15) <sup>3</sup>	33,4 (23,4; 65,7)	26,3 (11,8; 55,5)	26,35 (11,63; 64,13)	17,4 (8,24; 43,63)	43,1 (20; 60,53)	37,75 (27,33; 53,35)
Адреналин 5 мг/мл	степень	оп. ед	5,3 (4,26; 6,81)	6,3 (5,25; 7,86) <sup>3</sup>	6,39 (4,44; 7,83)	5,29 (3,81; 6,67) <sup>2</sup>	6,11 (4,91; 6,86)	6,36 (4,64; 8,03)	5,81 (4,48; 7,4)	6,85 (5,17; 8,58)
		%	29,2 (11; 67,6) <sup>1</sup>	29 (16; 47,3) <sup>3</sup>	20,3 (18,4; 38,4)	23,8 (9,6; 58,2) <sup>2</sup>	23,55 (10,02; 40,28) <sup>2</sup>	27,7 (10,16; 56,08) <sup>2</sup>	57,8 (20,05; 80,25)	61,95 (45,9; 75,13)
	скорость	оп. ед	3,69 (2,06; 5,44)	6,13 (4; 10) <sup>3</sup>	4,27 (3,77; 6,98)	4,22 (2,35; 6,25) <sup>2</sup>	5,08 (3,2; 7,64)	5,96 (2,89; 9,67)	5,06 (2,72; 7,82)	6,72 (3,99; 8,11)
		%	16,5 (7,89; 35,35) <sup>2</sup>	16,7 (8,13; 30,7) <sup>2</sup>	16,7 (10; 18,7)	14,8 (7,7; 29) <sup>3</sup>	14,1 (8,53; 32,65) <sup>2</sup>	15,7 (6,8; 59,7) <sup>2</sup>	40,6 (13,45; 58,8)	43,9 (36,13; 71,73)
спонтанная	степень	оп. ед	1,13 (1,06; 1,47)	1,29 (1,16; 1,72) <sup>2,3</sup>	1,14 (1,07; 1,41)	1,21 (1,03; 1,42)	1,24 (1,09; 1,45)	1,25 (1,04; 1,41)	1,13 (1,01; 1,39)	1,1 (1,02; 1,53)
		%	2,19 (1,27; 3,37)	2,14 (1,12; 3,74)	2,09 (1,29; 2,81)	1,77 (1,06; 3,22)	1,97 (1,09; 2,7)	1,25 (1,01; 2,65)	2,36 (1,41; 3,45)	1,74 (0,95; 3,23)
	скорость	оп. ед	0,27 (0,19; 0,53)	0,24 (0,17; 0,54)	0,22 (0,19; 0,53)	0,25 (0,16; 0,41)	0,24 (0,2; 0,35)	0,22 (0,18; 0,31)	0,23 (0,16; 0,43)	0,26 (0,13; 0,44)
		%	2,02 (1,38; 3,13)	1,66 (1,07; 2,58)	2,05 (1,3; 2,91)	2,09 (1,21; 4,05)	1,84 (1,32; 2,43)	1,68 (1,32; 2,49)	1,88 (1,41; 3,09)	1,66 (1,04; 2,19)

Примечание.  $u_1^1$  –  $p < 0,05$ ;  $u_2^2$  –  $p < 0,01$  – сравнение показателей клинической и контрольной групп – носителей одноименного аллеля;  $u_3^3$  –  $p < 0,05$  – отличие показателей, полученных на 10-е сут, от таковых в 1-е сут ОНМК;  $u_4^4$  –  $p < 0,05$  – разница показателей на 10-е и 21-е сут инсульта;  $u_5^5$  –  $p < 0,05$  – сравнение значений больных с IGI=1,4–2 со значениями больных, имеющих генетический индекс более 2; при сравнении показателей пациентов с IGI=1,4–2 и показателями пациентов с индексом более 2 в контрольной группе значимых различий не выявлено.

Таким образом, у больных — обладателей 2 и более предиктивных для развития ишемического инсульта аллелей в геноме индуцированная в динамике агрегация тромбоцитов сопровождалась увеличением радиуса агрегатов и усилением степени агрегации. Данный феномен, возможно, объясняется усиленной спонтанной агрегацией тромбоцитов, благодаря чему основная агрегация происходит в циркуляции, а при анализе остаются тромбоциты с низкой агрегационной активностью [21–23].

### Выводы

1. Предикторами ишемического инсульта являются аллели: 753Arg TLR2, 249Pro TLR6, 1237C TLR9 и генотипы 753Arg/Arg TLR2, 299Asp/Asp TLR4, 249Pro/Pro TLR6 с отношением шансов от 1,49 до 3,35.

2. Для развития инсульта имеет значение не только качество полиморфных маркеров, но и количество предикторных аллельных вариантов.

3. У больных ишемическим инсультом в острейший период и в период формирования инфаркта мозга отмечается увеличение скорости и степени спонтанной агрегации и снижение к концу острого периода. При внесении АДФ (5 и 1,25 мкг/мл) и коллагена наблюдается снижение скорости и степени агрегации на 1-е и 10-е сут инсульта с увеличением таковых к 21-м сут.

4. У больных — обладателей 2 и более предиктивных аллелей полиморфизма толл-подобных рецепторов в геноме в динамике инсульта отмечаются сравнительно низкие показатели степени и скорости индуцированной агрегации тромбоцитов с увеличением радиуса агрегатов.

### Литература

1. Широков Е.А. *Гемодинамические кризисы и варианты ишемического инсульта*. М.; ГЭОТАР — Медиа, 2011.
2. Крохалева Ю.А., Страмбовская Н.Н., Алферова А.Е. Генетический полиморфизм Toll-рецепторов у больных ишемическим инсультом в Забайкальском крае. *Забайкальский медицинский вестник*. 2014; (4). (электронный вариант)
3. Крохалева, Ю.А., Марковский А.В., Страмбовская Н.Н. Роль толл-подобных рецепторов в патогенезе неинфекционных заболеваний. *Забайкальский медицинский журнал*. 2015; (4): 11–7.
4. Hua F., Ma J., Ha T., Kelley J.L., Kao R.L., Schweitzer J.B. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Research*. 2009; (1262): 100–8.
5. Tang Sung-Chun, Xiangru Xu, Aiwu Cheng, Mohamed M., Dong Gyu Jo. et al. Pivotal role for neuronal toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104: 13798–803.
6. Seung —Ae, Yang. Association of TLR6 single nucleotide polymorphisms and clinical features of ischemic stroke in Korean population. *Journal Exercise Rehabilitation*. 2013; (9): 526–31.

7. Wang H., Zeng Y., Xiong B., Li J., Qiu X., Pinhu L. et al. The association of polymorphisms of TLR4 and CD14 genes with susceptibility to sepsis in a Chinese population. *Medical Genetics*. 2014; (15): 2–9.
8. Lehnardt S., Lachance C., Patrizi S., Lefebvre S., Follett P., Jensen F. et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *Journal of Neuroscience*. 2002; (22): 2478–86.
9. Страмбовская, Н.Н. Ассоциация полиморфных генетических маркеров с различными вариантами ишемического инсульта [электронный ресурс]. *Медицина и образование в Сибири*. 2015; (1). Режим доступа: [http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1635](http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1635). — 3.11.2015.
10. Кузник Б.И., Морозова И.Ю., Роднина О.С., Страмбовская Н.Н., Ширшов Ю.А. Лейкоцитозы и исходы острого нарушения мозгового кровообращения. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. Корсакова*. 2010; 110(3): 10–14.
11. Хорева М.В., Варивода А.С., Ковальчук Л.В. Изучение функциональной активности Toll-подобных рецепторов у больных инфарктом миокарда. *Аллергология и иммунология*. 2006; 7(3): 352.
12. Bustamante J., Tamayo E., Flórez S., Telleria J., Bustamante E., López J. et al Toll-like Receptor 2 R753Q Polymorphisms Are Associated With an Increased Risk of Infective Endocarditis. *Rev Esp Cardiol*. 2011; 64. (электронный ресурс).
13. Лю Луна, Лу Вексин, Цянь Qiaohui, Ци Weigang, Ху Jifan, Фэн Бо. Частота генетического полиморфизма TLR 2, 4 и 9 у населения китайцев и их предрасположенность к диабету 2 типа и ишемической болезни сердца. *Биомедицина и биотехнология*. 2012; (3): 10–3.
14. Витковский, Ю.А. Кузник Б.И., Солпов А.В. Феномен лимфоцитарно–тромбоцитарного розеткообразования. *Иммунология*. 1999; (4): 35–7.
15. Song Y., Liu H., Long L., Song M., Liu L., Ning Z. TLR4 rs1927911, but not TLR2 rs5743708 is associated with atherosclerotic cerebral infarction in the southern han population: A Case – Control Study/Song. *Medicine*. 2015; 94(2): 381–8.
16. Скорочко О.В., Боброва Н.А., Измайлова О.В., Кайдашев И.П. Роль некоторых пародонтопатогенных микроорганизмов и Asp299Gly полиморфизма гена TLR4 в патогенезе атеросклероза. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; (5): 83–6.
17. Hamann L., Sur S., Koch A., Hofer N. Association of a common TLR – 6 polymorphism with coronary artery disease – implications for healthy ageing? *Immunity and Ageing*. 2013. (Электронный ресурс).
18. Beulter, B. Toll-like receptors as the primary sensors of the innate immune system. *The Immunologist*. 2008; (6): 123–30.
19. Kuznik B.I., Vitkovsky Y.A., Gvozdeva O.V., Solpov A.V., Magen E. Lymphocyte–Platelet Crosstalk in Graves’ Disease. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2014; 347(3): 206–10.
20. Морозова И.Ю., Страмбовская Н.Н., Терешков П.П., Кузник Б.И. Методы оценки агрегационной активности форменных элементов крови в норме и у больных ишемическим инсультом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; (5): 295–9.
21. Крохалева, Ю.А., Страмбовская Н.Н., Алферова А.Е. Носительство генетического полиморфизма toll- рецепторов и степень экспрессии некоторых из них у больных ишемическим инсультом. *Врач - аспирант*. 2015; 1(68): 26–32.
22. Морозова И.Ю., Страмбовская Н.Н., Кузник Б.И., Роднина О.С. Роль лейкоцитов в развитии нарушения гемостаза у больных с мозговым инсультом. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2015; (1): 51–6.

23. Морозова И.Ю., Страмбовская Н.Н. Лейкоцитоз и агрегационная активность тромбоцитов в прогнозировании исходов ОНМК. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2013; (4): 13-6.

### References

- Shirokov E.A. *Hemodynamic crises and options for ischemic stroke. [Gemodinamicheskie krizy' i varianty' ishemicheskogo insulta]*. Moscow; Geotar – Media; 2011. (in Russian)
- Krokhaleva Yu. A., Strambovskaia N.N., Alferova A.E. Genetic polymorphism Toll-receptors at patients with an ischemic stroke in Zabaykalsky Region. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2014; 4 (electronic option). (in Russian)
- Krokhaleva Yu.A., Markovskiy A.V., Strambovskaia N.N. The role of toll-like receptors in the pathogenesis of non-communicable diseases. *Zabaykal'skiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 4: 11–7. (in Russian)
- Hua F., Ma J., Ha T., Kelley J.L., Kao R.L., Schweitzer J.B. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Research*. 2009; 1262: 100–8.
- Tang Sung-Chun, Xiangru Xu, Aiwu Cheng, Mohamed M., Dong Gyu Jo. et al. Pivotal role for neuronal toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104: 13798–803.
- Seung – Ae Yang. Association of TLR6 single nucleotide polymorphisms and clinical features of ischemic stroke in Korean population. *Journal Exercise Rehabilitation*. 2013; 9: 526–31.
- Wang H., Zeng Y., Xiong B., Li J., Qiu X., Pinhu L. et al. The association of polymorphisms of TLR4 and CD14 genes with susceptibility to sepsis in a Chinese population. *Medical Genetics*. 2014; 15: 2–9.
- Lehnardt S., Lachance C., Patrizi S., Lefebvre S., Follett P., Jensen F. et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *Journal of Neuroscience*. 2002; (22): 2478–86.
- Strambovskaia N.N. Association of polymorphic genetic markers with different variants of ischemic stroke. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri*. 2015; 1. (electronic resource). (in Russian)
- Kuznik B.I., Morozova I.Yu., Rodnina O.S., Strambovskaia N.N., Shirshov Yu.A. Leukocytosis and outcomes of acute cerebrovascular accident. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni Korsakova*. 2010; 110(3): 10-4. (in Russian)
- Khoreva M.V., Varivoda A.S., Kovalchuk L.V. Study of the functional activity of Toll-like receptors in patients with myocardial infarction. *Allergologiya i immunologiya*. 2006; 7(3): 352. (in Russian)
- Bustamante J., Tamayo E., Flórez S., Telleria J., Bustamante E., López J. et al Toll-like Receptor 2 R753Q Polymorphisms Are Associated With an Increased Risk of Infective Endocarditis. *Rev Esp Cardiol*. 2011; (64). (electronic resource).
- Luna L., Veksin L., Qiaohui T., Weigang T., Jifan K., Bo F. The frequency of genetic polymorphism TLR 2, 4 and 9 in the Chinese population and their susceptibility to type 2 diabetes and coronary heart disease. *Biomeditsina i biotekhnologiya*. 2012; 3: 10–3. (in Russian)
- Vitkovskiy Yu. A., Kuznik B.I., Solpov A.V. Phenomenon of lymphocytic and platelet rosetting. *Immunologiya*. 1999; 4: 35–7. (in Russian)
- Song Y., Liu H., Long L., Song M., Liu L., Ning Z. TLR4 rs1927911, but not TLR2 rs5743708 is associated with atherosclerotic cerebral infarction in the southern han population: A Case – Control Study. *Medicine*. 2015; 94 (2): 381–8.
- Skochko O.V., Bobrova N.A., Izmaylova O.V., Kaydashev I.P. The role of some periodontopathogenic microorganisms and Asp299Gly polymorphism of the TLR4 gene in the pathogenesis of atherosclerosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011; 5: 83–6. (in Russian)
- Hamann L., Sur S., Koch A., Hoefler N. Association of a common TLR – 6 polymorphism with coronary artery disease – implications for healthy ageing? *Immunity and Ageing*. 2013; (electronic resource). <http://www.immunityageing.com/>
- Beulter B. Toll-like receptors as the primary sensors of the innate immune system. *The Immunologist*. 2008; 6: 123–30.
- Kuznik B.I., Vitkovskiy Y.A., Gvozdeva O.V., Solpov A.V., Magen E. Lymphocyte-Platelet Crosstalk in Graves' Disease. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2014; 347(3): 206-10.
- Morozova I.Yu., Strambovskaia N.N., Tereshrov P.P., Kuznik B. I. Methods for assessing the aggregation activity of blood corpuscles in normal and in patients with ischemic stroke. *Klinicheskaya I laboratornaya diagnostika*. 2016; 5: 295-9. (in Russian)
- Krokhaleva Yu. A., Strambovskaia N.N. Carriage of genetic polymorphism of toll-like receptors and degree of an expression of some of them at patients with an ischemic stroke. *Vrach – aspirant*. 2015; 1(68): 26–32. (in Russian)
- Morozova I.Yu., Strambovskaia N.N., Kuznik B. I., Rodnina O.S. The role of leukocytes in the development of hemostatic disorders in patients with cerebral stroke. *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2015; 1: 51-6. (in Russian)
- Morozova I.Yu., Strambovskaia N.N. Leukocytosis and platelet aggregation activity in predicting outcomes of stroke. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 4: 13-6. (in Russian)

### Сведения об авторах:

**Крохалева Юлия Александровна**, врач клинко-диагностической лаб., e.mail: yulia.shalashowa@yandex.ru;  
**Кузник Борис Ильич**, проф., доктор мед. наук, заслуженный деятель науки РФ, проф. каф. нормальной физиологии, e.mail: bi\_kuznik@mail.ru;  
**Страмбовская Наталья Николаевна**, канд. мед. наук, доцент каф. неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, e.mail: strambovskaia@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-001.27:611.018.26

Лебедев В.Г.<sup>1</sup>, Дешевой Ю.Б.<sup>1</sup>, Темнов А.А.<sup>1,4</sup>, Астрелина Т.А.<sup>1</sup>, Рогов К.А.<sup>2</sup>, Насонова Т.А.<sup>1</sup>,  
Лырщикова А.В.<sup>1</sup>, Добрынина О.А.<sup>1</sup>, Склифас А.Н.<sup>3</sup>, Мхитаров В.А.<sup>2</sup>, Трофименко А.В.<sup>4</sup>, Мороз Б.Б.<sup>1</sup>

## Изучение эффектов стромально-васкулярной фракции, культивированных стволовых клеток жировой ткани и паракринных факторов кондиционной среды при терапии тяжелых лучевых поражений кожи у крыс

<sup>1</sup> ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, 123182, г. Москва, Россия, ул. Живописная, д. 46;

<sup>2</sup> ФГБНУ «НИИ морфологии человека», 117418, г. Москва, Россия, ул. Цюрупы, д. 3;

<sup>3</sup> Институт биофизики клетки РАН, 142292, Московская область, г. Пущино;

<sup>4</sup> ФГАОУВО «Московский физико-технический институт» (государственный университет), 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Россия

**Цель** — изучение влияния трансплантации стромально-васкулярной фракции (СВФ), культивированных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) жировой ткани и введения паракринных факторов кондиционной среды, полученных при культивировании ММСК, на течение тяжелых местных радиационных поражений кожи. **Методика.** Крыс инбредной линии Wistar-Kyoto облучали на рентгеновской установке в дозе 110 Гр, при мощности дозы 20,0 Гр/мин. Напряжение на трубке 30 кВ, ток 6,1 мА, фильтр Al толщиной 0,1 мм, площадь поля облучения составляла 8,5 см<sup>2</sup>. Трансплантацию клеток СВФ жировой ткани проводили двукратно в дозах 2,2 × 10<sup>6</sup> и 3,0 × 10<sup>6</sup> на 28-е и 35-е сут после облучения, соответственно. Культивированные ММСК вводили в дозах 2,8 × 10<sup>6</sup> и 3,4 × 10<sup>6</sup> на 28-е и 35-е сут после действия радиации. Паракринные факторы кондиционной среды вводили пятикратно с 1-х по 10-е сут после облучения, подкожно по 1,0 мл (общий белок 8 мг/мл). Тяжесть лучевого поражения кожи и эффекты терапии оценивали в динамике по клиническим проявлениям, с помощью планиметрии и патоморфологических методов. **Результаты.** Выбранный режим радиационного воздействия вызывал тяжелые лучевые поражения кожи с длительно (до 5 мес) незаживающими язвами. Площадь лучевых язв у крыс контрольной группы в период с 28-х до 84-х сут медленно уменьшалась от 2,73±0,17 см<sup>2</sup> до 1,52±0,17 см<sup>2</sup>, а через 4 и 5 мес после облучения составляла 0,52±0,15 см<sup>2</sup> и 0,05±0,04 см<sup>2</sup>, соответственно. Во всех опытных группах после 84-х сут отмечалась тенденция к снижению площади лучевых язв, а через 4 мес после облучения уменьшение площади язв и снижение тяжести поражения в опытных группах по сравнению с контролем были статистически значимыми (p < 0,05). У 70-80 % крыс в опытных группах через 4 мес после облучения наблюдалась полная эпителизация радиационных ран с образованием атрофического рубца, а в контрольной группе в этот период атрофические рубцы наблюдались лишь у 40% крыс. **Заключение.** Трансплантация СВФ жировой ткани или культивированных ММСК, а также введение паракринных факторов кондиционной среды способствуют усилению регенераторных процессов в пораженной ткани, и могут быть в равной степени эффективны при терапии тяжелых лучевых поражений кожи в эксперименте.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; стромально-васкулярная фракция; жировая ткань; паракринные факторы; кондиционная среда; рентгеновское излучение; клеточная терапия; лучевые язвы кожи.

**Для цитирования:** Лебедев В.Г., Дешевой Ю.Б., Темнов А.А., Астрелина Т.А., Рогов К.А., Насонова Т.А., Лырщикова А.В., Добрынина О.А., Склифас А.Н., Мхитаров В.А., Трофименко А.В., Мороз Б.Б. Изучение эффектов стромально-васкулярной фракции, культивированных стволовых клеток жировой ткани и паракринных факторов кондиционной среды при терапии тяжелых лучевых поражений кожи у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 24-32.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.24-32

**Для корреспонденции:** Лебедев Владимир Георгиевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: vgleb468@yandex.ru

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

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

**Поступила** 04.12.2018



Lebedev V.G.<sup>1</sup>, Deshevoy Y.B.<sup>1</sup>, Temnov A.A.<sup>1,4</sup>, Astrelina T.A.<sup>1</sup>, Rogov K.A.<sup>2</sup>, Nasonova T.A.<sup>1</sup>, Lirshchikova A.V.<sup>1</sup>, Dobrynina O.A.<sup>1</sup>, Sklifas A.N.<sup>3</sup>, Mkhitarov V.A.<sup>2</sup>, Trofimenko A.V.<sup>4</sup>, Moroz B.B.<sup>1</sup>

## Study of the effects of stromal vascular fraction, cultured adipose-derived stem cells, and paracrine factors of a conditioned medium in the treatment of severe radiation injuries of rat skin

<sup>1</sup>A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, 46, Zhivopisnaya str., Moscow 123182, Russian Federation;

<sup>2</sup>Research Institute of Human Morphology, Russian Academy of Medical Science, Moscow 117418, Russian Federation;

<sup>3</sup>Institute of Cell Biophysics, of the Russian Academy of Sciences, Moscow region, Pushchino 142292, Russian Federation;

<sup>4</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudnyy, 141701, Moscow region, Russian Federation

**Aim.** To study effects of stromal-vascular fraction (SVF) transplantation, cultured multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) of adipose tissue, and administration of paracrine factors of the conditioned MMSC culture medium on the course of severe, local radiation lesions of the skin. **Methods.** Wistar-Kyoto rats were irradiated with X-rays at a dose of 110 Gy and a dose rate of 20.0 Gy/min. The tube voltage was 30 kV, current – 6.1 mA, filter – 0.1 mm thick Al, and irradiation field area – 8.5 cm<sup>2</sup>. Transplantation of adipose tissue SVF cells was performed twice at doses of  $2.2 \times 10^6$  and  $3.0 \times 10^6$  on the 28th and 35th days after irradiation, respectively. Cultured MMSC was administered at doses of  $2.8 \times 10^6$  and  $3.4 \times 10^6$  on the 28th and 35th days after irradiation. Paracrine factors of the conditioned medium were administered five times from the 1st to the 10th day after irradiation at a dose of 1.0 ml, s.c. (total protein, 8 mg/ml). Severity of radiation damage of the skin and effects of the therapy were followed up by clinical manifestations using planar geometry and pathomorphological methods. **Results.** Radiation exposure under the specified conditions caused severe radiation injuries of the skin with nonhealing ulcers that persisted for up to 5 months after irradiation. In control rats the area of radiation ulcers slowly decreased between the 28th and 84th days from  $2.73 \pm 0.17$  cm<sup>2</sup> to  $1.52 \pm 0.17$  cm<sup>2</sup>, respectively, and was  $0.52 \pm 0.15$  cm<sup>2</sup> and  $0.05 \pm 0.04$  cm<sup>2</sup> at 4 and 5 months after irradiation. In all experimental groups, the healing was more intensive after the 84th day with a tendency to decrease the area of radiation ulcers; at 4 months after irradiation, statistically significant decreases in the area of ulcers and severity of lesions were observed in the experimental groups compared to the control ( $p < 0.05$ ). At four months after irradiation, 70–80% of rats in the treatment groups showed complete epithelialization of radiation wounds with formation of an atrophic scar whereas in the control group during the same period, atrophic scars were observed only in 40% of rats. **Conclusion.** Transplantation of adipose-derived SVF or cultured adipose tissue MMSC as well as administration of paracrine factors of the conditioned medium contributed to the enhancement of regenerative processes in the affected tissue and can be equally effective in the treatment of severe experimental radiation lesions of the skin.

**Keywords:** multipotent mesenchymal stromal cells, stromal vascular fraction, adipose tissue, paracrine factors, conditioned medium, X-ray, cellular therapy, radiation skin ulcers.

**For citation:** Lebedev V.G., Deshevoy Yu.B., Temnov A.A., Astrelina T.A., Rogov K.A., Nasonova T.A., Lirshchikova A.V., Dobrynina O.A., Sklifas A.N., Mkhitarov V.A., Trofimenko A.V., Moroz B.B. Study of the effects of the stromal vascular fraction, cultured adipose-derived stem cells and paracrine factors of the conditioned medium in the treatment of severe radiation injuries of skin in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019, 63(1): 24–32. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.24-32

**For correspondence:** Vladimir Lebedev, Candidate of Biology Sciences, Leading Researcher A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123182, Russia Federation, e-mail: vgleb468@yandex.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Lebedev V.G., <http://orcid.org/0000-0002-4622-7329>

Deshevoy Yu.B., <http://orcid.org/0000-0003-2755-5674>

Nasonova T.A., <http://orcid.org/0000-0003-1511-4329>

Moroz B.B., <http://orcid.org/0000-0002-9982-723X>

**Received** 04.12.2018

## Введение

Широкое применение радиотерапии, радиологических процедур и радиоактивных материалов в ядерной медицине, а также использование источников ио-

низирующих излучений в промышленности может сопровождаться увеличением числа случаев локальных радиационных поражений. Тяжелые лучевые поражения кожи характеризуются развитием длительно незаживающих, хронических язв на фоне нарушения тро-

фики облученной ткани, степень деструкции которой имеет прямую зависимость от мощности, дозы и вида излучения [1-3]. Лечение хронических радиационных язв с применением обычных консервативных методов или пересадки кожи является очень сложной задачей. Даже при оптимальных условиях процесс заживления приводит к фиброзу и формированию атрофических рубцов. Кроме того, радиационные язвы часто инфицированы, что может приводить к сепсису [1, 4]. Значимость и высокая распространенность хронических язв при радиационных поражениях обуславливает актуальность разработки эффективных способов лечения.

В последние годы накоплено большое количество экспериментальных и клинических данных, которые показывают, что перспективным способом лечения местных лучевых поражений является применение клеточной терапии с использованием мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), выделенных из костного мозга или жировой ткани [5-9], причем жировая ткань является предпочтительным источником стволовых клеток. Стволовые клетки жировой ткани могут применяться как в виде культивированных ММСК [6, 7], так и в виде стромально-васкулярной фракции (СВФ) [8, 9]. Высокая концентрация ММСК в СВФ позволяет получать необходимое для трансплантации количество стволовых клеток без наработки их в культуре. Трансплантация стволовых клеток жировой ткани способствует значительному ускорению заживления кожных ран [8-10]. Считается, что благоприятный эффект трансплантации ММСК при различных видах патологических процессов связан с трофическим действием продуцируемых ферментов, цитокинов и ростовых факторов, необходимых для регенерации тканей [11, 12]. Установлено, что паракринные факторы, выделяемые стволовыми клетками в процессе культивирования, могут проявлять стимулирующий эффект на регенерацию при лечении химических и термических поражений [13].

Цель – сравнительное изучение эффектов стромально-васкулярной фракции жировой ткани, культивированных ММСК и паракринных факторов кондиционной среды при терапии тяжелых лучевых поражений кожи в эксперименте.

## Методика

Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Исследование было одо-

брено локальным этическим комитетом института. Эксперименты были выполнены на 40 крысах-самцах инбредной линии Wistar-Kyoto массой 250-280 г, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (г. Пущино). Животные содержались в оптимальных для данного вида условиях, на стандартном рационе с свободным доступом к питьевой воде. Условия содержания и процедура эксперимента соответствовали общим правилам работы с использованием экспериментальных животных.

Крыс подвергали локальному воздействию рентгеновского излучения в подвздошно-поясничной области спины на установке ЛНК-268 (РАП 100 – 10) в дозе 110 Гр при мощности дозы 20,0 Гр/мин, напряжении 30 кВ, силе тока 6,1 мА, фильтр 0,1 мм Al, площадь поля облучения на поверхности кожи составляла 8,5 см<sup>2</sup>. Данные условия лучевого воздействия сопровождаются тяжелыми лучевыми поражениями кожи с длительно незаживающими язвами у крыс [14]. После облучения животные были разделены на 4 группы по 10 крыс в каждой:

1-я группа – облученный контроль;

2-я группа – крысы с введением СВФ;

3-я группа – крысы с введением культивированных ММСК;

4-я группа – крысы с введением паракринных факторов кондиционной среды.

Жировую ткань для получения СВФ при каждой трансплантации брали от интактных крыс, которые не использовались в дальнейшем. При заборе биоматериала животных наркотизировали внутрибрюшинным введением препарата «Золетил» (10 мг/кг, Virbac, Франция). Выделение СВФ проводили путем ферментативной обработки размельченной жировой ткани в 0,015 % растворе коллагеназы IA для растворения коллагеновых волокон и освобождения клеток. После центрифугирования и отмычки от фермента получали очищенную СВФ [15, 16]. Клетки СВФ вводили двукратно на 28-е и на 35-е сут после облучения в дозах  $2,2 \times 10^6$  и  $3,0 \times 10^6$ , соответственно.

Для изучения влияния культивированных ММСК жировой ткани использовали клетки второго пассажа, полученные от интактных крыс и наработанные *in vitro* [16]. Культивированные ММСК вводили двукратно в дозе  $2,8 \times 10^6$  и  $3,4 \times 10^6$  на 28-е и 35-е сут после действия радиации, соответственно. Подсчет и оценку жизнеспособности клеток проводили на автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen, США). Содержание живых клеток перед трансплантацией во всех экспериментах составляло 87-95%. Суспензию клеток СВФ или культивированных ММСК в 1 мл стерильного раствора Хенкса вводили под кожу в 5 точек

(по 0,2 мл на точку), вокруг лучевой язвы, отступив 5 мм от края. Паракринные факторы кондиционной среды культивированных ММСК получали по методу [17] и вводили подкожно в объеме 1,0 мл (общий белок 8 мг/мл) в 5 точек вокруг лучевой язвы на 1-е, 3-е, 6-е, 8-е и 10-е сут после облучения. Сроки введения клеток и паракринных факторов определены на основании ранее проведенных экспериментов. После облучения крыс проводили наблюдение за процессом развития местного лучевого поражения и эффективностью терапии. Течение лучевого поражения кожи оценивали в динамике по клиническим проявлениям, с использованием балльной шкалы оценок [18] и с помощью планиметрии. Планиметрию проводили ежедневно, начиная с 8-х сут после облучения. У каждой крысы в фиксированные отрезки времени измеряли площадь лучевого поражения. Для этого проводили фотосъемку цифровой камерой Canon с последующей обработкой изображений и определением площади язвенной поверхности с помощью программы AutoCad 14. Анализировали динамику изменения площади радиационных ран и тяжести поражения у животных опытных групп по сравнению с облученным контролем.

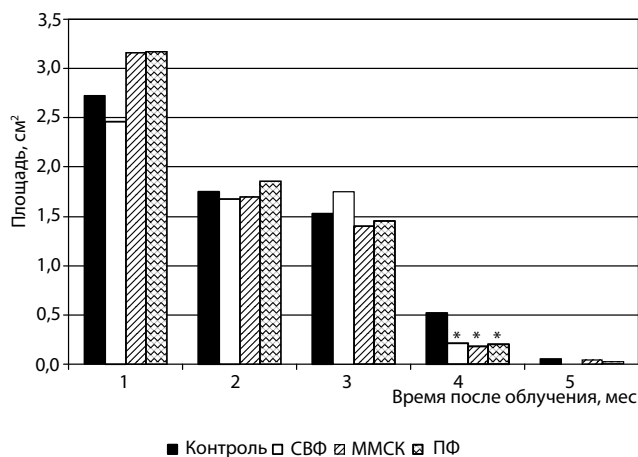
Животных выводили из эксперимента через 5 мес после облучения. Пораженный участок кожи по площади и глубине вырезался с захватом здоровых тканей. Материал фиксировали в 10% забуференном формалине и заливали в парафин. Срезы, толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрическое исследование включало подсчет клеток воспалительного инфильтрата, и среди них – фибробластов и фиброцитов, и рассчитывали отношение фибробластов к общему числу клеток. При анализе проводилась сравнительная количественная оценка клеточного состава созревающей грануляционной ткани в центре и на периферии дна рубцующихся язв.

Количественную обработку данных проводили с помощью программы Image Tool for Windows, v. 3.0 («UTHSCSA», США). После проверки выборки на нормальность распределения вычисляли среднюю арифметическую величину и стандартное отклонение средней арифметической. Проверку статистической значимости различий осуществляли по критерию Стьюдента (t). Математическую обработку количественных данных гистологических препаратов проводили с использованием непараметрической статистики с вычислением медианы и межпроцентильного размаха. Сравнение групп проводили при помощи метода множественных сравнений Krusal-Wallis (пакет статистических программ Statistica-8. «StatSoft»).

## Результаты и обсуждение

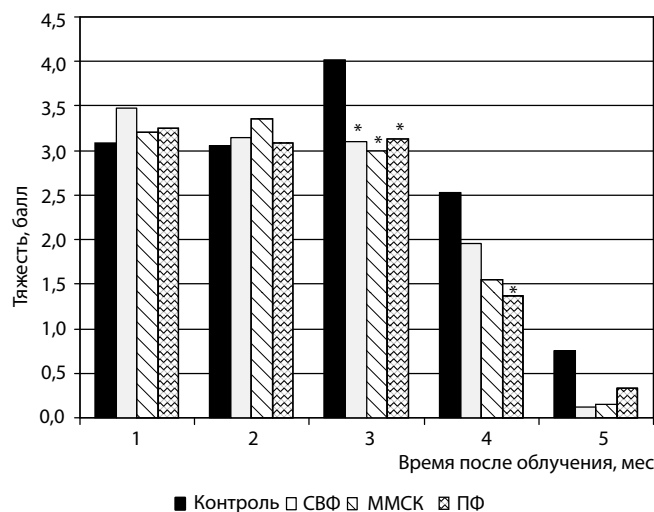
В начальный период после воздействия рентгеновского излучения в дозе 110 Гр при указанных в методах параметрах клиническая картина поражения кожи у всех животных была сходна. Так, на 8–11-е сут после локального облучения отмечались проявления сухого дерматита, а к 14–16 сут начиналась экссудация, и сухой дерматит переходил во влажный. Во всех экспериментальных группах к 21–28-м сут на коже крыс образовывались глубокие лучевые язвы, покрытые плотным струпом темно-коричневого цвета. Далее в контрольной группе животных наблюдалось очень медленное заживление с неравномерным у разных особей течением патологического процесса. Площадь лучевых язв у крыс контрольной группы в период с 28-х до 84-х сут после облучения снижалась в пределах от  $2,73 \pm 0,17 \text{ см}^2$  до  $1,52 \pm 0,17 \text{ см}^2$ , соответственно (рис. 1). У некоторых животных контрольной группы язвы сохранялись более 5 мес после облучения, и средняя площадь радиационных ран через 4 и 5 мес после облучения составляла  $0,52 \pm 0,15 \text{ см}^2$  и  $0,05 \pm 0,04 \text{ см}^2$ , соответственно.

Динамика изменений площади лучевых язв у крыс в опытных группах, как при трансплантации СВФ или ММСК, так и с введением паракринных факторов, до 3-х мес после облучения значимо не отличалась от показателей у облученных контрольных животных. Затем у крыс опытных групп происходило более интенсивное заживление и наблюдалась тенденция к сни-



**Рис. 1.** Изменения площади лучевых язв после облучения в дозе 110 Гр у крыс контрольной и опытных групп с трансплантацией СВФ, культивированных ММСК и введением паракринных факторов.

По оси ординат – площадь поражения, см<sup>2</sup>; по оси абсцисс – время после облучения (мес); \* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 2.** Тяжесть течения патологического процесса после облучения в дозе 110 Гр у крыс контрольной и опытных групп с трансплантацией СВФ, культивированных ММСК и введением паракринных факторов. По оси ординат – тяжесть поражения, баллы; по оси абсцисс – время после облучения (мес); \* – показатели статистически значимо отличающиеся от контроля ( $p < 0,05$ ).

жению площади лучевых язв, а через 4 мес после облучения уменьшение площади лучевых язв у крыс в опытных группах по сравнению с контролем достигло статистически значимого уровня ( $p < 0,05$ ). На 140-е сут после облучения средняя площадь ран в группах с трансплантацией клеток СВФ, культивированных ММСК или введением паракринных факторов составляла  $0,004 \pm 0,002 \text{ см}^2$ ,  $0,004 \pm 0,003 \text{ см}^2$  и  $0,02 \pm 0,02 \text{ см}^2$ , по сравнению с  $0,05 \pm 0,04 \text{ см}^2$  в облученном контроле, соответственно.

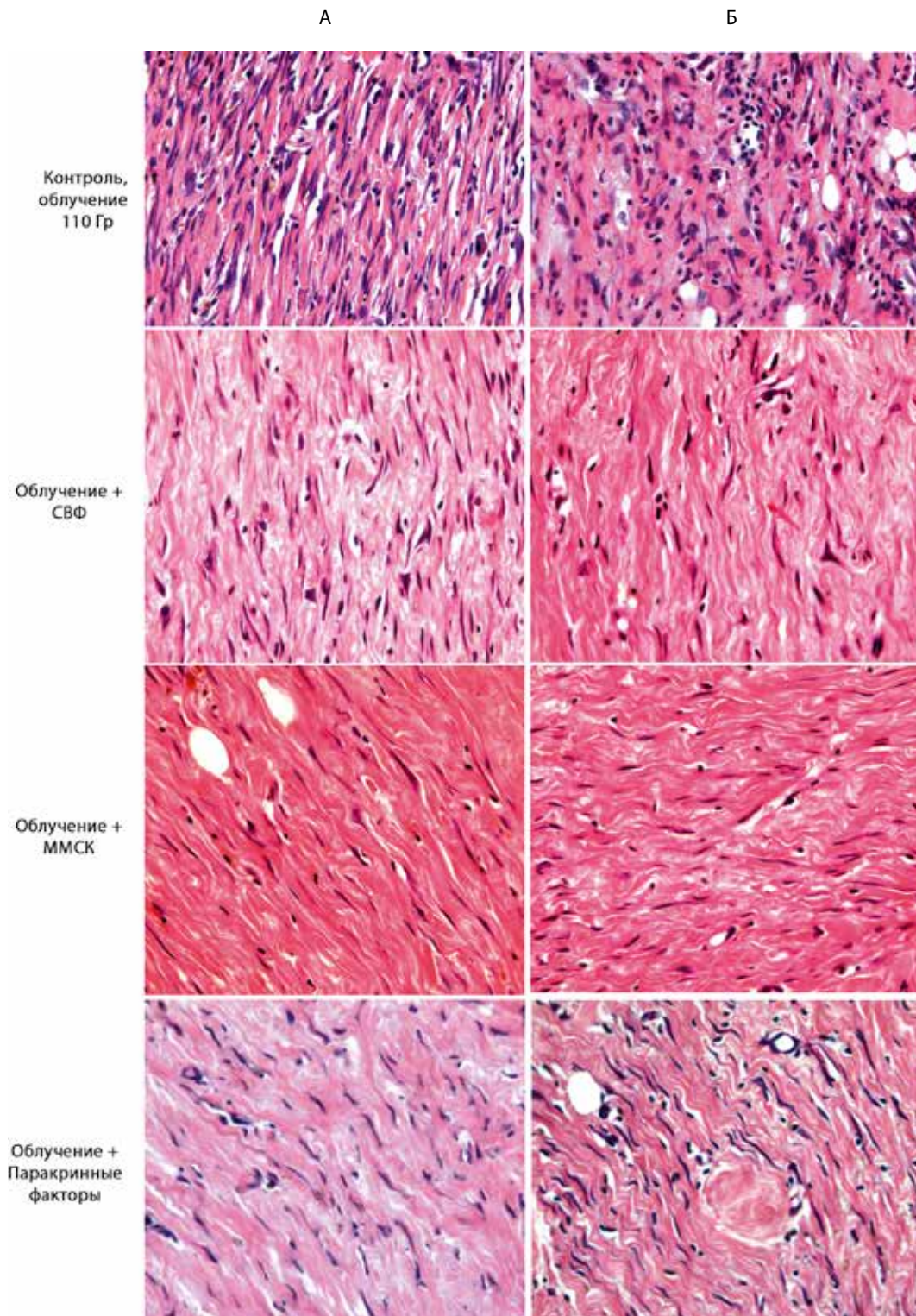
По динамике тяжести клинических проявлений лучевого поражения, выраженной в баллах, животные опытных групп отличались от контрольной группы более легким течением (рис. 2). Начиная с 84-х сут после облучения, различия тяжести поражения в контрольной и опытной группах были статистически значимыми ( $p < 0,05$ ). Визуально струпы у крыс в опытных группах были более тонкими и поверхностными, чем в контрольной группе. Через 4 мес после облучения у 70–80 % крыс в опытных группах наблюдалась полная эпителизация ран с образованием атрофического рубца, а в контрольной группе в этот период атрофические рубцы наблюдались лишь 40% крыс.

Для оценки состояния пораженной кожи по истечении 5 мес после облучения и видимого заживления лучевых язв проводили гистологические исследования (рис. 3). Во всех группах крыс отмечена полная эпителизация поврежденной кожи. Новообразованный эпидермис характеризовался многорядностью и содержал роговой слой. Подлежащая рубцующаяся ткань была неравномерной толщины, с участками гиалиноза. Наиболее широкий рубцовый слой отмечался у животных контрольной группы. В поверхностных участках выявлены сосуды с утолщенными стенками. Придатки кожи в области заживших язв отсутствовали во всех группах животных. В подкожной мышце выявлялись деформирующие рубцовые изменения с умеренной диффузной круглоклеточной инфильтрацией. Из-за разрастания фиброзной ткани в глубоких отделах язвенных дефектов, жировой клетчатке количество липоцитов было снижено, наиболее отчетливо грубые склеротические изменения выявлены у животных контрольной группы.

Таблица

**Количественная оценка клеточных популяций в участке пораженной кожи у животных различных групп через 5 мес после облучения**

Группы	Показатели	Ме (25;75 процентиля)
Контроль, облучение 110 Гр	Все клетки воспалительного инфильтрата	238,5 (177; 375)
	Фибробласты, фиброциты	127,5 (102,5; 171,5)
	Отношение фибробласты, фиброциты / все клетки	0,53 (0,43; 0,59)
Облучение + СВФ	Все клетки воспалительного инфильтрата	167,5 (139,5; 193)
	Фибробласты, фиброциты	123 (102,5; 154)
	Отношение фибробласты, фиброциты / все клетки	0,79 (0,7; 0,85)
Облучение + ММСК	Все клетки воспалительного инфильтрата	185 (148,5; 199,5)
	Фибробласты, фиброциты	151 (111; 177,5)
	Отношение фибробласты, фиброциты / все клетки	0,88 (0,83; 0,93)
Облучение + Паракринные факторы	Клетки воспалительного инфильтрата	177 (134,5; 247,5)
	Фибробласты, фиброциты	130 (97; 187,5)
	Отношение фибробласты, фиброциты / все клетки	0,74 (0,71; 0,8)



**Рис. 3.** Микропрепараты периферической (А) и центральной зоны (Б) радиационного повреждения кожи у крыс из контрольной и опытных групп - с трансплантацией СВФ, культивированных ММСК и введением паракринных факторов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 40$ .

Количественные морфометрические исследования показали, что в соединительной ткани дермы у леченых животных выявлено снижение численности иммунокомпетентных клеток и относительное увеличение содержания фибробластов и фиброцитов (таблица). Эти данные, свидетельствуют о снижении воспалительной реакции и ускорении созревания грануляционной ткани в коже леченых животных, что создает благоприятные условия для завершения регенераторных процессов.

В настоящее время возможности применения ММСК жировой ткани для стимулирования заживления ран и регенерации тканей были продемонстрированы на различных экспериментальных моделях [4-9]. Вместе с тем, окончательно не выбран оптимальный источник стволовых клеток для эффективной терапии тяжелых местных лучевых поражений. В эксперименте и клинике применялись как культивированные ММСК, так и СВФ жировой ткани, причем наличие гетерогенного клеточного состава СВФ может приводить к лучшим терапевтическим результатам, которые наблюдались в сравнительных исследованиях на животных [19-21]. Преимуществом применения СВФ по сравнению с использованием культивированных ММСК является то, что, обладая противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами, влиянием на ангиогенез, эти клетки могут быть получены без проведения дополнительной обработки и создания специальных условий культивирования. Роль ММСК в заживлении кожных ран, по-видимому, связана с их противовоспалительными свойствами, которые опосредуются высвобождением растворимых паракринных факторов.

Проведенное исследование показывает, что у животных, подвергнутых очень высоким дозам облучения (110 Гр), введение паракринных факторов кондиционной среды может оказывать стимулирующее влияние на заживление лучевых язв, сопоставимое с эффектами трансплантации стволовых клеток жировой ткани. Возможно, что все 3 терапевтических воздействия (введение после облучения СВФ, ММСК или паракринных факторов) осуществляются через механизмы, связанные с усилением регенерационных процессов в связи с освобождением ткани от поврежденных структур, причем выраженность регенерации может иметь свои пределы, что и проявляется в сходстве эффектов на течение лучевых поражений.

Полученные данные позволяют предполагать, что применение препарата, содержащего паракринные факторы кондиционной среды, при комбинированном лечении тяжелых местных радиационных поражений кожи может уменьшить степень воспалительной реакции, и создать благоприятные условия для проведения

клеточной терапии с использованием мезенхимальных стволовых клеток.

Таким образом, трансплантация СВФ и культивированных ММСК жировой ткани, а также введение паракринных факторов кондиционной среды могут в равной степени стимулировать восстановление кожи при тяжелых местных лучевых поражениях, и способствуют более раннему заживлению хронических лучевых язв.

### Литература

1. *Радиационная медицина. Руководство для врачей-исследователей и организаторов здравоохранения.* Под ред. Л.А. Ильина. М.; ИздАТ. 2001; Т. 2.
2. Бушманов А.Ю., Надежина Н.М., Нугис В.Ю., Галстян И.А. Местные лучевые поражения кожи человека: возможности биологической индикации дозы (аналитический обзор). *Мед. радиол. и радиац. безопасность.* 2005; 50(1): 37–47.
3. Африканова Л.А. *Острая лучевая травма кожи.* М.; Медицина, 1975.
4. Marfia G, Navone SE, Di Vito C, et al. Mesenchymal stem cells: potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds. *Organogenesis.* 2015; 11(4): 183–206. Published online 2015 Dec 10. DOI: 10.1080/15476278. 2015.1126018.
5. Francois S, Mouiseddine M, Mathieu N, et al. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Annals of Hematology.* 2007; 86(1): 1–8.
6. Huang S-P, Huang C-H, Shyu J-F, et al. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. *J. Biomed. Sci.* 2013; 20(1): 51–60.
7. Forcheron F, Agay D, Scherthan H, et al. Autologous adipose-derived stem cells favour healing in minipig model treatment of cutaneous radiation syndrome. *PLOS One.* February 2012; 7(2). e 31694. DOI: 10.1371/journal.pone.0031694.
8. Akita S, Akino K, Hirano A, et al. Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury. *Stem cells int.* 2010 Dec1; 2010:532704. DOI:10.4061/2010/532704.
9. Лебедев В.Г., Насонова Т.А., Дешевой Ю.Б. и др. Влияние трансплантации сингенных клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани на течение тяжелых местных лучевых поражений у крыс после действия рентгеновского излучения. *Рад. биол. Радиоэкология.* 2017; 57(3): 264–71.
10. Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 2007; 48(1): 15–24.
11. Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, et al. Cell therapy based on a adipose-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009; 29(4): 503–10.
12. Feisst V, Meidinger S and Locke MB. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning.* 2015; 8: 149–62.
13. Темнов А.А., Волкова А.Г., Мелерзанов А.В. и др. Эффект кондиционированной среды, полученной из культивированных мезенхимальных стволовых клеток, на регенерацию эндотелия при HCl-индуцированном повреждении трахеи у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 28–36.
14. Котенко К.В., Мороз Б.Б., Насонова Т.А. и др. Экспериментальная модель тяжелых местных лучевых поражений кожи по-

- сле действия рентгеновского излучения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 57(4): 121–3.
15. Zuk P, Zhu M, Muzuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue implication for cell-based therapeutics. *Tissue Eng*. 2001 Apr; 7(2): 211–28. DOI: 10.1089/107632701300062859.
  16. Bunnell BA, Flaata M, Gagliardi Ch. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008 Jun; 45(2): 115–20. DOI: 10.1016/j.ymeth.2008.03.006.
  17. Темнов А.А., Астрелина Т.А., Рогов К.А. и др. Исследование влияния факторов кондиционной среды, полученной при культивировании мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, на течение тяжелых местных лучевых поражений кожи у крыс. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2018; 63(1): 35–9.
  18. Осанов Д.П. *Дозиметрия и радиационная биофизика кожи*. М.; Энергоатомиздат, 1983.
  19. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, et al. Stromal vascular fraction: a regenerative reality? Part 1: current concepts and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2016; 69: 170–9. doi: 10.1016/j.bjps.2015.10.015.
  20. Gimble J.M., Guilak F., Bunnell B. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2010 Jun 29; 1(2): 19. doi: 10.1186/scrt19.
  21. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and cultured expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for adipose therapeutics and the International Society for cellular therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013; V. 15: 641–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>.
  8. Akita S, Akino K, Hirano A, et al. Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury. *Stem cells int*. 2010 Dec 1; 2010:532704. DOI:10.4061/2010/532704.
  9. Lebedev VG, Nasonova TA, Deshevoy YuB. et al. Transplantation of autologous cells of the stromal-vascular fraction of adipose tissue in severe local radiation injuries caused by X-ray radiation. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2017; 62(1): 5–11. (in Russian. English abstracts. PubMed).
  10. Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci*. 2007; 48(1): 15–24.
  11. Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, et al. Cell therapy based on a adipose-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2009; 29(4): 503–10.
  12. Feisst V, Meidinger S and Locke MB. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning*. 2015; 8: 149–62.
  13. Temnov AA, Volkova AG, Melerzanov AV, et al. Effect of conditioned medium from mesenchymal stem cells on regeneration of endothelium at HCl-induced damage trachea in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya*. 2017; 61(2): 28–36. (in Russian).
  14. Kotenko KV, Moroz BB, Nasonova TA, et al. Experimental model of severe local radiation damage of the skin after the action of X-ray radiation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya*. 2013; 57(4): 121–3. (in Russian).
  15. Zuk P, Zhu M, Muzuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue implication for cell-based therapeutics. *Tissue Eng*. 2001 Apr; 7(2): 211–28. DOI: 10.1089/107632701300062859.
  16. Bunnell BA, Flaata M, Gagliardi Ch. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008 Jun; 45(2): 115–20. DOI: 10.1016/j.ymeth.2008.03.006.
  17. Temnov AA, Astrelina TA, Rogov KA, Lebedev VG, Nasonova TA, Lyrschikova AV, et al. Investigation of the Influence of the Conditioning Medium Factors Obtained During the Cultivation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on the Course of Severe Local Radiation Injuries of Skin in Rats. *Meditsinskaya radiologiya i Radiatsionnaya bezopasnost*. 2018; 63(1): 35–9. (in Russian). DOI: 10.12737/article\_5a82eb9a9bbac1.67972336.
  18. Osanov DP. *Dosimetry and radiation biophysics of the skin [Dozimetriya i radiatsionnaya biofizika kozhi]*. Moscow; Energoatomizdat. 1983. (in Russian)
  19. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, et al. Stromal vascular fraction: a regenerative reality? Part 1: current concepts and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2016; 69: 170–9. doi: 10.1016/j.bjps.2015.10.015.
  20. Gimble J.M., Guilak F., Bunnell B. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2010 Jun 29; 1(2): 19. doi: 10.1186/scrt19.
  21. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and cultured expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for adipose therapeutics and the International Society for cellular therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013; V. 15: 641–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>.

## References

1. *Radiation Medicine. A guide for medical researchers and health care organizers*. Ed. L.A. Ilyin. Moscow; Izdat. 2001; Vol. 2. 432 pp. (in Russian. English abstracts. PubMed).
2. Bushmanov AYu, Nadezhina NM, Nugis VYu, Galstyan IA. Local radiation damage to human skin: the possibility of a biological dose indication (analytical review). *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2005; 50(1): 37–47. (in Russian. English abstracts. PubMed).
3. Afrikanova LA. *Acute radiation injury to the skin [Ostraya luchevaya travma kozhi]*. Moscow; Meditsina, 1975. (in Russian).
4. Marfia G, Navone SE, Di Vito C, et al. Mesenchymal stem cells: potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds. *Organogenesis*. 2015; 11(4): 183–206. Published online 2015 Dec 10. DOI: 10.1080/15476278.2015.1126018.
5. Francois S, Mouseddine M, Mathieu N, et al. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Annals of Hematology*. 2007; 86(1): 1–8.
6. Huang S-P, Huang C-H, Shyu J-F, et al. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. *J. Biomed. Sci*. 2013; 20(1): 51–60.
7. Forcheron F, Agay D, Scherthan H, et al. Autologous adipose-derived stem cells favour healing in minipig model treatment of cutaneous radiation syndrome. *PLOS One*. February 2012; 7(2). e 31694. DOI: 10.1371/journal.pone.0031694.

**Сведения об авторах:**

*Лебедев Владимир Георгиевич*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России;

*Дешевой Юрий Борисович*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

*Темнов Андрей Александрович*, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт»;

*Астрелина Татьяна Алексеевна*, доктор мед. наук, руководитель центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России;

*Рогов Константин Аркадьевич*, доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. ФГБНУ морфологии человека;

*Насонова Тамара Алексеевна*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России;

*Лырицкова Алла Васильевна*, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России;

*Добрынина Ольга Александровна*, науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России;

*Склифас Алла Николаевна*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГУН «Институт биофизики клетки РАН»;

*Мхитаров Владимир Аршакович*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ морфологии человека»;

*Трофименко Александр Викторович*, канд. мед. наук, зав. лаб. ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт»;

*Мороз Борис Борисович*, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, зав. лаб. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.



© Коллектив авторов, 2019

УДК 612.822: 615.03

Анохин П.К.<sup>1</sup>, Веретинская А.Г.<sup>1</sup>, Давыдова Т.В.<sup>2</sup>, Шамакина И.Ю.<sup>1</sup>

## Агонисты дофаминовых D2 рецепторов в фармакотерапии экспериментального алкоголизма

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, 119002, г. Москва, М. Могильцевский пер., д. 3;<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

**Введение.** Стратегия активации дофаминовых D2 рецепторов их агонистами успешно используется в терапии таких дофамин-дефицитных состояний как болезнь Паркинсона и гиперпролактинемия. Дисфункция мезолимбической дофаминовой системы при алкогольной зависимости связана со снижением плотности D2 рецепторов в стриатуме, что делает их крайне интересными в качестве фармакологических мишеней новых лекарственных средств лечения алкоголизма. **Цель исследования** - проверка гипотезы о возможности применения агонистов D2 рецепторов для коррекции дисфункции дофаминовой мезолимбической системы и снижения потребления алкоголя у животных с экспериментальной алкогольной зависимостью. **Методы.** Эффект эрголинового агониста D2-рецепторов каберголина на добровольное потребление алкоголя изучали в экспериментальной модели «свободный выбор» у крыс-самцов Wistar. Содержание дофамина (DA) в среднем мозге и стриатуме определяли методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Относительный уровень мРНК тирозин-гидроксилазы (TH); дофамин-транспортного белка (DAT); моноаминоксидазы А (MAO А); синаптических белков SNAP25 и синаптобревина (VAMP2) изучали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). **Результаты.** При системном введении каберголина в дозе 0,5 мг/кг с интервалом 48 ч максимальный эффект препарата – снижение уровня потребления алкоголя – наблюдался в течение первых суток после инъекции. После однократного введения каберголина отмечалось восстановление сниженного содержания дофамина в стриатуме крыс с высоким уровнем потребления алкоголя, не связанное с увеличением экспрессии мРНК TH, MAO А или DAT. В то же время введение каберголина приводило к повышению экспрессии мРНК синаптических белков SNAP25 и VAMP2, играющих важную роль в регуляции везикулярного пула дофамина в мезолимбической системе. **Заключение.** Полученные данные позволяют предположить, что стратегия активации дофаминовых D2-рецепторов их агонистами может быть эффективной для снижения потребления алкоголя, однако решение о целесообразности использования препаратов этой группы в терапии алкогольной зависимости требует дальнейшего изучения нейробиохимических механизмов их действия и безопасности.

**Ключевые слова:** алкоголь; дофамин; D2-рецептор; каберголин; стриатум; средний мозг; экспрессия мРНК; ПЦР.

**Для цитирования:** Анохин П.К., Веретинская А.Г., Давыдова Т.В., Шамакина И.Ю. Агонисты дофаминовых D2-рецепторов в фармакотерапии экспериментального алкоголизма. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 33-39.

**DOI: 10.25557/0031-2991.2019.1.33-39**

**Для корреспонденции:** Анохин Петр Константинович, e-mail: petranokhin@mail.ru

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (РНФ) (проект № 17-75-10190).

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

**Поступила** 15.12.2018

Anokhin P.K.<sup>1</sup>, Veretinskaya A.G.<sup>1</sup>, Davidova T.V.<sup>2</sup>, Shamakina I.Yu.<sup>1</sup>

### Dopamine D2 agonists in the treatment of experimental alcoholism

<sup>1</sup>V.P.Serbosky National Medical Research Center of Psychiatry and Addiction, Malyy Mogiltsevsky Pereulok 3, 119002, Moscow, Russia;<sup>2</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str., 8, 125315, Moscow, Russia

**Introduction.** The strategy of dopamine D2 receptor activation has been successfully used in the therapy of dopamine-deficient states such as Parkinson's disease and hyperprolactinemia. Mesolimbic dopamine «hypofunction» in alcohol addicts is closely associated with the reduction in striatal D2 receptor density making it an attractive pharmacological target for alcohol abuse therapy. **The aim of this study** was to test the hypothesis that D2 receptor agonists can be applied to correct dopamine mesolimbic dysfunction and reduce alcohol consumption in animals with experimental alcohol dependence. **Methods.** The effect of selective ergoline D2 agonist cabergoline on voluntary alcohol consumption was studied using “free choice” model in male Wistar rats. The dopamine (DA) content in the mid-brain and striatum was determined by HPLC with electrochemical detection. The relative mRNA level of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine transporter (DAT), monoamine oxidase A (MAO A), synaptic proteins SNAP25 and synaptobrevin (VAMP2) were studied by real-time polymerase chain reaction after reverse transcription (RT-PCR). **Results.** Systemic administration of cabergoline (0.5 mg/kg, every

48 hours) produced a decrease in alcohol consumption with the maximum effect observed during the first 24 h after injection. Acute injection of cabergoline restored a reduced DA level in the striatum of rats with high level of alcohol consumption, but this effect was not associated with an increase in the expression of TH, MAO A or DAT mRNA. At the same time, cabergoline increased mRNA expression of synaptic proteins SNAP25 and VAMP2, which play an important role in the regulation of the mesolimbic dopamine reserve vesicular pool. **Conclusion.** Our findings suggest that the strategy of dopamine D2 receptor activation may be effective in correction dopamine «hypofunction» and reducing alcohol consumption, however, to determine the feasibility of using D2 agonists in the treatment of alcohol abuse further study of their effectiveness, safety and neurochemical mechanisms of action are required.

**Keywords:** alcohol; dopamine; D2 receptor; cabergoline; striatum; midbrain; mRNA expression; PCR.

**For citation:** Anokhin P.K., Veretinskaya A.G., Davidova T.V., Shamakina I.Yu. Dopamine D2 agonists in the treatment of experimental alcoholism. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1): 33-39. (In Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.1.33-39

**For correspondence:** Anokhin Petr Konstantinovich, e-mail: petranokhin@mail.ru

**Financing.** This work is supported by the Russian Science Foundation (RScF) under grant № 17-75-10190.

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

**Received** 15.12.2018

## Введение

Алкогольная зависимость, приводящая к потере трудоспособности, инвалидизации, ранней смертности, представляет важную нерешенную медицинскую и социальную проблему. В связи со слабой эффективностью существующих средств, влияющих на алкогольную мотивацию [1, 2], актуален поиск новых фармакологических мишеней патогенетической терапии алкогольной зависимости. Изучение инбредных линий животных показало, что у предпочитающих алкоголь крыс плотность дофаминовых D2 рецепторов в мезолимбических областях мозга меньше по сравнению с отвергающими алкоголь животными [3]. Экспериментальные данные о корреляции между пониженным количеством D2 рецепторов и высоким уровнем потребления этанола нашли подтверждение в клинических исследованиях с использованием позитронно-эмиссионной томографии [4].

Гипотеза о возможности использования агонистов дофаминовых D2 рецепторов в терапии алкогольной зависимости была высказана в 80-х годах прошлого века [5, 6], когда было показано ослабление симптомов синдрома отмены, алкогольной мотивации и выраженности расстройств эмоциональной сферы у больных алкоголизмом [5, 6] и у алкоголизованных животных [7] на фоне применения эрголинового агониста дофаминовых рецепторов бромокриптина. Вместе с тем, бромокриптин имеет ряд свойств, ограничивающих возможность его применения. Прежде всего, это низкая биодоступность и короткое время полувыведения. Другой препарат этой группы каберголин обладает важной для клинического применения особенностью - длительным периодом полувыведения, что обеспечивает продолжительную равномерную физиологическую стиму-

ляцию рецепторов. Как было показано, каберголин обладает наиболее высокой аффинностью к D2 рецепторам ( $K_i = 0.61$  nM) по сравнению с другими представителями этой группы агонистов [8]. Благодаря своим фармакокинетическим и фармакодинамическим свойствам каберголин занял в свое время одну из первых позиций среди препаратов в терапии гиперпролактинемии и болезни Паркинсона [9]. Экспериментальные исследования последних лет показали, что каберголин при системном введении эффективно снижает потребление алкоголя у хронически алкоголизованных животных [10-12]. Было установлено, что однократное введение каберголина крысам с высоким уровнем потребления алкоголя приводит к статистически значимому падению показателей предпочтения алкоголя [11, 12]. Кроме того, обнаружение антидепрессивных и анксиолитических свойств каберголина в классических тестах на тревожность у грызунов [11, 13, 14] привлекло к нему внимание как к потенциальному средству коррекции аффективных расстройств, коморбидных с болезнями зависимости. Вместе с тем, целый ряд вопросов, касающихся эффективности и безопасности применения каберголина и других агонистов дофаминовых D2 рецепторов при лечении алкогольной зависимости, остается открытым. В частности, до сих пор неизвестно, какие механизмы лежат в основе эффекта снижения потребления алкоголя, является ли этот эффект стойким и длительным.

**Цель исследования** – экспериментальная оценка эффекта каберголина на потребление алкоголя; анализ влияния острого введения каберголина на содержание дофамина (DA) и экспрессию генов, кодирующих белки дофаминовой нейротрансмиссии в среднем мозге и стриатуме хронически алкоголизованных крыс.

## Методика

Эксперименты проводились на крысах – самцах Wistar (питомник лабораторных животных «Столбовая») в соответствии с требованиями этического комитета ФГБУ «ФМИЦ ПН им.В.П. Сербского» МЗ РФ. Животных содержали в условиях естественной освещенности при температуре  $22 \pm 2$  °C и свободном доступе к пище и воде. В качестве пищевого рациона на всех этапах работы использовался гранулированный корм, произведенный в соответствии с нормативными документами (ГОСТ Р 50258-92). После периода адаптации к условиям вивария крысы на протяжении 3 мес (с 60-го по 150 сут жизни) находились в индивидуальных клетках (460x300x160мм) в условиях «свободного выбора» между двумя поилками, содержащими 10% раствор этанола или воду. Потребление этанола и воды измеряли ежедневно путем взвешивания поилок и расчета уровня потребления в граммах на килограмм (г/кг) массы животного. На основании полученных результатов были отобраны животные с высоким (более 6 г/кг/сут, n=24) и низким (менее 1 г/кг/сут, n=7) уровнем потребления алкоголя.

В работе использовали каберголин (Tocris bioscience). Препарат растворяли в смеси дистиллированной воды и этанола (3,3%) в соответствии с рекомендациями производителя и вводили внутривентриально в дозе 0,5 мг/кг. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя.

Содержание дофамина определяли в среднем мозге и стриатуме методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией [15]. После гомогенизации в 0.1 М HClO<sub>4</sub>, образцы центрифугировали при 4 °C и 10000 g (Eppendorf 580R), полученный супернатант фильтровали и фильтрат наносили на хроматографическую колонку Spherisorb ODS-2 (Waters, США). Элюцию анализируемых растворов осуществляли в натрий-фосфатной буферной системе при pH=5,2 и U=0,65 v, со скоростью 1.6 мл/мин с помощью насоса высокого давления Gilson 302 (Gilson Inc., США). Содержание дофамина определяли с помощью электрохимического детектора (BAS LC-4b CC-4, США), рассчитывали относительно стандартов и выражали в нг на г ткани. Относительный уровень мРНК анализировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) на амплификаторе Multicolor Real-Time PCR Detection System iQ7W5 (BioRad, Германия). В качестве референсного был выбран ген β-актина. При проведении ПЦР использовались последовательности олигонуклеотидных праймеров (ТН-F: 5'-tcggaagctgattgcagaga-3'; ТН-R: 5'-ttccgctgtattcccatg-3'; DAT-F: 5'-aatgctcc-

gtgggaccaatg-3'; DAT-R: 5'-caataaccatgaagagcagg-3'; MAOA-F: 5'-atggatgaaatgggaaaagagat-3'; MAOA-R: 5'-taattggtttctctcaggtgga-3'; SNAP25-F: 5'-tcatcccaggg-taacaac-3'; SNAP25-R: 5'-ctggcgattctgggtgca-3'; VAMP2-F: 5'-cagggcctcccagttgaa-3'; VAMP2-R: 5'-ggc-gcaatcactcccaaga-3'; β-актин-F: 5'-cactgccg-catcctcttct-3'; β-актин-R: 5'-aaccgctcattgccgatagtg-3') (ДНК-синтез, Россия). Амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 25 нг кДНК, праймеры (0,4 мкМ) и 5 мкл 5x реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) согласно протоколу: 95 °C – 3 мин; 50 циклов: 95 °C, 15 с, 60 °C, 15 с, 72 °C, 30 с с последующим анализом кривых плавления полученных ПЦР-продуктов. Расчет относительной экспрессии проводили на основании оценки величин Ct (threshold cycle) методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [16].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета Statistica 6 («Statsoft», США). Для проверки нормальности распределения количественных данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Результаты представлены в виде значений среднего ± ошибка среднего. Для проверки статистической значимости различий в потреблении этанола был использован двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) для повторных измерений с последующим post hoc анализом (критерий Tukey HSD). Для оценки межгрупповых различий уровня мРНК использовали two-way ANOVA с последующим post hoc анализом (критерий Fisher LSD). Значимыми считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

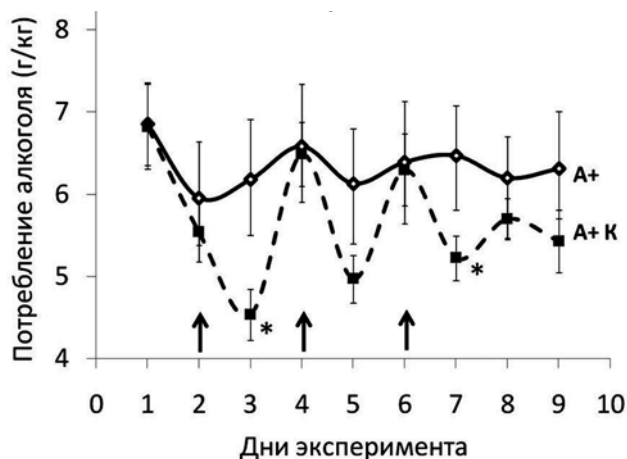
По результатам тестирования с 60-х по 150- дни жизни в модели «свободный выбор» были отобраны животные с высоким уровнем среднесуточного потребления алкоголя, составившим в последнюю неделю тестирования  $7,0 \pm 0,3$  г/кг. Для исследования эффектов каберголина были сформированы 4 подгруппы животных, среднесуточные показатели потребления этанола в которых существенно не различались и составляли  $6,8 \pm 0,7$  г/кг (n=10),  $6,9 \pm 0,6$  г/кг (n=10),  $7,0 \pm 0,51$  г/кг (n=7),  $7,1 \pm 0,4$  г/кг (n=7). В дальнейшем животные первых двух групп в течение 7-сут получали инъекции: А+ – «плацебо» (растворителя), А+К – каберголина (0,5 мг/кг, в/б) с интервалом 48 ч. Показано, что в группе А+К уровень потребления алкоголя снижался в 1-е сут после введения каберголина, но возвращался к исходному уровню на 2-е сут после инъекции (рис. 1). Two-way ANOVA для повторных измерений показал, что потребление алкоголя в группе животных, получавших каберголин, было ниже, чем в контроль-

ной группе на 3-и ( $p=0,029$ ), 5-е ( $p=0,065$ ) и 7-е ( $p=0,045$ ) сут эксперимента. Важно, что общий объем потребляемой жидкости и показатели массы тела крыс значимо не различались между исследуемыми группами. Ранее было показано, что при однократном введении каберголина наблюдается стойкое падение потре-

бления этанола [10]. Таким образом, для достижения стойкого эффекта каберголина на потребление алкоголя требуется поддержание постоянной концентрации препарата в крови.

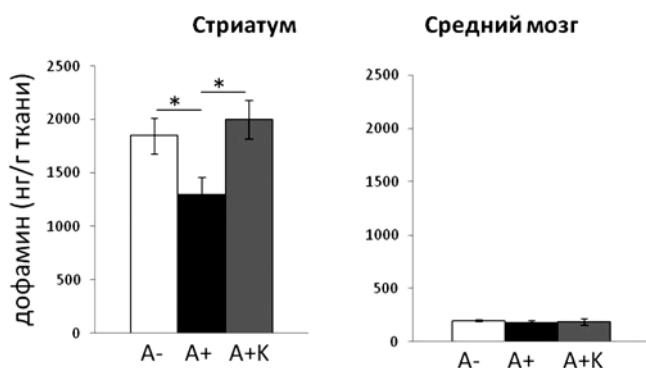
Для выяснения возможных механизмов влияния остро го введения каберголина на потребление алкоголя мы изучали содержание дофамина в среднем мозге и стриатуме, а также экспрессию мРНК TH, DAT, MAOA, SNAP25 и VAMP2 в среднем мозге животных с высоким уровнем потребления алкоголя через 12 ч после однократного введения каберголина (0,5 мг/кг, в/бр, группа A+K) или растворителя (группа A+). В качестве контрольной в этой серии экспериментов были использованы «отвергающие» алкоголь крысы (группа A-,  $n=7$ ) с постоянно низким уровнем потребления алкоголя (менее 1 г/кг).

Во всех группах животных содержание дофамина в стриатуме было выше по сравнению с показателями в среднем мозге, что согласуется с представлениями о синтезе и депонировании медиатора непосредственно в пресинаптическом окончании [17-19]. Этот пул дофамина характеризуется показателем содержания медиатора в стриатуме, тогда как уровень дофамина в среднем мозге отражает соматодендритный ауторегуляторный механизм контроля мезокортиколимбических дофаминовых нейронов [20]. У хронически алкоголизованных животных с высоким уровнем потребления алкоголя было снижено содержание дофамина в стриатуме (рис. 2), но не в среднем мозге. Острое введение каберголина приводило к нормализации уровня дофамина в стриатуме, тогда как содержание дофамина в среднем мозге не изменялось. Дофаминовые D2-ауторецепторы локализуются как на пресинаптической мембране, так и на телах и дендритах дофаминовых нейронов вентральной покрышки среднего мозга (ventral tegmental area, VTA). Показано, что введение агонистов D2-рецепторов в VTA подавляет освобождение дофамина в этой области, а, следовательно, и процесс аутоингибирования DA нейронов [17, 21]. Таким образом, суммарный эффект каберголина на уровень DA в стриатуме является результатом его взаимодействия с пресинаптическими ауторецепторами и ауторецепторами, локализованными на теле и дендритах VTA [22]. Однако неясно, связан ли эффект повышения уровня дофамина в стриатуме с подавлением выброса дофамина вследствие стимуляции D2-ауторецепторов каберголином или обусловлен вовлечением других звеньев дофаминовой нейротрансмиссии, а именно – синтеза DA, обратного захвата, процессов везикулярного транспорта. Для проверки этой гипотезы в работе определяли уровень экспрессии мРНК, кодирующей белки, обеспечивающие работу основных звеньев дофаминовой ней-



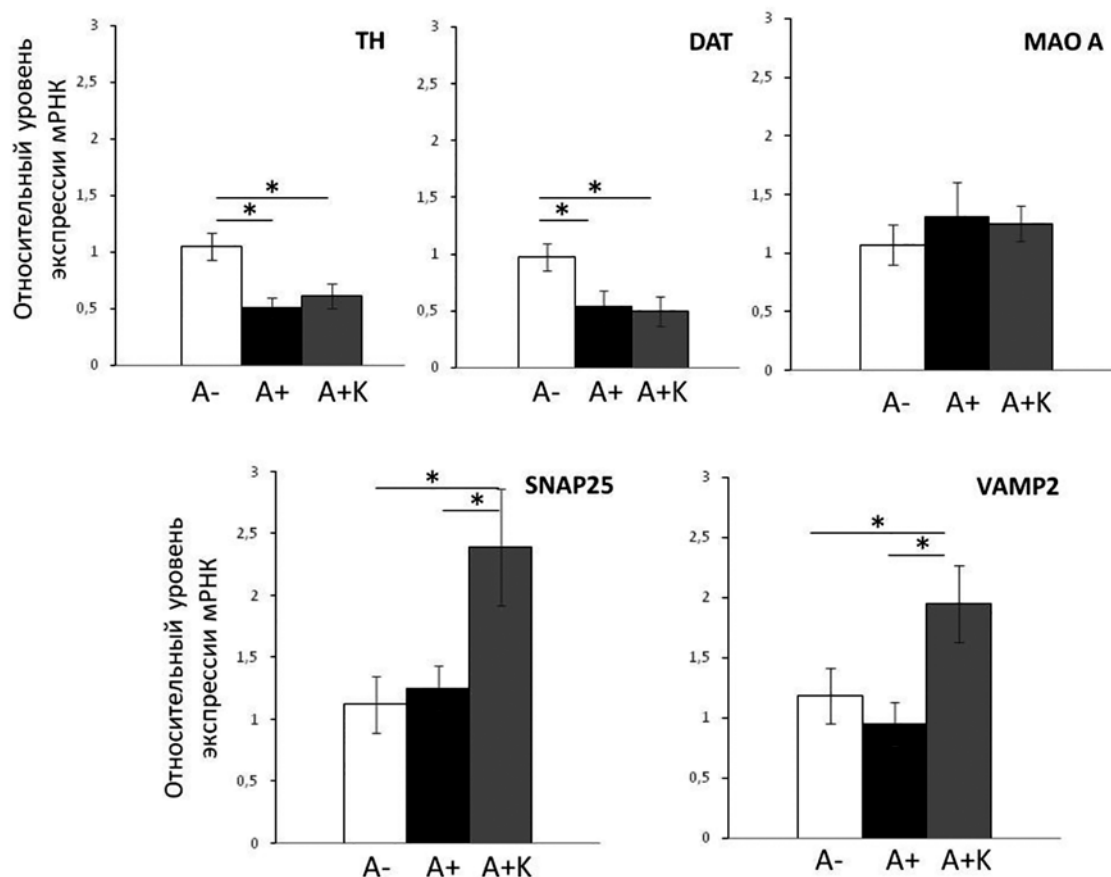
**Рис. 1.** Показатели суточного потребления алкоголя (г/кг) в модели «свободный выбор» между водой и 10% раствором алкоголя крысами экспериментальной группы A+K (при введении каберголина, пунктирная линия) и контрольной (сплошная линия).

A+ — хронически алкоголизованные крысы, получавшие инъекции растворителя с интервалом 48 ч ( $n=10$ ); A+K — хронически алкоголизованные крысы, получавшие каберголин (0,5 мг/кг, в/б,  $n=10$ ). Стрелками отмечены дни в/б введения растворителя или каберголина. Результаты представлены в виде значений среднего ± ошибка среднего. Значимость различий между группами \* $p<0,05$  (two-way ANOVA для повторных измерений с последующим post hoc анализом).



**Рис. 2.** Влияние каберголина на содержание дофамина в среднем мозге и стриатуме крыс с высоким уровнем потребления алкоголя.

A- ( $n=7$ ) — «отвергающие» алкоголь крысы; A+ — группа «предпочитающих» алкоголь крыс, получающих инъекцию растворителя ( $n=7$ ); A+K — группа «предпочитающих» алкоголь крыс, получающих инъекцию каберголина (0,5 мг/кг, в/б,  $n=7$ ). \* —  $p<0,05$  (t-критерий Стьюдента).



**Рис. 3.** Показатели экспрессии мРНК TH, DAT, MAO A, SNAP25 и VAMP2 в среднем мозге крыс. Обозначения как на рис. 2. \* —  $p < 0,05$  (t-критерий Стьюдента).

ротрансмиссии в мезолимбических нейронах - TH, DAT и MAO A, а также уровень мРНК не специфических для дофаминовых нейронов белков везикулярного транспорта — ор SNAP25 и VAMP2 (рис. 3).

У хронически алкоголизованных животных с высоким уровнем потребления алкоголя были значимо снижены показатели экспрессии мРНК TH и DAT, что может лежать в основе снижения содержания DA в стриатуме этих животных по сравнению с «отвергающими» алкоголь крысами. Вместе с тем, каберголин не влиял на уровень мРНК TH и DAT в среднем мозге «предпочитающих» алкоголь животных (рис. 3). Уровень экспрессии мРНК MAO A не различался в экспериментальных группах. Показатели экспрессии мРНК синаптических белков SNAP25 и VAMP2 не изменялись у животных с высоким уровнем потребления алкоголя (A+ по сравнению с A-), тогда как острое введение каберголина приводило к статистически значи-

мому повышению уровня мРНК: в 2,4 раза для SNAP25 и в 1,9 раз для VAMP2 (рис. 3).

Влияние этанола на экспрессию и функции белков SNAP25 и VAMP2 практически не изучено. Однако в последние годы появились работы, показывающие важную роль этих белков в регуляции функций дофаминовой системы мозга. Так, гетерозиготные мыши мутантной линии Coloboma с делецией участка 2-й хромосомы — места локализации гена SNAP25 [23] демонстрируют поведение, типичное для «синдрома гиперактивности и дефицита внимания», которое нормализуется при действии малых доз амфетамина, что говорит о нарушении функций дофаминовой системы, и, прежде всего, процесса обратного захвата дофамина. В нашем исследовании экспрессия мРНК SNAP25 в среднем мозге не была изменена у животных с высоким уровнем потребления алкоголя, но ее уровень был существенно выше при введении животным каберголина, что может играть важную компенсаторную роль

в нормализации функций дофаминовой системы и, как следствие, в снижении потребления этанола. Участие другого синаптического белка (VAMP2) в реализации эффектов фармакологических препаратов также активно изучается [24]. В частности, показано, что увеличение уровня экспрессии VAMP2 может играть важную роль в механизмах нейроадаптивного ответа на антидепрессанты [24].

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что стратегия активации дофаминовых D2-рецепторов с применением агонистов может быть эффективной для коррекции функций мезолимбической дофаминовой системы мозга и снижения потребления алкоголя, однако решение о целесообразности использования препаратов этой группы в терапии алкогольной зависимости требует дальнейшего изучения нейрохимических механизмов их эффективности, а также доз и режима введения для безопасности у больных.

### Литература

1. Blanco-Gandía MC, Rodríguez-Arias M. Pharmacological treatments for opiate and alcohol addiction: A historical perspective of the last 50 years. *Eur J Pharmacol.* 2018; 836:89-101. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.007>
2. Kranzler HR, Soyka M. Diagnosis and Pharmacotherapy of Alcohol Use Disorder: A Review. *JAMA.* 2018; 320(8):815-824. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.11406>
3. Strother WN, Lumeng L, Li TK, McBride WJ. Regional CNS densities of serotonin 1A and dopamine D2 receptors in periadolescent alcohol-preferring P and alcohol-nonpreferring NP rat pups. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003; 74(2):335-42. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)01001-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)01001-8)
4. Thanos PK, Wang GJ, Volkow ND. Positron emission tomography as a tool for studying alcohol abuse. *Alcohol Res Health.* 2008; 31(3):233-7.
5. Borg V. Bromocriptine in the prevention of alcohol abuse. *Acta Psychiatrica Scandinavica.* 1983; 68(2):100-110. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0447.1983.tb06987.x>
6. Dongier M, Vachon L, Schwartz G. Bromocriptine in the Treatment of Alcohol Dependence. *Alcoholism Clinical and Experimental Research.* 1992; 15(6):970-7. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1991.tb05197>
7. Анохина И.П., Станишевская А.В., Коган Б.М., Христолюбова Н.А. Влияние бромокриптина на потребление алкоголя и уровень катехоламинов в мозге крыс в условиях их длительной алкоголизации. *Журнал фармакология и токсикология.* 1985; 3:88-91.
8. Kvernmo T, Hartter S, Burger E. A review of the receptor-binding and pharmacokinetic properties of dopamine agonists. *Clin Ther.* 2006; 8(28):1065-78. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2006.08.004>
9. Curran MP, Perry CM. Cabergoline: a review of its use in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs.* 2004; 64(18): 2125-41. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464180-00015>
10. Anokhin P, Shamakina I, Proskuryakova T, Shokhonova V et al. The selective agonist of dopamine D2 receptors cabergoline decreases alcohol consumption and increases the level of DRD2 mRNA in the brain of rats with chronic alcohol intoxication. *Neurochemical Journal.* 2017; 11(1): 72-8. <https://doi.org/10.1134/S1819712417010020>

11. Carnicella S, Ahmadiantehrani S, He D et al. Cabergoline Decreases Alcohol Drinking and Seeking Behaviors Via Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *Biol Psychiatry.* 2009; 66(2):146-53. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.12.022>
12. Shamakina I, Proskuryakova T, Shokhonova V et al. An effect of cabergoline on alcohol consumption and DRD2 expression in the brain of rats with chronic alcohol intoxication. *Zhurnal nevrologii psikhiiatrii im SS Korsakova.* 2016; 11(2): 74-80 <https://doi.org/10.17116/jnevro201611611274-80>
13. Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Yoon H, Kunugi H. Cabergoline, a dopamine receptor agonist, has an antidepressant-like property and enhances brain-derived neurotrophic factor signaling. *Psychopharmacology (Berl).* 2010; 211(3):291-301. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1894-8>
14. Anokhin P, Proskuryakova T, Shokhonova, Shamakina I. Dopamine D2-agonist cabergoline increases brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in the rat midbrain and demonstrates anxiolytic-like behavioral effects. *European Neuropsychopharmacology.* 2017; 27(S4): S648.
15. Elpi E. and Krstulovic AM. Quantitative analysis of catecholamines and related compounds. *Biol Mass Spectrom.* 1988; 15(7):411. <https://doi.org/10.1002/bms.1200150709>
16. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods.* 2001; 25:402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
17. Adell A, Artigas F. The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004; 28(4): 415-31 <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.05.001>
18. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2010; 508(1):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>
19. Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal.* 2013; 11(1):34. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-34>
20. Rice ME, Patel JC. Somatodendritic dopamine release: recent mechanistic insights. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015; 370(1672):20140185. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0185>
21. Ford CP. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience.* 2014; 282:13-22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.025>
22. Robinson BG, Bunzow JR, Grimm JB, et al. Desensitized D2 autoreceptors are resistant to trafficking. *Sci Rep.* 2017; 7(1):4379. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04728-z>
23. Corradini I, Verderio C, Sala M, Wilson M. C, Matteoli M. SNAP-25 in neuropsychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1152: 93-99. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03995.x>
24. Lesch KP, Schmitt A. Antidepressants and gene expression profiling: How to SNARE novel drug targets. *Pharmacogenomics J.* 2002; 2:346-8.

### References

1. Blanco-Gandía MC, Rodríguez-Arias M. Pharmacological treatments for opiate and alcohol addiction: A historical perspective of the last 50 years. *Eur J Pharmacol.* 2018; 836:89-101. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.007>
2. Kranzler HR, Soyka M. Diagnosis and Pharmacotherapy of Alcohol Use Disorder: A Review. *JAMA.* 2018; 320(8):815-24. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.11406>

3. Strother WN, Lumeng L, Li TK, McBride WJ. Regional CNS densities of serotonin 1A and dopamine D2 receptors in periadolescent alcohol-preferring P and alcohol-nonpreferring NP rat pups. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003; 74(2):335-42. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)01001-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)01001-8).
4. Thanos PK, Wang GJ, Volkow ND. Positron emission tomography as a tool for studying alcohol abuse. *Alcohol Res Health.* 2008; 31(3):233-7.
5. Borg V. Bromocriptine in the prevention of alcohol abuse. *Acta Psychiatrica Scandinavica.* 1983; 68(2):100-10. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0447.1983.tb06987.x>
6. Dongier M, Vachon L, Schwartz G. Bromocriptine in the Treatment of Alcohol Dependence. *Alcoholism Clinical and Experimental Research.* 1992; 15(6):970-7. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1991.tb05197>
7. Anokhina I.P., Stanishevskaya A.V., Kogan B.M., Khristolyubova N.A. The effect of bromocriptine on alcohol consumption and the catecholamine level in brain of rats in conditions of their long-term alcoholism. *Zhurnal farmakologiya I toksikologiya.* 1985; 3:88-91.
8. Kvernmo T, Hartter S, Burger E. A review of the receptor-binding and pharmacokinetic properties of dopamine agonists. *Clin Ther.* 2006; 8(28):1065–178. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2006.08.004>
9. Curran MP, Perry CM. Cabergoline: a review of its use in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs.* 2004; 64(18): 2125-41. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464180-00015>
10. Anokhin P, Shamakina I, Proskuryakova T, Shokhonova V et al. The selective agonist of dopamine D2 receptors cabergoline decreases alcohol consumption and increases the level of DRD2 mRNA in the brain of rats with chronic alcohol intoxication. *Neurochemical Journal.* 2017; 11(1): 72–78. <https://doi.org/10.1134/S1819712417010020>
11. Carnicella S, Ahmadiantehrani S, He D et al. Cabergoline Decreases Alcohol Drinking and Seeking Behaviors Via Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *Biol Psychiatry.* 2009; 66(2):146-153. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.12.022>
12. Shamakina I, Proskuryakova T, Shokhonova V et al. An effect of cabergoline on alcohol consumption and DRD2 expression in the brain of rats with chronic alcohol intoxication. *Zhurnal nevrologii i psikhatrii im SS Korsakova.* 2016; 11(2): 74-80 <https://doi.org/10.17116/jnevro201611611274-80>
13. Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Yoon H, Kunugi H. Cabergoline, a dopamine receptor agonist, has an antidepressant-like property and enhances brain-derived neurotrophic factor signaling. *Psychopharmacology (Berl).* 2010; 211(3):291-301. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1894-8>
14. Anokhin P, Proskuryakova T, Shokhonova , Shamakina I. Dopamine D2-agonist cabergoline increases brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in the rat midbrain and demonstrates anxiolytic-like behavioral effects. *European Neuropsychopharmacology.* 2017; 27(S4): S648.
15. Elpi E. and Krstulovic AM. Quantitative analysis of catecholamines and related compounds. *Biol Mass Spectrom.* 1988; 15(7):411. <https://doi.org/10.1002/bms.1200150709>
16. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> method. *Methods.* 2001; 25:402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
18. Adell A, Artigas F. The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004; 28(4): 415-31 <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.05.001>
19. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2010; 508(1):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>
20. Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal.* 2013; 11(1):34. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-34>
21. Rice ME, Patel JC. Somatodendritic dopamine release: recent mechanistic insights. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015; 370(1672):20140185. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0185>
22. Ford CP. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience.* 2014; 282:13-22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.025>
23. Robinson BG, Bunzow JR, Grimm JB, et al. Desensitized D2 autoreceptors are resistant to trafficking. *Sci Rep.* 2017; 7(1):4379. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04728-z>
24. Corradini I, Verderio C, Sala M, Wilson M. C, Matteoli M. SNAP-25 in neuropsychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1152: 93–9. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03995.x>
25. Lesch KP, Schmitt A. Antidepressants and gene expression profiling: How to SNARE novel drug targets. *Pharmacogenomics J.* 2002; 2:346-8.

### Сведения об авторах:

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

**Веретинская Алла Георгиевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб психофармакологии Национального научного центра наркологии – филиала ФГБУ «НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, e-mail: allaveretinskaya@yandex.ru;

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

**Шамакина Инна Юрьевна**, канд. биол. наук, зав. лаб. психофармакологии Национального научного центра наркологии – филиала ФГБУ «НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, e-mail: shamakina@yahoo.com

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Маклакова И.Ю.<sup>1,2</sup>, Гребнев Д.Ю.<sup>1,2</sup>, Юсупова В.Ч.<sup>1</sup>, Примакова Е.А.<sup>3</sup>

## Изучение хоуминга ММСК после резекции печени

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, г. Екатеринбург, Россия, ул. Репина, д. 3;

<sup>2</sup>ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», 620026, г. Екатеринбург, Россия, ул. Карла Маркса, д. 22 А;

<sup>3</sup>РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница», г. Минск, Беларусь

**Цель работы** - изучение направленного движения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), выделенных из плаценты, в различные органы и ткани лабораторных животных в физиологических условиях и после субтотальной резекции печени. **Методика.** Клеточную культуру ММСК получали из хориона плаценты лабораторных крыс. Культивирование ММСК проводилось в условиях CO<sub>2</sub>— инкубатора при температуре 37 °С с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Замену среды проводили каждые 3–4 сут до достижения клетками 70–80 % конфлюэнтности. При формировании соответствующего монослоя осуществлялся пересев клеток. При трансплантации лабораторным животным была использована культура ММСК 3-го пассажа. Введение клеток производили сразу после выполнения субтотальной резекции печени. Резекция 70% печени у крыс выполнена по методике G.M. Higgins, R.M. Anderson. Введение ММСК, меченых акридиновым оранжевым, осуществляли внутривенно, интраперитонеально, в печеночную артерию, в портальную вену в дозе 4 млн кл/кг. массы тела. Анализ распределения ММСК проводили через 3 и 24 ч. **Результаты.** Показано, что через 1 сут после введения клеток ложно-оперированным животным не отмечено существенных изменений распределения ММСК по сравнению с их распределением через 3 ч. Однако если введение клеток сопряжено с оперативным вмешательством (лапаротомия для обеспечения введения клеток в *v. portae* и *a. hepatica*) происходит снижение их количества в периферической крови. Через 1 сут после резекции печени в изучаемых органах и тканях (периферическая кровь, легкое, селезенка, костный мозг, тонкий кишечник, почка) содержание трансплантированных ММСК ниже по сравнению с их количеством в тот же период времени в данных органах и тканях без резекции печени. Обращает внимание значительное увеличение количества введенных клеток в печени после ее резекции как через 3 ч, так и через 24 ч по сравнению с физиологическими условиями.

**Заключение.** Отмечено значительное увеличение количества клеток в печени после ее резекции вне зависимости от способа введения. Внутривенный способ введения клеток показал низкую эффективность доставки клеток в органы и ткани организма.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; хоуминг; резекция печени.

**Для цитирования:** Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Юсупова В.Ч., Примакова Е.А. Изучение Хоуминга ММСК после резекции печени. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1):40-45.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.40-45

**Для корреспонденции:** Гребнев Дмитрий Юрьевич, доктор мед. наук, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, ст. науч. сотр. ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», лаб. антивозрастных технологий, e-mail: dr-Grebnev77@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки

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

**Поступила** 05.10.2018

Maklakova I.Yu.<sup>1,2</sup>, Grebnev D.Yu.<sup>1,2</sup>, Yusupova V.Ch.<sup>1</sup>, Primakova E.A.<sup>3</sup>

## THE STUDY OF MMSC HOMING AFTER LIVER RESECTION

<sup>1</sup>Ural State Medical University, Repin Str. 3, Ekaterinburg 620028, Russian Federation;

<sup>2</sup>Institute of Medical Cell Technologies, Karla Marksa Str. 22A, Ekaterinburg 620026, Russian Federation;

<sup>3</sup>National Science and Practice Center of Organ and Tissue Transplantation at the Ultrasound Municipal Clinical Hospital #9, Minsk, Belarus

The **aim** was to study migration of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) isolated from the placenta to various organs and tissues of laboratory animals under the physiological conditions and after subtotal liver resection.

**Method.** The MMSC cells for culturing were obtained from the rat placental chorion. MMSCs were cultured in a CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, and 90% humidity. The medium was replaced every 3–4 days until the cells reached 70–80 % confluence. Upon formation of an appropriate monolayer the cells were passed. The third passage culture of MMSC was used for transplantation to laboratory



animals. Cells were injected immediately after subtotal liver resection. The 70% rat liver resection was performed according to the method of G.M. Higgins and R.M. Anderson. The acridine orange labeled MMSC were injected intravenously, intraperitoneally, into the hepatic artery, and into the portal vein at a dose of  $4 \times 10^6$  cells/kg body weight. The MMSC distribution was analyzed at 3 and 24 hours. **Results.** In 24 h after the cell injection in the absence of liver resection, no significant changes were observed in the MMSCs distribution compared to their distribution in 3 hours. However, when the cell injection was associated with a surgery (laparotomy to ensure the cell injection into the portal vein and hepatic artery) the cell number was decreased in the peripheral blood. At one day after liver resection, the content of transplanted MMSCs was lower in the studied organs and tissues (peripheral blood, lung, spleen, bone marrow, small intestine, and kidney) compared to the respective values without liver resection in the same period. Noticeably, the number of injected cells was significantly increased in the liver at both 3 and 24 hours after resection compared to the physiological conditions. **Conclusion.** The number of cells was significantly increased in the liver after resection regardless of the cell administration route. Intraperitoneal cell injection showed a low effectiveness of cell delivery to organs and tissues.

**Keywords:** multipotent mesenchymal stromal cells; homing; liver resection.

**For citation:** Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Yusupova V.Ch., Primakova E.A. The study of MMSC Homing after liver resection. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1): 40-45. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.40-45

**For correspondence:** Grebnev Dmitriy Yurievich (Head. Department of pathological physiology of the USMU is conducted by the Ministry of health of Russia, Ph. D., senior researcher "Institute of medical cell technologies", laboratory of anti-aging technology), e-mail: dr-Grebnev77@mail.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Maklakova I.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-6895-7947>

Grebnev D.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5698-8404>

**Received** 05.10.2018

## Введение

В настоящее время накоплен значительный материал, свидетельствующий об эффективности использования стволовых клеток для активации репаративных процессов в печени в условиях ее повреждения [1–3]. Для этих целей широко используются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК). Это связано с биологическими особенностями ММСК [4–7]. ММСК активируют процессы регенерации печени через выработку факторов стволовой клетки, что приводит к увеличению числа клеток Ито в печени, увеличению количества гепатоцитов. ММСК способны также вырабатывать ферменты - матриксные металлопротеиназы, обеспечивающие разрушение коллагена 1-го и 5-го типов, что приводит к обновлению внеклеточного матрикса. Кроме того, ММСК вырабатывают противовоспалительные цитокины (ИЛ10, TGF- $\beta$ ), снижающие экспрессию pF-kB в воспалительных клетках, что, в свою очередь, препятствует дифференцировке клеток в миофибробласты, усиливают их апоптоз [8]. В результате в ММСК преобладают процессы образования гепатоцитов и обновления внеклеточного матрикса. В отечественной и зарубежной литературе обсуждаются данные о различном влиянии трансплантированных ММСК на репаративные процессы в печени при различных способах их введения: в хвостовую вену, в воротную вену, в печеночную

артерию, внутрибрюшинно [9]. Это обусловило необходимость изучения биораспределения ММСК в зависимости от способа их введения.

Цель исследования – изучение направленного движения ММСК, выделенных из плаценты, в различные органы и ткани лабораторных животных в физиологических условиях и после субтотальной резекции печени.

## Методика

Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Работа одобрена этическим комитетом института. Клеточную культуру ММСК получали из хориона плаценты лабораторных животных. Мононуклеарную фракцию клеток выделяли путем последовательной механической и ферментативной (раствор аккутазы (Millipore, США)) обработки ткани плаценты. Для получения первичной культуры ММСК осуществляли пассаж мононуклеарной фракции клеток, выделенных из ткани плаценты, в специализированной среде для культивирования ММСК в чашки Петри в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток на  $1 \text{ см}^2$ . Культивирование ММСК проводилось в условиях  $\text{CO}_2$  – инкубатора при температуре  $37^\circ\text{C}$  с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Замену среды проводили каждые 3-4 сут до достижения

клетками 70-80% конфлюэнтности. При формировании соответствующего монослоя осуществляли перевес клеток. Для оценки хоуминга при трансплантации лабораторным животным использовали культуру ММСК третьего пассажа.

*Приготовление раствора акридинового оранжевого.* Для приготовления рабочего 0,02% раствора акридинового оранжевого к 50 мкл 1% добавляли 2,5 мл 0,9% NaCl. Для окрашивания к суспензии клеток добавляли 0,02% раствора акридинового оранжевого в соотношении 1:1. Смесь инкубировали в темноте в течение 20 мин. С целью отмывки от акридинового

оранжевого суспензию клеток центрифугировали 15 мин при 1000 g.

Резекцию 70% печени у крыс выполняли по методике G.M. Higgins, R.M. Anderson [10]. Введение клеток производили сразу после выполнения субтотальной резекции.

ММСК, меченные акридиновым оранжевым, вводили внутривенно, интраперитонеально, в печеночную артерию и в портальную вену (4 млккл/кг массы тела). Распределение ММСК изучали через 3 и 24 ч.

*Получение суспензии клеток органов.* Образцы тканей органов (легкое, селезенка, сердце, тонкий кишеч-

Таблица 1

Распределение меченых акридин оранжевым ММСК в органах и тканях крысы без резекции печени (M±m, n=5)

Орган, ткань	Способ введения	Содержание клеток, %	
		3 ч	24 ч
Периферическая кровь	Внутривенно	0,0085±0,0007*	0,0076±0,0006
	<i>v.portae</i>	0,0086±0,0007*	Не обнаружено
	<i>a.hepatica</i>	0,0087±0,0004*	Не обнаружено
	внутрибрюшинно	0,0044±0,0015°	0,0049±0,001°
Легкое	Внутривенно	0,0090±0,0015*	0,0083±0,0008*
	<i>v.portae</i>	0,0051±0,0005	0,0046±0,0007
	<i>a.hepatica</i>	0,0046±0,0009	0,0044±0,0010
	внутрибрюшинно	0,0023±0,0007°	0,0026±0,0009°
Селезенка	Внутривенно	0,0049±0,0009	0,0042±0,0016
	<i>v.portae</i>	0,0047±0,0008	0,0039±0,0015
	<i>hepatica</i>	0,0039±0,0008	0,0045±0,0016
	внутрибрюшинно	0,0042±0,0008	0,0047±0,0018
Костный мозг	Внутривенно	0,0051±0,0004	0,0049±0,0012
	<i>v.portae</i>	0,0048±0,001	0,0041±0,0016
	<i>hepatica</i>	0,0042±0,0006	0,0040±0,0012
	внутрибрюшинно	0,0023±0,0009°	0,0020±0,0003°
Сердце	Внутривенно	Не обнаружено	Не обнаружено
	<i>v.portae</i>	Не обнаружено	Не обнаружено
	<i>hepatica</i>	Не обнаружено	Не обнаружено
	внутрибрюшинно	Не обнаружено	Не обнаружено
Тонкий кишечник	Внутривенно	0,0048±0,0008	0,0037±0,0007
	<i>v.portae</i>	0,0043±0,0013	0,0043±0,0017
	<i>hepatica</i>	0,0040±0,0009	0,0047±0,0023
	внутрибрюшинно	Не обнаружено	Не обнаружено
Почка	Внутривенно	0,0045±0,0011	0,0037±0,0016
	<i>v.portae</i>	0,0041±0,0006	0,0046±0,0019
	<i>hepatica</i>	0,0044±0,0018	0,0042±0,0014
	внутрибрюшинно	0,0023±0,0004°	0,0023±0,0006°
Печень	Внутривенно	0,0039±0,0003	0,0049±0,001
	<i>v.portae</i>	0,0047±0,0008	0,0036±0,0007
	<i>hepatica</i>	0,0040±0,0015	0,0039±0,0018
	внутрибрюшинно	0,0038±0,0016	0,0047±0,0008

*Примечание.* \* – статистически значимые отличия от показателей содержания клеток в органах и тканях у лабораторных животных, (p<0,05); ° – отличие содержания клеток у лабораторных животных при внутрибрюшинном способе введения от содержания клеток при других способах введения (внутривенно, *v.portae*, *a.hepatica*).

ник, почка, печень, костный мозг) с целью удаления крови промывали в стерильном фосфатном буфере pH 7,2 - Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Stem Cell Technologies, США), помещали в стерильную чашку Петри (диаметр 6 см) с 3,8 мл раствора Аккутазы (Millipore, США). Раствор аккутазы обеспечивает ферментативное разрушение межклеточных контактов, не разрушая при этом мембрану клеток. Ткань органа измельчали с помощью маленьких ножиц, суспензию инкубировали на шейкере при медленном покачивании в течение 7 мин при температуре 37 °С. С целью удаления дебриса суспензию клеток фильтровали через филь-

тры с размером пор 70 мкм (Millipore, США). Для выделения мононуклеарной фракции суспензию наносили на раствор лимфолайт-М (StemCell Technologies, США) в соотношении 1:1 и центрифугировали при 1000 g в течение 20 мин. Для освобождения от лимфолайт-М осуществляли центрифугирование при 300 g в течение 10 мин. Осадок суспендировали в растворе PBS, подсчет общего количества клеток проводили в камере Горяева.

*Костный мозг извлекали из бедренной кости. С помощью флуоресцентной микроскопии осуществляли подсчет клеток, окрашенных акридиновым оранже-*

Таблица 2

**Распределение меченых акридин оранжевым ММСК в органах и тканях крысы после резекции печени, (M±m, n=5)**

Орган, ткань	Путь введения	Содержание клеток, %	
		3 ч	24 ч
Периферическая кровь	Внутривенно	0,0050±0,0008*	Не обнаружено
	<i>v. portae</i>	0,0049±0,0006*	Не обнаружено
	hepatica	0,0050±0,0011*	Не обнаружено
	внутрибрюшинно	0,0023±0,0006*	Не обнаружено
Легкое	Внутривенно	0,0044±0,0005*	0,0047±0,0007**
	<i>v. portae</i>	0,0022±0,0006*	0,0021±0,0006**
	hepatica	0,0018±0,0005*	0,0024±0,0009**
	внутрибрюшинно	Не обнаружено	Не обнаружено
Селезенка	Внутривенно	Не обнаружено	Не обнаружено
	<i>v. portae</i>	Не обнаружено	Не обнаружено
	hepatica	Не обнаружено	Не обнаружено
	внутрибрюшинно	Не обнаружено	Не обнаружено
Костный мозг	Внутривенно	Не обнаружено	Не обнаружено
	<i>v. portae</i>	Не обнаружено	Не обнаружено
	hepatica	Не обнаружено	Не обнаружено
	внутрибрюшинно	Не обнаружено	Не обнаружено
Сердце	Внутривенно	Не обнаружено	Не обнаружено
	<i>v. portae</i>	Не обнаружено	Не обнаружено
	hepatica	Не обнаружено	Не обнаружено
	внутрибрюшинно	Не обнаружено	Не обнаружено
Тонкий кишечник	Внутривенно	Не обнаружено	Не обнаружено
	<i>v. portae</i>	Не обнаружено	Не обнаружено
	hepatica	Не обнаружено	Не обнаружено
	внутрибрюшинно	Не обнаружено	Не обнаружено
Почка	Внутривенно	0,0024±0,0001*	0,0028±0,0005**
	<i>v. portae</i>	0,0022±0,0008*	0,0026±0,0007**
	hepatica	0,0026±0,0009*	0,0025±0,0006**
	внутрибрюшинно	Не определяется	Не обнаружено
Печень	Внутривенно	0,0073±0,001*	0,0078±0,0011**
	<i>v. portae</i>	0,0081±0,001*	0,0075±0,0013**
	hepatica	0,0072±0,001*	0,0070±0,0019**
	внутрибрюшинно	0,0075±0,001*	0,0086±0,0019**

*Примечание.* \* – статистически значимые отличия от показателей содержания клеток в органах и тканях у лабораторных животных без резекции печени (данные табл. 1), через 3 ч после введения клеток (p<0,05); \*\* – отличия от показателей через 24 ч после введения клеток (p<0,05).

вым. Рассчитывали отношение окрашенных клеток к общему числу клеток.

Статистическую обработку данных проводили с применением непараметрических (ранговых) методов — Краскела-Уоллеса и Манна-Уитни. Построение диаграммы осуществлялось в программе Statistica 6,0.

## Результаты и обсуждение

В физиологических условиях через 3 ч после трансплантации меченых акридином оранжевым плацентарных ММСК в хвостовую вену, портальную вену, печеночную артерию распределение клеток в легком, селезенке, костном мозге, сердце, тонком кишечнике, почке, печени существенно не отличалось. После введения клеток интраперитонеально было установлено, что содержание меченых клеток в периферической крови, легком, костном мозге и почке было статистически значимо ниже по сравнению с их уровнем при других способах введения. При этом при интраперитонеальном способе введения ММСК трансплантированные клетки не были обнаружены в тонком кишечнике. Количество клеток в периферической крови через 3 ч после внутривенного введения, а также введения в печеночную артерию и воротную вену было существенно выше, чем в других органах и тканях. При внутривенном введении значительное количество клеток обнаруживалось в легком. В сердце клетки, меченые акридином оранжевым, не выявлялись (табл. 1).

Через 24 ч после внутрибрюшинного и внутривенного введения меченых клеток в периферической крови в физиологических условиях отмечено отсутствие статистически значимых изменений по сравнению с данными на 3 ч. После введения в воротную вену и печеночную артерию меченых ММСК в периферической крови не обнаружено. Эти результаты можно объяснить способностью ММСК к миграции в поврежденные ткани.

Введение клеток в воротную вену и печеночную артерию было сопряжено с оперативным вмешательством. В легком, селезенке, костном мозге, сердце, тонком кишечнике, почке и печени статистически значимых изменений содержания меченых ММСК через 24 ч после трансплантации клеток по сравнению с данными на 3 ч не обнаружено.

При анализе данных распределения трансплантированных клеток через 3 ч после резекции печени выявлено снижение их числа в периферической крови, легких и почках по сравнению с соответствующими показателями без резекции печени в тот же период времени. При интраперитонеальном введении меченые клетки в исследованных органах не обнаруживались.

В печени после резекции имело место статистически значимое увеличение содержания клеток по сравнению с физиологическими условиями вне зависимости от способа введения клеток (табл. 2).

Через 24 ч после резекции печени меченые клетки в периферической крови, селезенке, костном мозге, сердце, тонком кишечнике лабораторных животных не обнаруживались. Существенных различий в распределении меченых ММСК в легком, почке и печени после резекции печени не выявлено ни через 3, ни через 24 ч. В то же время при анализе показателей хоуминга клеток через 24 ч в физиологических условиях и после резекции печени обнаружено, что в легком и почке при внутривенном введении, а также при введении в портальную вену и почечную артерию имело место статистически значимое снижение количества меченых клеток. В печени обнаружено существенное увеличение содержания трансплантированных ММСК через 24 ч после резекции печени относительно данных распределения клеток в физиологических условиях.

Таким образом, через 1 сут после введения ММСК у животных без резекции печени не происходит существенных изменений в распределении ММСК по сравнению с их распределением через 3 ч. Однако, если введение клеток сопряжено с оперативным вмешательством (лапаротомия для обеспечения введения клеток в *v. portae* и *a. hepatica*) происходит существенное снижение их количества в периферической крови. Через 1 сут после резекции печени в изучаемых органах и тканях животных (периферическая кровь, легкое, селезенка, костный мозг, тонкий кишечник, почка) содержание трансплантированных ММСК ниже по сравнению с их количеством в данных органах и тканях без резекции печени в тот же период времени. Обращает на себя внимание значительное увеличение трансплантированных меченых ММСК в печени после ее резекции как через 3 ч, так и через 24 ч по сравнению с физиологическими условиями.

## Литература

1. Deng L., Liu G., Wu X., Wang Y., Tong M., Liu B., et al. Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Efficiently Rescue Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Failure in Mouse. *Scientific World Journal*. 2014; 1-8. dx.doi.org/10.1155/2014/103643.
2. Gasbarrini A., Rapaccini G.L., Rutella S., Zocco M.A., Tittoto P., Leone G., et al. Rescue therapy by portal infusion of autologous stem cells in a case of drug-induced hepatitis. *Dig Liver Dis*. 2007. 39(9): 878-82.
3. Kharazih P., Hellström P.M., Noorinayer B., Farzaneh F., Aghajani K., Jafari F., et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II. *Eur J Gastroenterol Hepatology*. 2009; 21(10): 1199-205.

4. Маклакова И.Ю., Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю. Изменение морфометрических и цитологических показателей селезенки при острой кровопотере на фоне острой кровопотере на фоне введения стволовых клеток. *Успехи геронтологии*. 2015; 28(2): 218-21.
5. Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П. Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 59(4): 82-6.
6. Сазонов С.В. Т-лимфоциты регуляторы активности пролиферации клеток в ткани (научный обзор). *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2007; 1: 91.
7. Ikebe C., Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. *Biomed Research International*. 2014. P.951512.
8. Rebeca, S.Y. Wong Mesenchymal stem cells: angels or demons? *Journal of biomedicine and biotechnology* 2011; (Vol. 2): 1-9.
9. Liu Z.C., Chang T.M. Research Article Intrasplenic Transplantation of Bioencapsulated Mesenchymal Stem Cells Improves the Recovery Rates of 90% Partial Hepatatectomized Rats. *Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International*. 2012. 1-6.
10. Higgins G.M., Anderson R.M. Experimental pathology of the liver. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. *A.M.A. Arch. Path.* 1931; (12): 186-202.
2. Gasbarrini A., Rapaccini G.L., Rutella S., Zocco M.A., Tittoto P., Leone G., et al. Rescue therapy by portal infusion of autologous stem cells in a case of drug-induced hepatitis. *Dig Liver Dis.* 2007; 39(9): 878-82.
3. Kharaziha P., Hellström P.M., Noorinayer B., Farzaneh F., Aghajani K., Jafari F., et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II. *Eur J Gastroenterol Hepatology*. 2009; 21(10): 1199-205.
4. Maklakova I.Yu., Yastrebov A.P., Grebnev D.Yu. Changes in morphometric and cytological parameters of the spleen in acute blood loss on the background of acute blood loss on the background of the introduction of stem cells. *Uspekhi gerontologii*. 2015; 28(2): 218-21. (In Russian)
5. Maklakova I.Yu. Influence of extreme factors on homeing of multipotent mesenchymal stromal cells. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimental'naya terapiya*. 2015; 59(4): 82-6. (In Russian)
6. Sazonov S.V. T-lymphocytes regulators of cell proliferation activity in tissue (scientific review). *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2007; (1): 91. (In Russian)
7. Ikebe C., Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. *Biomed Research International*. 2014; 951512.
8. Rebeca S.Y. Wong Mesenchymal stem cells: angels or demons? *Journal of biomedicine and biotechnology*. 2011; Vol. 2. 1-9.
9. Liu Z.C., Chang T.M. Intrasplenic Transplantation of Bioencapsulated Mesenchymal Stem Cells Improves the Recovery Rates of 90% Partial Hepatatectomized Rats. *Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International*. 2012; 1-6. DOI: 10.1155/2012/697094.
10. Higgins G.M., Anderson R.M. Experimental pathology of the liver. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. *A.M.A. Arch. Path.* 1931; 12: 186-202.

### References

1. Deng L., Liu G., Wu X., Wang Y., Tong M., Liu B., et al. Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Efficiently Rescue Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Failure in Mouse. *Scientific World Journal*. 2014. 1-8. dx.doi.org/10.1155/2014/103643.

### Сведения об авторах:

**Маклакова Ирина Юрьевна**, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России; ст. науч. сотр. ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», e-mail: makliu@mail.ru;

**Гребнев Дмитрий Юрьевич**, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», e-mail: dr-grebnev77@mail.ru;

**Юсупова Виктория Чаукатовна**, аспирант каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России;

**Примакова Евгения Алексеевна**, науч. сотр. РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница», г. Минск, Беларусь.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.12-008.331.1-06:616.13/14-004.6-037

Генкель В.В., Салашенко А.О., Алексеева О.А., Шапошник И.И.

## Биомеханические факторы риска поражения сосудов у пациентов с гипертонической болезнью в зависимости от ультразвуковой морфологии атеросклероза периферических артерий

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, г. Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64

**Цель.** Оценка показателей эндотелиальной скорости сдвига и циркулярного напряжения сосудистой стенки у пациентов с гипертонической болезнью в зависимости от тяжести атеросклеротического поражения периферических артерий. **Методика.** В исследование были включены 85 пациентов с гипертонической болезнью, 46 мужчин и 39 женщин, средний возраст которых составлял  $57,1 \pm 11,7$  лет. Проводили дуплексное сканирование сонных артерий и артерий нижних конечностей. Определение эндотелиальной скорости сдвига и циркулярного напряжения сосудистой стенки проводили на участке общей сонной артерии. При разделении исследуемой когорты пациентов на группы использовали ультразвуковую морфологическую классификацию атеросклеротического поражения сосудистой стенки по G. Belcaro и соавт. **Результаты.** У пациентов III класса скорость сдвига составляла  $402 \pm 107$  с-1, что было статистически значимо ниже значений пациентов I класса –  $538 \pm 123$  с-1 ( $p=0,001$ ). Увеличение количества баллов по классификации G. Belcaro и соавт., отражающее прогрессирование атеросклероза, ассоциировалось со снижением скорости сдвига ( $r=-0,281$ ;  $p=0,01$ ). У пациентов III ( $5,68 \pm 1,12$  дин/см $^2$ ) и IV ( $6,19 \pm 1,31$  дин/см $^2$ ) классов циркулярное напряжение стенки было статистически значимо выше в сравнении с пациентами I класса –  $4,90 \pm 1,00$  дин/см $^2$ . Выявлены обратные корреляционные связи между эндотелиальной скоростью сдвига и циркулярным напряжением сосудистой стенки ( $r=-0,289$ ;  $p=0,007$ ). **Заключение.** У пациентов с гипертонической болезнью по мере увеличения тяжести поражения периферических артерий выявлено увеличение циркулярного напряжения сосудистой стенки и снижение эндотелиальной скорости сдвига с последующим повышением при стенозирующем атеросклерозе.

**Ключевые слова:** скорость сдвига; атеросклероз; циркулярное напряжение стенки; артериальная гипертензия.

**Для цитирования:** Генкель В.В., Салашенко А.О., Алексеева О.А., Шапошник И.И. Биомеханические факторы риска поражения сосудов у пациентов с гипертонической болезнью в зависимости от ультразвуковой морфологии атеросклероза периферических артерий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 46-52.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.46-52

**Для корреспонденции:** Генкель Вадим Викторович, ассистент каф. пропедевтики внутренних болезней, e-mail: henkel-07@mail.ru  
**Благодарность.** Авторы выражают благодарность заведующей биохимическим отделом ЦНИЛ ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, к.м.н., В.А. Сумеркиной, младшему научному сотруднику ЦНИЛ ФГБОУ ВО ЮУГМУ Л.Р. Тороповой, старшему лаборанту ЦНИЛ ФГБОУ ВО ЮУГМУ Е.И. Ильиных за проведение лабораторных методов исследования.

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

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

Поступила 27.09.2017

Genkel V.V., Salashenko A.O., Alekseeva O.A., Shaposhnik I.I.

## BIOMECHANICAL RISK FACTORS FOR VASCULAR DISEASE IN HYPERTENSIVE PATIENTS ACCORDING TO ULTRASOUND MORPHOLOGY OF PERIPHERAL ARTERY ATHEROSCLEROSIS

South Ural State Medical University, Vorkovskogo Str. 64, Chelyabinsk 454092, Russian Federation

**Aim.** To evaluate endothelial shear rate and circumferential wall tension in patients with hypertension based on severity of atherosclerotic lesions in peripheral arteries. **Methods.** The study included 85 patients with hypertension (46 men and 39 women) aged  $57.1 \pm 11.7$ . All patients underwent a duplex scanning of carotid arteries and lower limb arteries. Measurements of endothelial shear rate and circumferential wall tension were performed at the site of the common carotid artery (CCA). The peak blood flow velocity and the diastolic diameter of the blood vessel were measured in the M-mode. The shear rate was calculated using the Hagen-Poiseuille equation. Circumferential wall tension was determined in accordance with the Laplace's law. Patients were divided into four groups using the ultrasonic morphological classification of the arterial wall by G. Belcaro et al. **Results.** In class III patients, the shear rate was significantly lower than in class I patients ( $402 \pm 107$  s $^{-1}$  vs.  $538 \pm 123$  s $^{-1}$ , respectively,  $p = 0.001$ ). An

increased number of points (by G. Belcaro et al. classification) was associated with a decreased shear rate in CCA ( $r = -0.281$ ;  $p = 0.01$ ). Class III ( $5.68 \pm 1.12$  dyne/cm $\cdot$ 10 $^4$ ) and class IV ( $6.19 \pm 1.31$  dyne/cm $\cdot$ 10 $^4$ ) patients had significantly higher values of the circumferential wall tension than class I patients ( $4.90 \pm 1.00$  dyne/cm $\cdot$ 10 $^4$ ). The endothelial shear rate inversely correlated with the circumferential wall tension ( $r = -0.289$ ;  $p = 0.007$ ). **Conclusion.** In patients with hypertension and peripheral artery atherosclerosis, nonlinear changes in the endothelial shear rate and the increased circumferential wall tension paralleled the increasing severity of peripheral atherosclerosis.

**Keywords:** shear rate, atherosclerosis, circumferential wall tension, hypertension.

**For citation:** Genkel V.V., Salashenko A.O., Alekseeva O.A., Shaposhnik I.I. Biomechanical risk factors for vascular disease in hypertensive patients according to ultrasound morphology of peripheral artery atherosclerosis *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1):46-52. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.46-52

**For correspondence:** Vadim V. Genkel, Research assistant, Department of Internal Medicine «Federal State Budgetary Scientific Institution «South-Ural State Medical University»; 64 Vorovskogo Str., Chelyabinsk 454092, Russian Federation, e-mail: henkel-07@mail.ru

**Information about authors:**

Genkel V.V., <http://orcid.org/0000-0001-5902-3803>

Salashenko A.O., <http://orcid.org/0000-0003-3962-3662>

Alekseeva O.A., <http://orcid.org/0000-0002-5530-8817>

Shaposhnik I.I., <http://orcid.org/0000-0002-7731-7730>

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

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

**Acknowledgments.** We thank the head of the biochemical department, Central Research Laboratory, South-Ural State Medical University V.A. Sumerkina; junior research, Central Research Laboratory L.R. Toropova, senior laboratory assistant Ye.I. Ilyinikh for conducting laboratory research methods.

**Received** 27.09.2017

## Введение

Атеросклероз – это системное хроническое воспалительное заболевание, поражающее преимущественно артерии мышечно-эластического типа, характеризующееся аутоиммунным ответом на повреждение артериальной стенки с субинтимальным накоплением липидов, иммунокомпетентных и гладкомышечных клеток [1, 2]. Несмотря на системный характер процесса, манифестация атеросклероза в виде образования атеросклеротической бляшки (АСБ) носит фокальный характер и детерминирована гемодинамическими факторами, действующими локально [3]. Важнейшими среди них являются циркулярное напряжение сосудистой стенки (circumferential wall tension and stress), действующее перпендикулярно стенке сосуда, инициируемое артериальным давлением, а также напряжение сдвига (shear stress), направленное тангенциально и возникающее под действием на эндотелиальные клетки вязкостных сил, генерируемых движущимся потоком крови в сосуде [4]. Данные факторы посредством механотрансдукции оказывают широкий спектр эффектов, регулирующих комплекс реакций, имеющих решающее значение в процессах атерогенеза и сосудистого ремоделирования [5].

Сосудистое ремоделирование является одним из важнейших патофизиологических механизмов, детерминирующих неблагоприятные исходы гипертонической болезни (ГБ) [6, 7]. В то же время, ремоделирова-

ние артериального сегмента сосудистого русла в ответ на субинтимальную аккумуляцию липидов и пролиферацию соединительной ткани с последующим формированием атеромы является эссенциальным компонентом атеросклероза. Таким образом, артериальная гипертензия (АГ) и атеросклероз оказывают комплексное синергическое действие на ремоделирование сосудистой стенки на всех этапах сердечно-сосудистого континуума. Исследования, посвященные изучению биомеханических факторов у пациентов с АГ на различных этапах атерогенеза являются относительно редкими, что диктует необходимость проведения дальнейших клинических исследований.

**Цель исследования** – оценка показателей эндотелиальной скорости сдвига и циркулярного напряжения сосудистой стенки на участке общей сонной артерии у пациентов с ГБ в зависимости от тяжести атеросклеротического поражения периферических артерий.

## Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и на основании письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена локальным этическим комитетом.

В исследование были включены 85 пациентов с ГБ (46 мужчин и 39 женщин) в возрасте 45-65 лет. ГБ I ста-

дии диагностирована у 10 человек, II стадии – у 27, III стадии – у 48. Среди 48 пациентов с ГБ III стадии у 40 пациентов диагностирована ишемическая болезнь сердца (ИБС), осложненная хронической сердечной недостаточностью (ХСН). У 3 пациентов выявлена ИБС, у 5 – ГБ, осложненная ХСН. АГ 1-й степени диагностирована у 26 пациентов, 2-й степени – у 29, 3-й степени – у 30. Проводили клиническое обследование, сбор анамнестических данных. Оценивали уровни общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) с использованием наборов реагентов “Ольвекс Диагностикум” (Россия). Определяли креатинин с использованием наборов реагентов “Вектор-Бест” (Россия) с последующим расчетом скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле СКД-ЕРІ. Проводили дуплексное сканирование сонных артерий и артерий нижних конечностей (АНК) с оценкой толщины комплекса интима-медиа (ТКИМ) общих сонных артерий (ОСА) и общих бедренных артерий (ОБА). Оценивали гемодинамику в исследуемых артериях, наличие атеросклеротической бляшки и локальное стенозирование сосуда. При проведении дуплексного сканирования сонных артерий производили измерения, необходимые для расчета показателей эндотелиальной скорости сдвига: пиковую скорость кровотока и диастолический диаметр сосуда. Исследование проводили на цифровом ультразвуковом многофункциональном диагностическом сканере экспертного класса “Samsung Medison ЕКО7” (Япония).

Напряжение сдвига прямо пропорционально вязкости крови и скорости сдвига – градиенту скорости по направлению от сосудистой стенки к центру вдоль оси, расположенной перпендикулярно к плоскости сдвига течения крови [8]. Таким образом, скорость сдвига измеряли по формуле:

$$\text{Скорость сдвига} = \frac{4\text{-х пиковая скорость кровотока}}{\text{диаметр артерии}}$$

Циркулярное напряжение стенки определяли в соответствии с законом Лапласа [8]:

$$\text{Пиковое циркулярное напряжение} = \text{САД} \times \frac{\text{си-столический диаметр сосуда}}{2}$$

При разделении исследуемой когорты пациентов на группы использовали ультразвуковую морфологическую классификацию атеросклеротического поражения сосудистой стенки по G. Velasco и соавт., приведенную в таблице 1 [10, 11]. В соответствии с приведенной классификацией оценивали и присваивали балл каждому из четырех сосуда у конкретного пациента (область бифуркации ОСА с обеих сторон, бифуркации ОБА с обеих сторон).

Статистическую обработку проводили с использованием ПО IBM SPSS Statistics v. 22. Количественные переменные описывали следующими статистиками: числом пациентов, медианой (Me), 25 и 75 перцентилем (LQ, UQ). Для определения взаимозависимости показателей использовали корреляционный анализ Спирмена. Для оценки значимости различий между более чем двумя группами рассчитывали критерий согласия Пирсона и ранговый дисперсионный анализ Краскелла-Уоллиса с последующим апостериорным расчетом критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне ошибки  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Клиническая характеристика пациентов различных классов приведена в таблице 2.

Как видно из приведенных данных, по мере увеличения среднего возраста пациентов, степень тяжести поражения периферических сосудов и доля мужчин среди обследованных возрастает. Статистически значимо чаще встречались ИБС и ХСН, и как следствие, возрастала частота назначения лекарственных препаратов. Уровень триглицеридов был статистически значимо выше у пациентов II ( $p=0,002$ ), III ( $p=0,02$ ) и IV ( $p=0,001$ ) классов в сравнении с больными I класса. Уровень ХС ЛПВП у пациентов I класса был суще-

Таблица 1

Ультразвуковая морфологическая классификация атеросклеротического поражения сосудистой стенки (в баллах)

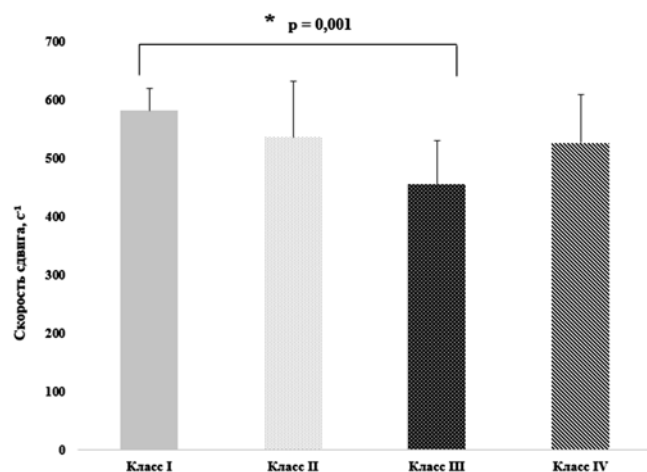
Класс	Ультразвуковая морфология	Балл
I	Норма: КИМ, адвентиция и периадвентиция четко дифференцированы. ТКИМ менее 1,0 мм.	2
II	Изменение КИМ: утолщение КИМ более 1,0 мм и/или гранулированная экзогенность КИМ.	4
III	АСБ без нарушений локальной гемодинамики: наличие АСБ в соответствии с Мангеймским консенсусом и стенозирование просвета сосуда менее 50% по диаметру.	6
IV	Стенозирующие АСБ: наличие АСБ, стенозирующих просвет сосуда более 50% по диаметру.	8

*Примечание.* КИМ – комплекс интима-медиа. ТКИМ – толщина комплекса интима-медиа. АСБ – атеросклеротическая бляшка. I – IV классы в зависимости от выраженности атеросклеротического поражения (по G. Velasco и соавт.).

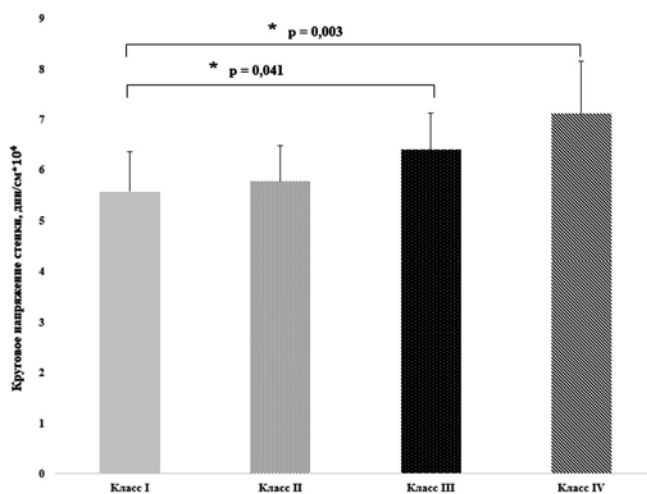


ственно выше, чем у больных II ( $p = 0,004$ ) и IV ( $p = 0,0001$ ) классов, а у больных III класса – выше, чем у IV ( $p=0,02$ ).

На рис. 1 представлены значения эндотелиальной скорости сдвига у пациентов различных классов. У пациентов I класса средние значения каротидной эндотелиальной скорости сдвига составляли  $538 \pm 123 \text{ c}^{-1}$ . У больных II класса значения скорости сдвига снижались в сравнении с пациентами первого класса –  $457 \pm 147 \text{ c}^{-1}$ , не достигая статистической значимости ( $p=0,192$ ). Среди больных III класса скорость сдвига



**Рис. 1.** Эндотелиальная скорость сдвига у пациентов различных классов. Ось абсцисс – скорость сдвига,  $\text{c}^{-1}$ ; ось ординат – классы пациентов, от I до IV.



**Рис. 2.** Динамика показателя пикового кругового напряжения стенки сосуда у пациентов разных классов.

Ось абсцисс – круговое напряжение сосудистой стенки,  $\text{дин/см}^2 * 10^4$ ; ось ординат – классы пациентов, от I до IV.

составляла  $402 \pm 107 \text{ c}^{-1}$ , что было статистически значительно меньше значений в I классе пациентов ( $p=0,001$ ). У пациентов IV класса значения скорости сдвига ( $449 \pm 181 \text{ c}^{-1}$ ) статистически значимо не отличались от пациентов других классов. Следует отметить тенденцию к ее снижению в сравнении с пациентами I класса ( $p=0,061$ ) и увеличению в сравнении с больными III класса ( $p=0,524$ ).

По данным корреляционного анализа рост числа баллов по классификации G. Velcaro и соавт. ассоциировался со снижением каротидной скорости сдвига ( $r = -0,257$ ;  $p=0,019$ ).

На рис. 2 отражена динамика показателя пикового кругового напряжения стенки сосуда по мере отягощения поражения периферических артерий.

У пациентов III класса пиковое циркулярное напряжение стенки составляло  $5,68 \pm 1,12 \text{ дин/см}^2 * 10^4$ , что было достоверно выше значений в первом классе пациентов –  $4,90 \pm 1,00 \text{ дин/см}^2 * 10^4$  ( $p=0,041$ ). Значения циркулярного напряжения стенки сосуда у пациентов в IV классе также были статистически значимо выше в сравнении с I классом –  $6,19 \pm 1,31 \text{ дин/см}^2 * 10^4$  ( $p=0,003$ ). При анализе взаимосвязи циркулярного напряжения сосудистой стенки и эндотелиальной скорости сдвига в исследуемой популяции, выявлены обратные корреляционные связи между указанными показателями ( $r = -0,289$ ;  $p=0,007$ ).

Установлена важная роль биомеханических сил и факторов на всех этапах атерогенеза. Необходимо отметить комплексное значение такого показателя как эндотелиальная скорость сдвига. Во-первых, она является адекватным суррогатным маркером напряжения сдвига, позволяющим косвенно оценивать его без прямого инвазивного определения вязкости крови [12]. Во-вторых, скорость сдвига *per se* характеризует то время, на которое поток крови и содержащиеся в нем атерогенные компоненты задерживаются над конкретным участком сосудистой стенки и, следовательно, детерминирует локальную концентрацию проатерогенных веществ и скорости протекания химических реакций в сосудистой стенке. По мере уменьшения скорости сдвига увеличивается время экспозиции атерогенных компонентов крови, что является потенциально проатерогенным фактором [13]. Имеются данные об изменении напряжения и скорости сдвига, циркулярного напряжения сосудистой стенки при атеросклеротическом поражении различных васкулярных бассейнов и ряде других патологических состояний [14, 15]. Впервые в 2016 г. опубликованы результаты проспективного исследования, в котором установлена предиктивная ценность каротидного напряжения сдвига в отношении развития атеромы

[16]. В работе, включавшей наблюдения 64 пациентов с ГБ, не получавших антигипертензивную терапию, и 16 здоровых добровольцев, было установлено, что пациенты с ГБ отличались статистически значимо меньшими значениями напряжения сдвига в сонной артерии [17]. При оценке показателей каротидного эндотелиального напряжения сдвига у пациентов с подозрением на ИБС было установлено, что пациенты с верифицированной ИБС отличались статистически значимо меньшими значениями этого показателя. Кроме того была обнаружена независимая предиктивная ценность напряжения сдвига в отношении выявления гемодинамически значимого коронарного атеросклероза [18]. В нашем исследовании впервые проведена оценка каротидной эндотелиальной скорости сдвига у пациентов с ГБ и атеросклерозом периферических артерий, степень тяжести которого оценивалась по классификации G. Velasco и соавт. В результате нами установлена обратная корреляционная связь между каротидной эндотелиальной скоростью сдвига и тяжестью атеросклеротического поражения периферических артерий. Также впервые выявлен J-образный

тренд изменения каротидной скорости сдвига в ходе развития атеросклероза периферических артерий.

У пациентов со стойким повышением АД в соответствии с законом Лапласа происходит увеличение циркулярного напряжения сосудистой стенки. Это запускает краткосрочные и долгосрочные механизмы адаптации, заключающиеся в увеличении толщины стенки артерии и изменении диаметра сосуда [19]. По данным исследований, при АГ чаще наблюдается ремоделирование с увеличением внутреннего и наружного диаметров сосудов эластического и мышечно-эластического типов [20]. Если данных компенсаторных механизмов недостаточно для устойчивого снижения АД, то происходит дальнейшее увеличение циркулярного напряжения стенки (за счет увеличения диаметра сосуда по закону Лапласа). Промежуточным итогом данных процессов является снижение скорости и напряжения сдвига, что является одним из ключевых событий в запуске и поддержании каскада атерогенеза. Так, снижение показателей скорости сдвига в нашем исследовании может быть объяснено преобладанием процессов положительного ремоделирования с после-

Таблица 2

**Клиническая характеристика пациентов различных классов**

Показатель	Класс I (n=16)	Класс II (n=10)	Класс III (n=36)	Класс IV (n=23)	χ <sup>2</sup> /Н-критерий	Всего (n=85)
Мужчины/Женщины	7/9	4/6	16/20	19/4	0,022	46/39
Возраст, лет	41 (38,2; 47,2)	57,5 (48,7; 63,7)	62,5 (58,2; 67,0)	63,5 (60,0; 69,5)	0,0001	60,0 (47,5; 67,0)
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	28 (26,5; 29,9)	32,5 (29,4; 36,2)	28,6 (25,1; 29,9)	29,7 (26,0; 32,3)	0,160	29,3 (26,2; 31,1)
Курение	4	2	9	13	0,352	28 (33%)
Стаж ГБ, лет	6 (4,7; 8,0)	10 (4,0; 18)	3,5 (2,0; 10)	12 (3,0; 20)	0,288	6,0 (3,0; 15)
Ишемическая болезнь сердца	1	4	21	17	0,0001	43 (49%)
Сахарный диабет 2 типа	3	1	8	7	0,760	19 (22%)
Хроническая сердечная недостаточность	1	5	20	19	0,0001	45 (53%)
Прием ингибиторов РААС	5	6	25	17	0,011	53 (62%)
Прием дезагрегантов	2	3	24	20	0,0001	49 (57%)
Прием бета-блокаторов	2	1	21	14	0,0001	38 (45%)
Прием статинов	1	3	19	15	0,002	38 (45%)
СКФ, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	66,6 (56,5; 76,4)	64,6 (55,7; 67,6)	62,7 (56,6; 70,5)	57,6 (50,6; 69,7)	0,124	61,6 (53,4; 70,2)
Общий холестерин, ммоль/л	5,02 (4,66; 5,43)	5,98 (5,06; 6,15)	4,92 (3,70; 5,24)	4,16 (3,49; 5,21)	0,109	5,00 (3,85; 5,62)
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,09 (2,36; 3,35)	3,90 (2,94; 4,23)	2,31 (1,57; 3,18)	2,08 (1,76; 2,61)	0,164	2,74 (1,84; 3,56)
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,58 (1,35; 1,72)	1,20 (1,11; 1,29)	1,28 (1,10; 1,64)	1,05 (0,99; 1,19)	0,001	1,30 (1,10; 1,61)
Триглицериды, ммоль/л	0,99 (0,81; 1,23)	1,90 (1,79; 2,06)	1,54 (1,09; 1,98)	1,64 (1,18; 1,98)	0,004	1,45 (1,02; 1,93)

*Примечание.* СКФ – скорость клубочковой фильтрации. n – количество наблюдений. Показатели – медиана (Me), в скобках - 25 и 75 перцентилей.

дующим изменением профиля кровотока. В дальнейшем, по мере прогрессирования атеросклероза и формирования атеросклеротической бляшки диаметр сосуда увеличивается (“глаговское” ремоделирование), что вновь способствует увеличению напряжения стенки и снижению скорости сдвига, что и наблюдалось у пациентов III класса. При переходе от начальных изменений и нестенозирующего атеросклероза к стенозирующему наблюдается тенденция к возрастанию скорости сдвига. Это может быть связано с тем, что, как показано в работах Glagov и соавт., уже при стенозе более 40% происходит переход от положительного к отрицательному ремоделированию. Однако, наблюдаемая нами тенденция у пациентов IV класса к увеличению скорости сдвига и циркулярного напряжения стенки (при неизменном АД) может свидетельствовать о том, что значимого уменьшения просвета сосуда в местах, не пораженных непосредственно атеромой, не происходит. Увеличение скорости сдвига в таком случае связано с увеличением скорости кровотока на всем протяжении сосуда. В целом, взаимодействие циркулярного напряжения стенки, напряжения и скорости сдвига может быть упрощенно представлено следующим образом: циркулярное напряжение стенки инициирует и играет значительную роль на всех этапах сосудистого ремоделирования, а напряжение и скорость сдвига имеют существенное патогенетическое значение несколько позже и выполняют роль модулятора данных процессов [21]. Наше исследование отчасти иллюстрирует описанные взаимосвязи.

### Выводы

У пациентов с различной тяжестью атеросклероза периферических артерий изменения каротидной эндотелиальной скорости сдвига носят нелинейный характер. При прогрессировании атеросклероза от начальных его проявлений до нестенозирующего процесса она снижается, затем при развитии стеноза более 50% по диаметру — отмечается ее повышение.

Снижение каротидной эндотелиальной скорости сдвига ассоциировалось с увеличением степени тяжести атеросклеротического поражения периферических артерий.

Увеличение циркулярного напряжения сосудистой стенки пропорционально нарастанию тяжести периферического атеросклероза.

Увеличение циркулярного напряжения сосудистой стенки ассоциировалось с уменьшением каротидной эндотелиальной скорости сдвига. При этом статистически значимые корреляции отмечены только у пациентов с наличием АСБ в периферических артериях.

### Литература

1. Bäck M., Hansson G.K. Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*. 2015; 12: 199–211.
2. Никифоров Н.Г., Корниенко В.Ю., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Активация макрофагов при атеросклерозе. Сообщение 1. Активация макрофагов в норме и в атеросклеротическом поражении. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 3: 128–31.
3. Brown A.J., Teng Z., Evans P.C., Gillard J.H., Samady H., Bennett M.R. Role of biomechanical forces in the natural history of coronary atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*. 2016; 13(4): 210–20.
4. Kwak B.R., Bäck M., Bochaton-Piallat M.L., Caligiuri G., Daemen M.J., Davies P.F. et al. Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications. *European Heart Journal*. 2014; 35: 3013–20.
5. Baeyens N., Schwartz M.A. Biomechanics of vascular mechanosensation and remodeling. *Mol. Biol. Cell January*. 2016; 27 (1): 7–11.
6. Остроумова О.Д., Кочетков А.И., Копченков И.И., Гусева Т.Ф., Бондарев О.В. Жесткость сосудистой стенки у пациентов с артериальной гипертензией. *Системные гипертензии*. 2015; 12(2): 43–8.
7. Васюк Ю.А., Иванова С.В., Школьник Е.Л., Котовская Ю.В., Милигин В.А., Олейников В.Э. и др. Согласованное мнение российских экспертов по оценке артериальной жесткости в клинической практике. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2016; 15(2): 4–19.
8. Shaaban A.M., Duerinckx A.J. Wall shear stress and early atherosclerosis: a review. *Am J Roentgenol*. 2000; 174(6): 1657–65.
9. Makris G.C., Nicolaides A.N., Xu X.Y., Geroulakos G. Introduction to the biomechanics of carotid plaque pathogenesis and rupture: review of the clinical evidence. *Br J Radiol*. 2010; 83(993): 729–35.
10. Belcaro G., Nicolaides A.N., Ramaswami G., Cesarone M.R., De Sanctis M., Incandela L. et al. Carotid and femoral ultrasound morphology screening and cardiovascular events in low risk subjects: a 10-year follow-up study (the CAFES-CAVE study). *Atherosclerosis*. 2001; 156(2): 379–87.
11. Monopoli D.E., Bertelli L., Sgura F.A., Politi L., Becirovic M., Iaccarino D. et al. Long term prognostic value of subclinical carotid and femoral arterial wall lesions in patients with ST-elevation-myocardial infarction having percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2013; 111(5): 649–56.
12. Parker B.A., Trehearne T.L., Meendering J.R. Pick your Poiseuille: normalizing the shear stimulus in studies of flow-mediated dilation. *J Appl Physiol*. 2009; 107(4): 1357–9.
13. Tanishita K., Yamamoto K. *Hemodynamics Influences Mass Transfer of Blood Borne Solutes. [Vascular Engineering. New Prospects of Vascular Medicine and Biology with a Multidiscipline Approach]*. Springer Japan; 2016.
14. Кузнецова А.С., Долгушина А.И., Шапошник И.И., Савочкина А.Ю., Генкель В.В., Мельников И.Ю. Изучение гемодинамики в непарных висцеральных ветвях брюшной аорты у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени. *Уральский медицинский журнал*. 2016; (1): 91–5.
15. Thondapu V., Bourantas C.V., Foin N., Jang I.K., Serruys P.W., Barlis P. Biomechanical stress in coronary atherosclerosis: emerging insights from computational modelling. *Eur Heart J*. 2017; 38(2): 81–92.
16. Carallo C., Tripolino C., De Franceschi M.S., Irace C., Xu X.Y., Gnasso A. Carotid endothelial shear stress reduction with aging is associated with plaque development in twelve years. *Atherosclerosis*. 2016; 251: 63–9.

17. Lee MY, Wu CM, Yu KH, Chu CS, Lee KT, Sheu SH, Lai WT. Association between wall shear stress and carotid atherosclerosis in patients with never treated essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2009; 22(7): 705-10.
18. Cho KI, Kim BH, Kim HS, Heo JH. Low Carotid Artery Wall Shear Stress is Associated with Significant Coronary Artery Disease in Patients with Chest Pain. *J Atheroscler Thromb*. 2016; 23(3): 297-308.
19. Chien S., Chen P.C.Y., Fung Y.C. *Autoregulation of Blood Flow. [An Introductory Text to Bioengineering. Advanced Series in Biomechanics: Volume 4]*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; 2008.
20. Матросова И.Б., Елисеева И.В., Борисова Н.А., Гусаковская Л.И., Олейников В.Э. Механизмы сосудистого ремоделирования при гипертонии и метаболическом синдроме. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2008; 1: 45-54.
21. Holzapfel G.A., Ogdan R.W. *Remodeling of Arteries in Response to Changes in their Mechanical Environment. [Biomechanics of Soft Tissue in Cardiovascular Systems. CISM courses and lectures]*. Springer-Verlag Wien; 2003.
9. Makris G.C., Nicolaides A.N., Xu X.Y., Geroulakos G. Introduction to the biomechanics of carotid plaque pathogenesis and rupture: review of the clinical evidence. *Br J Radiol*. 2010; 83(993): 729-35.
10. Belcaro G., Nicolaides A.N., Ramaswami G., Cesarone M.R., De Sanctis M., Incandela L. et al. Carotid and femoral ultrasound morphology screening and cardiovascular events in low risk subjects: a 10-year follow-up study (the CAFES-CAVE study). *Atherosclerosis*. 2001; 156(2): 379-87.
11. Monopoli D.E., Bertelli L., Sgura F.A., Politi L., Becirovic M., Iaccarino D. et al. Long term prognostic value of subclinical carotid and femoral arterial wall lesions in patients with ST-elevation-myocardial infarction having percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2013; 111(5): 649-56.
12. Parker B.A., Trehearn T.L., Meendering J.R. Pick your Poiseuille: normalizing the shear stimulus in studies of flow-mediated dilation. *J Appl Physiol*. 2009; 107(4): 1357-9.
13. Tanishita K., Yamamoto K. *Hemodynamics Influences Mass Transfer of Blood Borne Solutes. [Vascular Engineering. New Prospects of Vascular Medicine and Biology with a Multidiscipline Approach]*. Springer Japan; 2016.
14. Kuznecova A.S., Dolgushina A.I., Shaposhnik I.I., Savochkina A. Yu., Genkel V.V., Melnikov I.Yu. Research of hemodynamic in visceral branches of the abdominal aorta in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal*. 2016; 1: 91-5. (in Russian)
15. Thondapu V., Bourantas C.V., Foin N., Jang I.K., Serruys P.W., Barlis P. Biomechanical stress in coronary atherosclerosis: emerging insights from computational modelling. *Eur Heart J*. 2017; 38(2): 81-92.
16. Carallo C., Tripolino C., De Franceschi M.S., Irace C., Xu X.Y., Gnasso A. Carotid endothelial shear stress reduction with aging is associated with plaque development in twelve years. *Atherosclerosis*. 2016; 251: 63-9.

### References

1. Bäck M., Hansson G.K. Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*. 2015; 12: 199–211.
2. Nikiforov N.G., Kornienko V.Y., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Macrophage activation in atherosclerosis. Message 1: Activation of macrophages normally and in atherosclerotic lesions. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2015; 3: 128-31. (in Russian)
3. Brown A.J., Teng Z., Evans P.C., Gillard J.H., Samady H., Bennett M.R. Role of biomechanical forces in the natural history of coronary atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*. 2016; 13(4): 210-20.
4. Kwak B.R., Bäck M., Bochaton-Piallat M.L., Caligiuri G., Daemen M.J., Davies P.F. et al. Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications. *European Heart Journal*. 2014; 35: 3013–20.
5. Baeyens N., Schwartz M.A. Biomechanics of vascular mechanosensation and remodeling. *Mol. Biol. Cell January*. 2016; 27 (1): 7-11.
6. Ostroumova O.D., Kochetkov A.I., Kopchenov I.I., Guseva T.F., Bondarec O.V. The hardness of the vessel wall in patients with arterial hypertension. *Sistemnye gipertenzii*. 2015; 12 (2): 43–8. (in Russian)
7. Vasyuk Yu.A., Ivanova S.V., Shkolnik E.L., Kotovskaya Yu.V., Milyagin V.A., Oleynikov V.E., Orlova Ya.A. Consensus of Russian experts on the evaluation of arterial stiffness in clinical practice. *Kardiovaskulyarnaya Terapiya i Profilaktika*. 2016; 15(2): 4–19. (in Russian)
8. Shaaban A.M., Duerinckx A.J. Wall shear stress and early atherosclerosis: a review. *Am J Roentgenol*. 2000; 174(6): 1657-65.

### Сведения об авторах:

**Генкель Вадим Викторович**, ассистент каф. пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, e-mail: henkel-07@mail.ru;

**Салашенко Алексей Олегович**, канд. мед. наук, ассистент каф. пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, e-mail: salachenko@hotmail.com;

**Алексеева Ольга Александровна**, канд. мед. наук, ассистент каф. пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, e-mail: aloa30@mail.ru;

**Шапошник Игорь Иосифович**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, e-mail: shaposhnik@ya.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г.

## Специфичная токсичность кальций-фосфатных бионов для культур венозных и артериальных эндотелиальных клеток человека

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,  
650002, г. Кемерово, Россия, Сосновый бульвар, д. 6

**Цель исследования** – оценка токсичности кальций-фосфатных бионов (КФБ) и магний-фосфатных бионов (МФБ) для культур эндотелиальных клеток. **Методика.** Эндотелиотоксичность бионов изучена при помощи добавления равных концентраций МФБ или КФБ к: 1) разреженным или конфлюэнтным культурам immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 с последующим культивированием в течение 24 ч или 4 ч соответственно; 2) конфлюэнтным культурам коммерческих первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии человека с последующим культивированием в течение 24 ч. Эндотелиотоксические эффекты бионов оценивали при помощи сочетанного окрашивания клеток флуоресцентными красителями Hoechst 33342 и бромистым этидием, а также посредством колориметрического теста. Кроме того, методом проточной цитометрии оценивали пути и стадии гибели клеток вышеуказанных культур. **Результаты.** В отличие от МФБ, КФБ индуцировали гибель эндотелиальных клеток всех 3 линий путем апоптоза. Устойчивость культур к токсическому действию КФБ определялась степенью их конфлюэнтности (конфлюэнтные культуры более устойчивы чем разреженные) и типом клеточной линии (эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии продемонстрировали большую устойчивость в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии). **Заключение.** Токсичность КФБ для культур эндотелиальных клеток специфична, то есть определяется их специфическим минеральным составом, а не общей для всех типов бионов корпускулярной природой. Добавление КФБ к конфлюэнтным культурам первичных артериальных эндотелиальных клеток и к immortalized венозным эндотелиальным клеткам вызывало их гибель, при этом экспозиция МФБ не оказывает значимого токсического действия. Эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии менее чувствительны к воздействию КФБ в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии человека.

**Ключевые слова:** атеросклероз, триггеры, бионы, гидроксипатит, эндотелиальные клетки, эндотелий, цитотоксичность, апоптоз.

**Для цитирования:** Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Специфичная токсичность кальций-фосфатных бионов для культур венозных и артериальных эндотелиальных клеток человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 53-61.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.01.53-61

**Для корреспонденции:** Шишкова Дарья Кирилловна, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,  
e-mail: shishkovadk@gmail.com

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках научного проекта № 17-04-00570 «Оценка специфичности токсического действия кальций-фосфатных бионов на эндотелий».

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

Поступила 16.02.2018

Shishkova D.K., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G.

## SPECIFIC TOXICITY OF CALCIUM PHOSPHATE BIONS FOR HUMAN VENOUS AND ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6 Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation

**Aim.** To compare toxicity of calcium phosphate bions (CPB) and magnesium phosphate bions (MPB) for endothelial cells. **Methods.** To assess endothelial toxicity of the bions, we first added equal concentrations of either MPB or CPB to: 1) non-confluent or confluent cultures of immortalized human venous endothelial cells EA.hy 926 with the exposure time of 24 h or 4 h, respectively; 2) confluent cultures of commercially available primary human coronary artery and internal thoracic artery endothelial cells, with the exposure time of 24 h. Endothelial toxicity was then evaluated by combined Hoechst 33342 and ethidium bromide staining following

fluorescence microscopy and by colorimetric cytotoxicity assay. In addition, we attempted to determine the pathway of bion-induced cell death utilizing flow cytometry. **Results.** In contrast to the MPB, CPB induced apoptosis of all studied endothelial cell lines. Resistance of endothelial cells to the CPB was defined by their confluence (confluent cultures demonstrated higher resistance), and cell type (internal thoracic artery endothelial cells were more resistant to the CPB as compared to the coronary artery endothelial cells). **Conclusions.** Endothelial toxicity of the CPB is defined by their specific mineral composition but not by their corpuscular nature, which is common for all nanoparticles. Addition of the CPB to the confluent cultures of primary human arterial cells and to immortalized human venous endothelial cells evoked their death. On the contrary, exposure to the MPB did not cause any toxic effects. Human internal thoracic artery endothelial cells are more resistant to the CPB in comparison with coronary artery endothelial cells.

**Keywords:** atherosclerosis, triggers, bions, hydroxyapatite, endothelial cells, endothelium, cytotoxicity, apoptosis.

**For citation:** Shishkova D.K., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G. SPECIFIC TOXICITY OF CALCIUM PHOSPHATE BIONS FOR HUMAN VENOUS AND ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1): 53-61. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.53-61

**For correspondence:** *Daria K. Shishkova*, Master of Sciences, Junior Researcher, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, e-mail: shishkovadk@gmail.com

**Acknowledgements.** The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research according to the research project № 17-04-00570.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest. The article was not published or submitted for publication elsewhere.

**Information about authors:**

Shishkova D.K., <http://orcid.org/0000-0002-1518-3888>

Velikanova E.A., <http://orcid.org/0000-0002-1079-1956>

Matveeva V.G., <https://orcid.org/0000-0002-4146-3373>

Kudryavtseva Yu.A., <http://orcid.org/0000-0002-6134-7468>

Kutikhin A.G., <http://orcid.org/0000-0001-8679-4857>

**Received** 16.02.2018

## Введение

Из клинических исследований достаточно давно известно, что как повышенный уровень кальция и фосфора [1-3], так и сниженный уровень антикальцифицирующих белков фетуина-А и альбумина в крови [4, 5] ассоциирован с атеросклерозом и его клиническими проявлениями (ишемической болезнью сердца, острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу и заболеваниями периферических артерий). Одним из механизмов объяснения такой связи может быть формирование обладающих эндотелиотоксическим действием кальций-фосфатных бионов (КФБ), которые представляют собой сферические частицы губчатой структуры диаметром  $\leq 500$  нм, состоящие из гидроксиапатита, карбонат-гидроксиапатита и ряда белков, в том числе альбумина и фетуина-А [6, 7]. КФБ образуются в крови при ее перенасыщении ионами кальция и фосфора и препятствуют прямой кальцификации сосудов, тем самым участвуя в регуляции фосфорнокальциевого гомеостаза [6, 7]. Вместе с тем было показано, что КФБ выделяются из 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека и после своего формирования интернализируются эндотелиальными клетками, индуцируя ими секрецию провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8, запуская апоптоз по внутреннему пути и вызывая развитие гипертрофии интимы брюшной аорты крыс [7]. Также было продемонстрировано, что КФБ могут быть синтезированы искусственно с целью

экспериментального моделирования эндотелиотоксичности и атеросклероза [6, 7].

Вместе с тем остается неизвестным, чем именно определяется эндотелиотоксичность КФБ: их специфическим химическим составом или же корпускулярной природой, общей для всех типов бионов. Для ответа на данный вопрос были искусственно синтезированы магний-фосфатные бионы (МФБ), схожие с КФБ физическими (форма и размерность) и химическими (элементный состав, функциональные группы, органический состав) параметрами, однако состоящие не из характерного для КФБ гидроксиапатита, а из магния фосфат гидрата (собственные неопубликованные данные). При этом МФБ не способны образовываться в организме человека, так как для их синтеза необходима несовместимая с жизнью концентрация магния, превышающая норму в 10-20 раз [6]. Таким образом, можно предположить, что МФБ подходят для оценки специфичности токсического действия КФБ в эксперименте.

Цель исследования – сравнение токсичности МФБ и КФБ для культур эндотелиальных клеток.

## Методика

*Искусственный синтез МФБ и КФБ.* МФБ синтезированы при помощи последовательного добавления 100 мкл 0,2М  $MgCl_2$  (Sigma-Aldrich) и 100 мкл 0,2М  $Na_2HPO_4$  (Sigma-Aldrich) к 700 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (Dulbecco's Modified

Eagle's Medium, DMEM, Gibco), содержащей 100 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (fetal calf serum, Gibco). КФБ синтезированы путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5М CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) и 21,5 мкл 0,2М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> к 1319 мкл среды DMEM, содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. Контроль pH осуществляли путем предварительного добавления 5 мл буфера HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфонокислота, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid, Gibco) к 495 мл культуральной среды DMEM (финальная концентрация HEPES-буфера в среде – 1%).

После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf) с реагентами для синтеза бионов инкубировали при +37°C, 5% CO<sub>2</sub> и высокой влажности (МСО-18АІС, Sanyo) в течение 24 ч с дальнейшим центрифугированием при 200,000 x g и 4°C в течение 1 ч (Optima MAX-XP, Beckman Coulter). С целью получения рабочего раствора для добавления к клеткам осадок КФБ растворяли в 300 мкл, а осадок МФБ – в 500 мкл однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ, 1X phosphate buffered saline, Gibco), что позволяло достичь мутности суспензии в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), являющейся минимально измеримой и патофизиологически релевантной концентрацией бионов в растворе.

Все вышеуказанные процедуры проводили в стерильных условиях. Измерение оптической плотности проводили на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» (АИФР-01, Пикон) при длине волны 650 нм (мутность суспензии 0,5 МкФ соответствовала значениям оптической плотности 0,08 – 0,10).

*Экспозиция эндотелиальных клеток МФБ и КФБ.* Для экспериментов была использована культура иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 предоставленная Dr. Cora-Jean S. Edgell (University of North Carolina at Chapel Hill, США), а также коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (human coronary artery endothelial cells, HCAEC) и первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека (human internal thoracic endothelial cells, HITAEC) (Cell Applications).

Клеточная линия EA.hy 926 является гибридомой, полученной путем слияния эндотелиальных клеток пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) с клетками аденокарциномы легкого человека линии A549. Гибридома сохраняет основные морфологические и функциональные особенности венозных эндотелиальных клеток человека [8]. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco), содержа-

щей 10% фетальной телячьей сыворотки, 2% гипоксантина-аминоптерина-тимидина (Gibco), 1% HEPES-буфера (Gibco), 1% L-глутамин-пенициллина-стрептомицина (Gibco) и 0,4% амфотерицина В (Gibco).

Согласно информации поставщика (Cell Applications), первичные эндотелиальные клетки человека получены из здоровых артерий доноров (HCAEC – мужчина, 27 лет; HITAEC – мужчина, 50 лет) с криоконсервацией на 2-м пассаже (500,000 клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium (Cell Applications), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида (dimethyl sulfoxide, DMSO)). Для проведения эксперимента клетки размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications). Пересев производили по достижении 80% конfluence. После 4-5 пассажей клетки рассевали в лунки 6-луночного планшета для проведения дальнейших экспериментов. Все эксперименты с клетками проводили в стерильных условиях при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и высокой влажности (МСО-18АІС, Sanyo).

Токсичность бионов для культур эндотелиальных клеток человека изучали при помощи добавления суспензии МФБ или КФБ (100 мкл на лунку 6-луночного планшета или 10 мкл на лунку 96-луночного планшета в зависимости от эксперимента; мутность суспензии 0,5 МкФ) к: 1) клеточным культурам линии EA.hy 926 (около 40% конfluence в культуральной посуде и культивирование в течение 24 ч, либо около 90% конfluence в культуральной посуде и культивирование в течение 4 ч); 2) вышеописанным первичным культурам артериальных эндотелиальных клеток (около 85% конfluence в культуральной посуде, культивирование в течение 24 ч). В качестве контрольной группы использовали те же линии клеток, к которым вместо бионов в аналогичном объеме добавляли стерильный ФСБ с последующим аналогичным временем культивирования.

Цитотоксичность бионов оценивали при помощи колориметрического теста (набор ab112118, 24 лунки 96-луночного планшета на группу) и сочетанного окрашивания клеток флюоресцентными красителями Hoechst 33342 (2 мкл/мл) и бромистым этидием (10 мкл/мл) с дальнейшей фазово-контрастной и флюоресцентной микроскопией. При экспериментах с клетками линии EA.hy 926 количество исследуемых лунок 6-луночного планшета на группу составляло 21, при экспериментах с первичными артериальными эндотелиальными клетками – 11 (подсчитывались клетки в 3 полях зрения на лунку). Посредством проточной цитометрии (набор ab14085, 8 лунок 6-луночного планшета на группу)

оценивали стадию и путь клеточной смерти (ранний апоптоз — аннексин V-положительные и пропидия иодид-отрицательные клетки, поздний апоптоз — аннексин V- и пропидия иодид-положительные клетки и некроз — аннексин V-отрицательные и пропидия иодид-положительные клетки) под воздействием бионов.

Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Межгрупповое сравнение проводили посредством однофакторного дисперсионного анализа, в случае выявления статистически значимых различий между группами осуществляли последующее попарное сравнение групп с использованием критерия Тьюки. Различия между группами признавали статистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу  $p \leq 0,05$ .

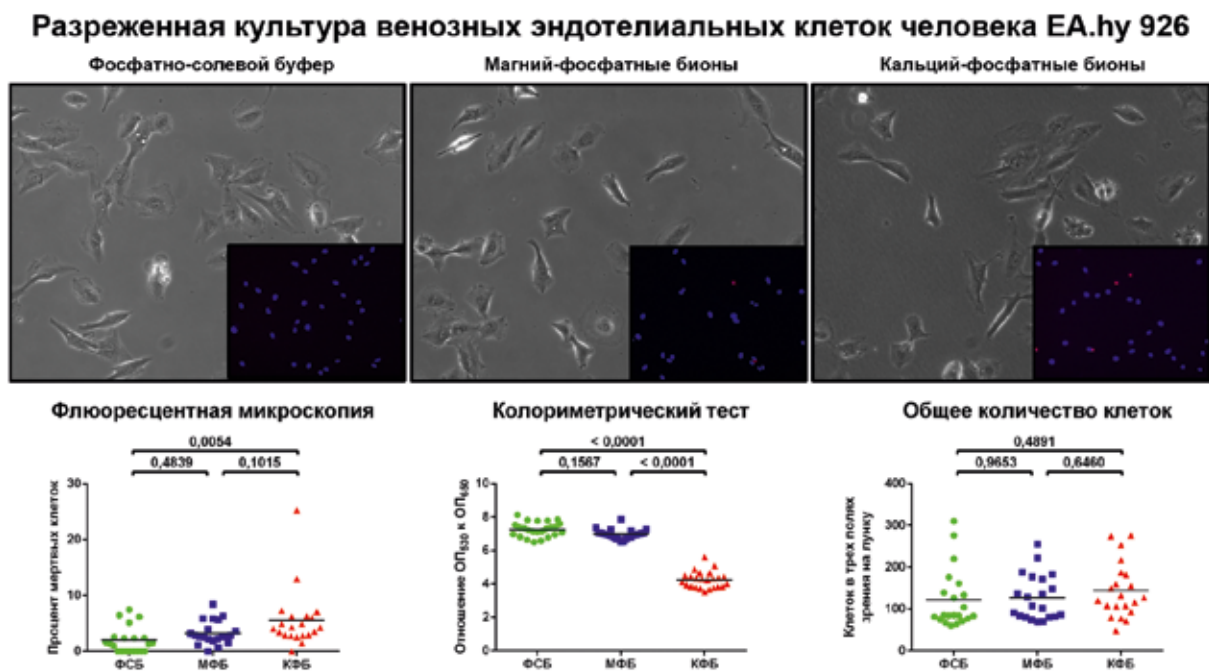
### Результаты и обсуждение

При сочетанном окрашивании Hoechst 33342 (живые клетки) и бромистым этидием (мертвые клетки) показано методом фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии, что экспозиция КФБ приводит к

увеличению доли мертвых клеток линии EA.hy 926 в сравнении с экспозицией МФБ как на разреженной, так и на конфлюэнтной модели культивирования (рис. 1 и 2). Аналогичные результаты получены посредством колориметрического теста на цитотоксичность. При этом общее число живых и мертвых клеток EA.hy 926 при экспозиции КФБ в сравнении с контрольными культурами, независимо от модели культивирования, значимо не отличалось. Относительное и абсолютное количество жизнеспособных клеток EA.hy 926 при экспозиции МФБ статически значимо не отличалось от такового в контрольных культурах (рис. 1 и 2).

В процессе сравнения токсичности бионов для культур клеток EA.hy 926 различной конфлюэнтности выявлено, что конфлюэнтная культура более устойчива к экспозиции бионами по сравнению с разреженной (рис. 3). Поэтому, для увеличения надежности результатов, последующие эксперименты по оценке токсичности бионов для первичных артериальных эндотелиальных клеток человека проводили именно на их конфлюэнтных культурах.

Так же, как и в случае с культурами клеток линии EA.hy 926, посредством фазово-контрастной и флюо-



**Рис. 1.** Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для разреженных культур иммортализованных венных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. Синяя окраска – Hoechst 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки), увеличение x200. Оптическая плотность на длине волны 530 нм ( $OP_{530}$ ) отражает нормальную жизнеспособность клеток, оптическая плотность на длине волны 650 нм ( $OP_{650}$ ) – сниженную. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 6-луночного планшета (флуоресцентная микроскопия, подсчет общего количества клеток) или 96-луночного планшета (колориметрический тест).



ресцентной микроскопии, а также при помощи колориметрического теста показано, что КФБ вызывают гибель первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии человека (рис. 4 и 5). В то же время экспозиция МФБ не оказывает значимого токсического эффекта на эндотелиальные клетки коронарной артерии (рис. 4) и внутренней грудной артерии (рис. 5).

При сравнении токсичности КФБ для эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии выявлено, что КФБ существенно более токсичны для клеток коронарной артерии в сравнении с клетками внутренней грудной артерии (рис. 6).

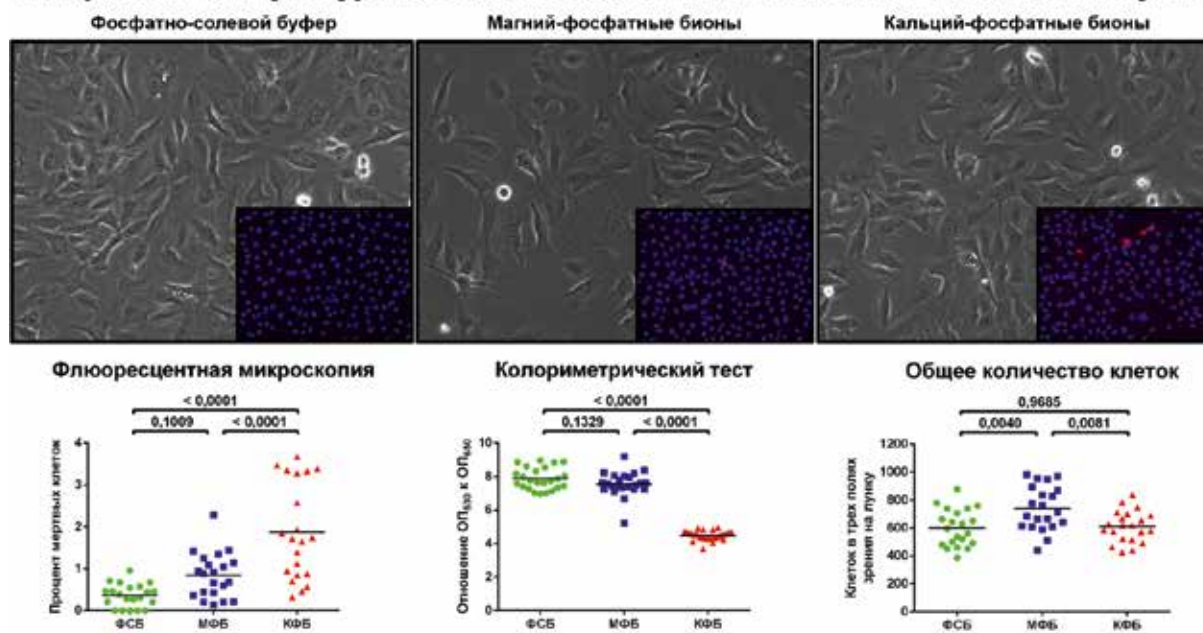
Далее, с использованием проточной цитометрии, были изучены пути и стадии клеточной смерти под воздействием КФБ. Обнаружено, что все 3 линии эндотелиальных клеток в результате токсических эффектов КФБ погибали путем апоптоза, при этом после 24 ч экспозиции детектирован как ранний апоптоз (отражаемый аннексин V-положительными клетками и пропидия иодид-отрицательными клетками), так и поздний апоптоз (отражаемый аннексин V- и пропидия иодид-положительными клетками). При этом процент гибнущих

некрозом клеток был на порядок меньше, чем процент клеток, подвергающихся апоптозу, и не превышал одного процента при всех измерениях (рис. 7).

Проведенные ранее исследования ряда авторов показали цитотоксическое [7, 9-11], в частности, эндотелиотоксическое [7] действие КФБ. Однако природа токсического действия КФБ на эндотелиальные клетки неизвестна и может быть связана как с их специфическим минеральным составом (гидроксиапатит и карбонат-гидроксиапатит), так и с корпускулярной структурой, общей для всех бионов. Определение механизмов эндотелиотоксичности КФБ имеет значение как для разработки новых средств антикальцифицирующей терапии, которая может быть применена в профилактике и лечении атеросклероза [12, 13], так и для нанотоксикологии в связи с активно разрабатываемыми наноразмерными средствами направленной доставки лекарственных препаратов [14].

В качестве группы сравнения для оценки специфичности эндотелиотоксического действия КФБ были искусственно синтезированы МФБ, имеющие аналогичные форму, диаметр, элементный состав (за исключением наличия магния икратно более низкого

## Конфлюэнтная культура венозных эндотелиальных клеток человека EA.hy 926



**Рис. 2.** Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для конфлюэнтных культур immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. Синяя окраска – Hoechst 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки), увеличение  $\times 200$ . Оптическая плотность на длине волны 530 нм ( $ОП_{530}$ ) отражает нормальную жизнеспособность клеток, оптическая плотность на длине волны 650 нм ( $ОП_{650}$ ) – сниженную. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 6-луночного планшета (флуоресцентная микроскопия, подсчет общего количества клеток) или 96-луночного планшета (колориметрический тест).

содержания кальция), функциональные группы и органический состав, однако характеризующиеся другим основным химическим соединением (магния фосфат гидрат вместо гидроксиапатита) (собственные неопубликованные данные).

Поскольку иммортализованные венозные эндотелиальные клетки широкодоступны и относительно просты в культивировании, начальные эксперименты по изучению специфичности эндотелиотоксичности КФБ проводили на линии EA.hy 926. Так как высокая конфлюэнтность культуры эндотелиальных клеток определяет ее устойчивость к повреждающим агентам [15–17], исследована токсичность бионов на 2 моделях *in vitro*: разреженной, где клетки культивировались до 40% конфлюэнтности и далее экспонировались бионами в течение 24 ч, и конфлюэнтной, где клетки культивировались до 90% конфлюэнтности и затем экспонировались бионами в течение 4 ч. Как и ожидалось, конфлюэнтные культуры эндотелиальных клеток показали большую устойчивость к экспозиции бионами по сравнению с разреженными, тем не менее на обеих моделях культивирования зафиксирована повышенная гибель клеток под воздействием КФБ в сравнении с МФБ. На выявленные различия в выраженности ток-

### Сравнительная цитотоксичность

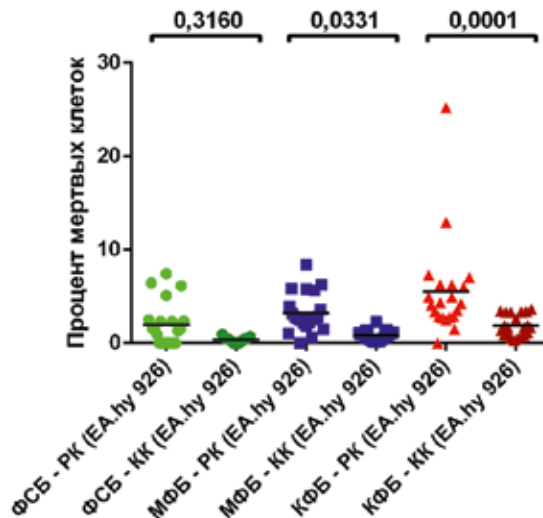


Рис. 3. Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для разреженных (РК) и конфлюэнтных (КК) культур иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. ФСБ – фосфатно-солевой буфер. Каждая точка на графике соответствует одной лунке 6-луночного планшета.

### Первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека

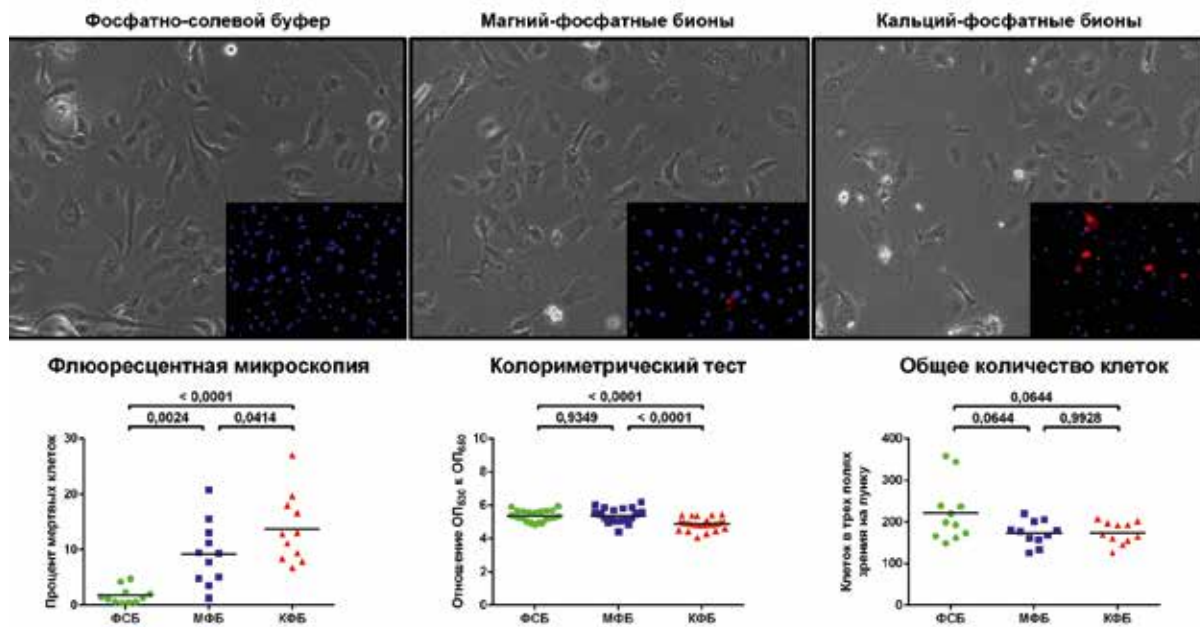
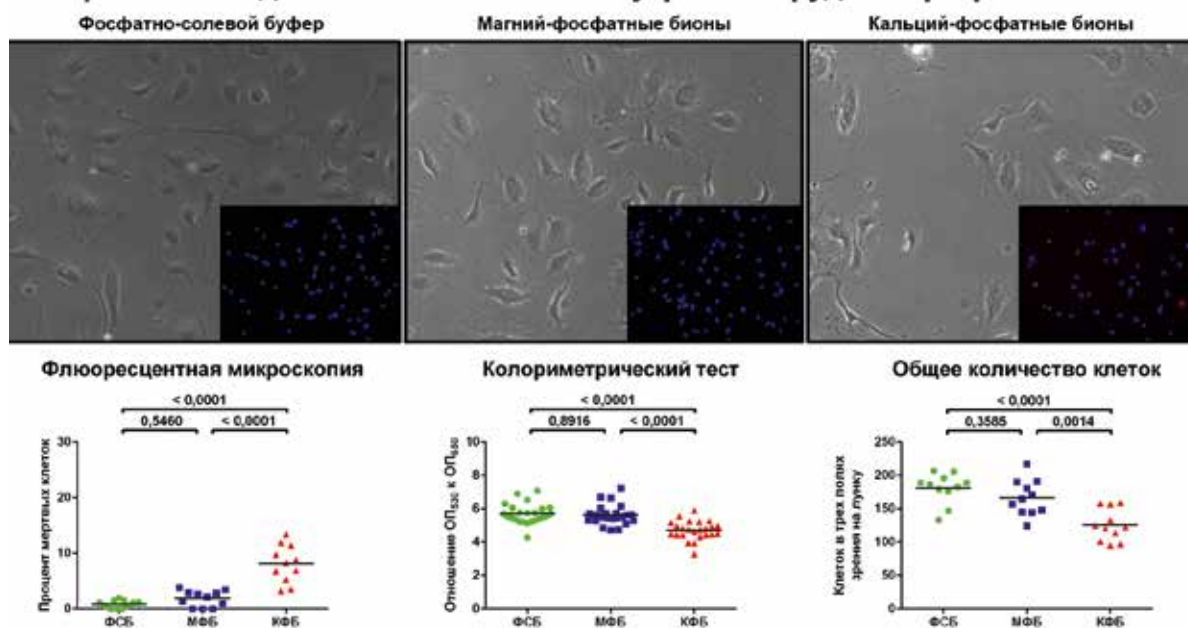


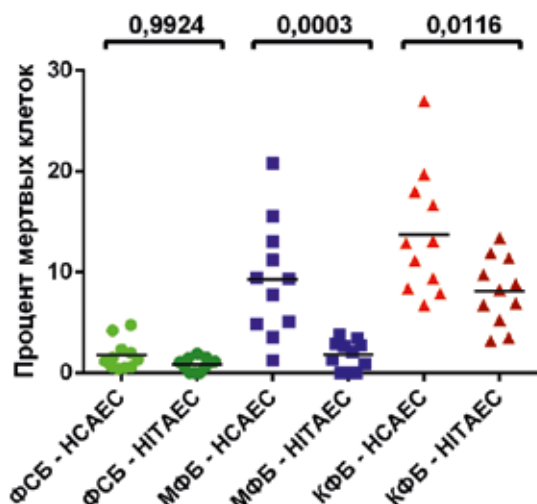
Рис. 4. Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для конфлюэнтных культур первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека. Синяя окраска – Hoechst 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки), увеличение x200. Оптическая плотность на длине волны 530 нм ( $OP_{530}$ ) отражает нормальную жизнеспособность клеток, оптическая плотность на длине волны 650 нм ( $OP_{650}$ ) – сниженную. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 96-луночного планшета (флюоресцентная микроскопия, подсчет общего количества клеток) или 96-луночного планшета (колориметрический тест).

### Первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека



**Рис. 5.** Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для конфлюэнтных культур первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека. Синяя окраска – Hoechst 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки), увеличение x200. Оптическая плотность на длине волны 530 нм ( $OP_{530}$ ) отражает нормальную жизнеспособность клеток, оптическая плотность на длине волны 650 нм ( $OP_{650}$ ) – сниженную. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 6-луночного планшета (флуоресцентная микроскопия, подсчет общего количества клеток) или 96-луночного планшета (колориметрический тест).

### Сравнительная цитотоксичность



**Рис. 6.** Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для конфлюэнтных культур первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC) и внутренней грудной артерии (HTAEC) человека, ФСБ – фосфатно-солевой буфер. Каждая точка на графике соответствует одной лунке 6-луночного планшета.

сических эффектов КФБ между двумя моделями теоретически могло также повлиять разное время экспозиции (24 ч в случае с разреженной моделью и 4 ч в случае с конфлюэнтной). Такой экспериментальный протокол был обусловлен тем, что иммортализованные по гибридной технологии клетки линии EA.hy 926 характеризуются быстрой пролиферацией и при культивировании с 90% конфлюэнтностью в течение 24 ч начинают погибать от гиперконфлюэнтности (7-8% мертвых клеток в контрольной культуре по данным проточной цитометрии, собственные наблюдения авторов), а не только от воздействия повреждающего фактора.

Известно, что физиология эндотелия различных сосудов (в частности, вен и артерий) существенно отличается [18-20]. Поскольку атеросклероз представляет собой патологию именно артериального русла, для надлежащего подтверждения эндотелиотоксического действия бионов необходимо проведение экспериментов на первичных артериальных эндотелиальных клетках, конфлюэнтные культуры которых к тому же могут быть экспонированы бионами в течение относительно длительного времени в связи с их достаточно медленным ростом. Так как различные артерии в силу своих анатомических и физиологических особенностей характери-

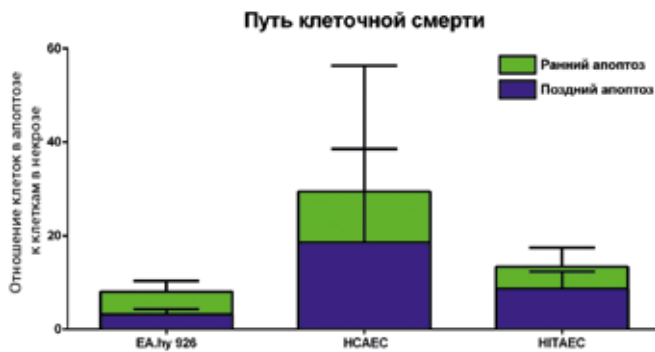
зуются разной предрасположенностью к развитию атеросклероза [21-23], для анализа токсичности бионов для артериальных эндотелиальных клеток были выбраны 2 клеточных линии: эндотелиальные клетки коронарной артерии человека, которая поражается атеросклерозом достаточно часто [21], и эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека, устойчивой к развитию атеросклероза [22, 23].

Как и в случае с клетками линии EA.hy 926, добавление КФБ к конфлоэнтным культурам первичных артериальных эндотелиальных клеток вызывало их гибель, при этом МФБ не оказывали значимого токсического действия. Эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии имели меньшую чувствительность к воздействию КФБ в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии, что может быть вызвано повышенной экспрессией эндотелиальной синтазы оксида азота и, соответственно, повышенным выделением ими монооксида азота (NO) [24-26], который обладает выраженным сосудорасширяющим и атеропротективным действием, а также препятствует развитию тромбоза [27, 28].

Гибель эндотелиальных клеток под воздействием различных повреждающих факторов может происходить по различным механизмам, включая апоптоз [29] и некроз [30]. Исследование путей и стадий смерти immortalized венозных и первичных артериальных эндотелиальных клеток под воздействием КФБ методом проточной цитометрии выявило клетки, находящиеся в состоянии как раннего, так и позднего апоптоза, однако практически не было обнаружено клеток, погибающих путем некроза, что согласуется с полученными нами ранее результатами [7].

Дальнейшие эксперименты должны быть направлены на расшифровку механизмов эндотелиотоксичности КФБ на субклеточном уровне. Основываясь на имеющихся данных об интернализации КФБ эндотелиальными клетками [7], можно предположить 2 возможных механизма: 1) прямой механический разрыв лизосом под воздействием нерастворенных кристаллов гидроксиапатита; 2) нарушение осмотического баланса между лизосомами и цитоплазмой вследствие массивного выделения в лизосомальную среду ионов кальция и фосфора при растворении КФБ, что ведет к поступлению в лизосомы воды по осмотическому градиенту с дальнейшим перерастяжением и разрывом лизосом.

Таким образом, токсичность КФБ для культур эндотелиальных клеток специфична, то есть определяется их специфическим минеральным составом (гидроксиапатит и карбонат-гидроксиапатит), а не общей для всех типов бионов корпускулярной природой. Добавление КФБ к конфлоэнтным культурам первичных артериальных и к immortalized венозным эндоте-



**Рис. 7.** Оценка путей и стадий клеточной смерти под воздействием кальций-фосфатных бионов (КФБ) на культуры immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC) и внутренней грудной артерии (HITAEC) человека. Ранний апоптоз – аннексин V-положительные и пропидия иодид-отрицательные клетки, поздний апоптоз – аннексин V- и пропидия иодид-положительные клетки.

лиальным клеткам вызывало их гибель, при этом экспозиция МФБ не оказывала значимого токсического действия. Эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии были менее чувствительны к воздействию КФБ в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии человека.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lind L., Skarfors E., Berglund L., Lithell H., Ljunghall S. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years. *J. Clin. Epidemiol.* 1997; 50(8): 967-73. doi: 10.1016/S0895-4356(97)00104-2.
- Foley R.N., Collins A.J., Ishani A., Kalra P.A. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am. Heart J.* 2008; 156(3): 556-63. doi: 10.1016/j.ahj.2008.05.016.
- Larsson T.E., Olauson H., Hagström E., Ingelsson E., Arnlöv J., Lind L. et al. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30(2): 333-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.196675.
- Danesh J., Collins R., Appleby P., Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA.* 1998; 279(18): 1477-82. doi: 10.1001/jama.279.18.1477.
- Sun Z.L., Xie Q.Y., Guo G.L., Ma K., Huang Y.Y. Serum fetuin-A levels in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 691540. doi: 10.1155/2014/691540.
- Wu C.Y., Young L., Young D., Martel J., Young J.D. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One.* 2013; 8(9): e75501. doi: 10.1371/journal.pone.0075501.
- Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamdiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G. et al. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in

- anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci. Rep.* 2016; 6: 27255. doi: 10.1038/srep27255.
8. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983; 80(12): 3734-7.
  9. Aghagolzadeh P., Bachtler M., Bijarnia R., Jackson C., Smith E.R., Odermatt A. et al. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Atherosclerosis.* 2016; 251: 404-14. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044.
  10. Smith E.R., Hanssen E., McMahon L.P., Holt S.G. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One.* 2013; 8(4): e60904. doi: 10.1371/journal.pone.0060904.
  11. Peng H.H., Wu C.Y., Young D., Martel J., Young A., Ojcius D.M. et al. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. *Small.* 2013; 9(13): 2297-307. doi: 10.1002/smll.201202270.
  12. Escolar E., Lamas G.A., Mark D.B., Boineau R., Goertz C., Rosenberg Y. et al. The effect of an EDTA-based chelation regimen on patients with diabetes mellitus and prior myocardial infarction in the Trial to Assess Chelation Therapy (TACT). *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes.* 2014; 7(1): 15-24. doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.113.000663.
  13. Peguero J.G., Arenas I., Lamas GA. Chelation therapy and cardiovascular disease: connecting scientific silos to benefit cardiac patients. *Trends Cardiovasc. Med.* 2014; 24(6): 232-40. doi: 10.1016/j.tcm.2014.06.002.
  14. Blau R., Krivitsky A., Epshtein Y., Satchi-Fainaro R. Are nanotheranostics and nanodiagnosics-guided drug delivery stepping stones towards precision medicine? *Drug Resist. Updat.* 2016; 27: 39-58. doi: 10.1016/j.drug.2016.06.003.
  15. Nguyen L.K., Yee R.W., Sigler S.C., Ye H.S. Use of in vitro models of bovine corneal endothelial cells to determine the relative toxicity of viscoelastic agents. *J. Cataract Refract. Surg.* 1992; 18(1): 7-13.
  16. Rauen U., Noll T., Piper H.M., Lauchart W., Becker H.D., De Groot H. Endothelial cell toxicity of preservation solutions: comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state. *Cryobiology.* 1994; 31(2): 144-53.
  17. van Setten P.A., van Hinsbergh V.W., van der Velden T.J., van de Kar N.C., Vermeer M., Mahan J.D. et al. Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int.* 1997; 51(4): 1245-56.
  18. Aitsebaomo J., Portbury A.L., Schisler J.C., Patterson C. Brothers and sisters: molecular insights into arterial-venous heterogeneity. *Circ. Res.* 2008; 103(9): 929-39. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184937.
  19. Atkins G.B., Jain M.K., Hamik A. Endothelial differentiation: molecular mechanisms of specification and heterogeneity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31(7): 1476-84. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.228999.
  20. Hauser S., Jung F., Pietzsch J. Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research. *Trends Biotechnol.* 2017; 35(3): 265-77. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.09.007.
  21. Brown R.A., Shantsila E., Varma C., Lip G.Y. Current Understanding of Atherogenesis. *Am. J. Med.* 2017; 130(3): 268-82. doi: 10.1016/j.amjmed.2016.10.022.
  22. Otsuka F., Yahagi K., Sakakura K., Virmani R. Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis? *Ann. Cardiothorac. Surg.* 2013; 2(4): 519-26. doi: 10.3978/j.issn.2225-319X.2013.07.06.
  23. Perrotta I., Sciangula A., Concistrè G., Mazzulla S., Aquila S., Agnino A. Internal mammary artery atherosclerosis: an ultrastructural study of two cases. *Ultrastruct. Pathol.* 2014; 38(3): 199-203. doi: 10.3109/01913123.2013.868568.
  24. He G.W., Liu Z.G. Comparison of nitric oxide release and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization between human radial and internal mammary arteries. *Circulation.* 2001; 104(12 Suppl 1): I344-9. doi: 10.1161/hc37t1.094930.
  25. Gaudino M., Toesca A., Maggiano N., Pragliola C., Possati G. Localization of nitric oxide synthase type III in the internal thoracic and radial arteries and the great saphenous vein: a comparative immunohistochemical study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003; 125(6): 1510-5. doi: 10.1016/S0022-5223(03)00029-1.
  26. He G.W., Fan L., Grove K.L., Furnary A., Yang Q. Expression and function of endothelial nitric oxide synthase messenger RNA and protein are higher in internal mammary than in radial arteries. *Ann. Thorac. Surg.* 2011; 92(3): 845-50. doi: 10.1016/j.athoracsurg.2011.04.063.
  27. Walford G., Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1(10): 2112-8. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00345.x.
  28. Vanhoutte P.M., Zhao Y., Xu A., Leung S.W. Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ. Res.* 2016; 119(2): 375-96. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306531.
  29. Chen J., Mehta J.L., Haider N., Zhang X., Narula J., Li D. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells. *Circ. Res.* 2004; 94(3): 370-6. doi: 10.1161/01.RES.0000113782.07824.BE.
  30. Vissers M.C., Carr A.C., Winterbour C.C. Fatty acid chlorohydrins and bromohydrins are cytotoxic to human endothelial cells. *Redox Rep.* 2001; 6(1): 49-55. doi: 10.1179/135100001101536030.

#### Сведения об авторах:

**Шшишкова Дарья Кирилловна**, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: shishkovadk@gmail.com;

**Великанова Елена Анатольевна**, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: velikanova\_ea@mail.ru;

**Матвеева Вера Геннадьевна**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточных технологий отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: matveeva\_vg@mail.ru;

**Кудрявцева Юлия Александровна**, доктор биол. наук, зав. отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: kudrua@kemcardio.ru;

**Кутихин Антон Геннадьевич**, канд. мед. наук, зав. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.36-089-092.9-06:616.12+547.93

Ермолаев П.А.<sup>1,2</sup>, Храмых Т.П.<sup>2</sup>, Барская Л.О.<sup>2</sup>

## Роль холемии в развитии кардиодепрессии после субтотальной резекции печени у крыс

<sup>1</sup> БУЗОО «Областная клиническая больница»,  
644012, г. Омск, Россия, ул. Березовая, д. 3;

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
644099, г. Омск, Россия, ул. Ленина, д. 12

**Цель** — оценить роль холемии в генезе миокардиальной дисфункции после субтотальной резекции печени у крыс. **Методика.** Эксперименты выполнены на 48 беспородных белых крысах-самцах. 38 животным проводили субтотальную атипичную резекцию 80% печени оригинальным способом, 10 интактных животных составили контрольную группу. Определение общей концентрации желчных кислот в сыворотке крови проводили энзиматическим колориметрическим методом у интактных животных и в 1-е, 3-и и 7-е сут после резекции печени. Прямую оценку сократительной функции и метаболизма миокарда интактных животных проводили на спонтанно сокращающихся изолированных сердцах. При перфузии сердец с добавлением в перфузат желчи, рассчитывали комплекс силовых и скоростных показателей сократимости, определяли содержание глюкозы, лактата, активность аспаратаминотрансферазы в коронарном протоке. **Результаты.** Выявлено повышение общего содержания желчных кислот в сыворотке крови оперированных животных. Добавление желчи в раствор для перфузии изолированных сердец вызывало развитие брадикардии, снижение силовых и скоростных показателей сократительной функции. При этом происходило увеличение потребления глюкозы, выделения лактата и аспаратаминотрансферазы в коронарный перфузат. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о значимой роли холемии, развивающейся после субтотальной резекции печени, в генезе функционально-метаболических нарушений в миокарде.

**Ключевые слова:** резекция печени; изолированное сердце; холемия; кардиодепрессия.

**Для цитирования:** Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Барская Л.О. Роль холемии в развитии кардиодепрессии после субтотальной резекции печени у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1):62-68.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.62-68

**Для корреспонденции:** Ермолаев Павел Александрович, канд. мед. наук, врач-сердечно-сосудистый хирург, e-mail: yermol@inbox.ru

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

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

**Поступила** 16.11.2017

Ermolaev P.A.<sup>1,2</sup>, Khramykh T.P.<sup>2</sup>, Barskaya L.O.<sup>2</sup>

## The role of cholemia in development of cardiodepression after subtotal liver resection in rats

<sup>1</sup> Omsk Regional Hospital;  
Berezovaya Str. 3, Omsk 644012, Russian Federation;

<sup>2</sup> Omsk State Medical University;  
Lenine Str. 12, Omsk 644099, Russian Federation

**Aim.** To assess the role of cholemia in development of myocardial dysfunction following the subtotal hepatic resection in rats. **Methodology.** Experiments were conducted on 48 white mongrel male rats. Subtotal atypical 80% liver resection was performed on 38 animals using an original method; the control group consisted of 10 intact animals. Total serum concentration of bile acids was measured using the enzymatic colorimetric method in intact animals and on days 1, 3, and 7 after the liver resection. Myocardial contractile function and metabolism were directly evaluated on spontaneously contracting isolated hearts of intact animals. During the heart perfusion with added bile, a set of contractile force and velocity indices was calculated; glucose and lactate concentrations and aspartate aminotransferase activity were measured in the coronary perfusate. **Results.** The total serum content of bile acids was increased in operated animals at all study points. When bile was added to the perfusion solution, the isolated hearts developed bradycardia, decreases in force and speed indices of the contractile function, increased glucose consumption, and release of lactate and aspartate aminotransferase into the coronary perfusate. **Conclusion.** The study showed the importance of cholemia following the subtotal liver resection for the development of functional and metabolic disorders of the myocardium.

**Keywords:** liver resection; isolated heart; cholemia; cardiodepression.

**For citation:** Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O. The role of cholemia in development of cardiodepression after subtotal liver resection in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya. (Patological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1): 62-68. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.62-68

**For correspondence:** Pavel A. Ermolaev, Candidate of medical Sciences, Cardiovascular surgeon; 3, ul. Berezovaya, Omsk, 644012, Russia; e-mail: yermol@inbox.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Ermolaev P.A., [http:// orcid.org/0000-0001-8733-6102](http://orcid.org/0000-0001-8733-6102)

**Received** 16.11.2017

## Введение

В связи с неуклонным ростом заболеваний, связанных с развитием патологических процессов в печени, и приоритетом хирургических методов их лечения, количество ежегодно выполняемых резекций печени растет во всем мире [1, 2]. Обширные резекции печени составляют в структуре операций на печени от 5 до 21% [3, 4]. Не так давно было введено понятие «предельно большие резекции печени», которые предусматривают удаление до 80% органа в ряде клинических ситуаций [5]. Неудовлетворенность результатами обширных резекций печени определяется высокой частотой послеоперационных осложнений, в том числе жизнеугрожающих, что заставляет исследователей продолжать изучение механизмов развития и течения хирургического стресс-ответа как в клинике, так и в условиях эксперимента.

В проведенных нами ранее экспериментах выявлено развитие недостаточности кровообращения после предельно допустимой резекции печени, а также установлена патогенетическая связь функционально-метаболических нарушений сердца и сосудов после операций, сопровождающихся гипоксией, активацией процессов свободно-радикального окисления и изменениями агрегатного состояния крови [6-10].

Для паренхимы печени характерна тесная связь со судистых и секреторных структур, что предопределяет механическое повреждение желчных протоков при проведении обширных резекций печени с последующим непосредственным попаданием желчи из операционного поля в системный кровоток. Как известно, компоненты желчи обладают высокой биологической активностью и являются важными регуляторами метаболизма, среди которых наибольшей биологической активностью и агрессивностью обладают желчные кислоты.

*Цель исследования:* оценка роли холемии в генезе миокардиальной дисфункции после субтотальной резекции печени у крыс.

## Методика

Эксперименты проведены на 48 беспородных белых крысах-самцах массой 250-270 г в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. Работа одобрена этической комиссией университета. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Крыс наркотизировали диэтиловым эфиром (ОАО «Медхимпром», Россия). 38 животным проводили субтотальную атипичную резекцию печени оригинальным способом, удаляя срединную и левую доли печени (80% от массы органа)<sup>1</sup>.

Минимальное достаточное количество экспериментальных животных в группе, необходимое для получения статистически значимых результатов, было рассчитано по формуле F. Lopez-Jimenez и соавт. [11] и составило 8 животных. Животные были разделены на 4 группы. I группа – интактные наркотизированные животные (контроль), n=10; II-IV группы – выжившие после резекции печени животные, исследованные на 1-е (n=10), 3-и (n=10) и 7-е сут (n=10) после операции.

Определение общей концентрации желчных кислот в сыворотке крови проводили энзиматическим колориметрическим методом с помощью набора реактивов ТВА (Mindray, Германия).

Прямую оценку сократительной функции и метаболизма миокарда интактных животных проводили на спонтанно сокращающихся изолированных сердцах, изолированных от регуляторных влияний организма, по методике E.L. Fallen и соавт. [12]. При использовании этой модели исключается влияние экстракардиальных факторов на сократимость миокарда, и выявляемые нарушения контрактильности миокарда могут быть

<sup>1</sup>Барская Л.О., Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Полуэктов В.Л. Способ резекции печени у мелких лабораторных животных. Патент на изобретение № 2601160, РФ; 2016.

обусловлены только повреждением самого сердца. Под эфирным наркозом вскрывали грудную клетку, забирали сердце, помещали его в охлажденный до 2-4 °С раствор Кребса-Хензелята. После препаровки в полость левого желудочка (ЛЖ) помещали латексный баллончик, соединенный с портативным монитором РМ-8000 (Mindray, Германия). Осуществляли ретроградную перфузию сердец через аорту раствором Кребса-Хензелята, насыщенным карбогеном, в режиме постоянного давления 70 мм рт. ст. при температуре 37 °С, поддерживаемой ультратермостатом VT-8 (ООО “Термекс-2”, Россия), и рН=7,33-7,36. Через 30 мин нормоксической перфузии, необходимой для стабилизации работы изолированного сердца, записывали кривую давления в левом желудочке (ЛЖ). Для оценки влияния холемии на функцию и метаболизм изолированных сердец проводили перфузию с добавлением желчи интактных крыс в течение 15 мин с последующей 20-минутной реперфузией раствором исходного состава. Общее содержание желчных кислот в желчи принимали равным 20 ммоль/л [13]. Добавление желчи в перфузат проводили из расчета конечной концентрации желчных кислот равной их максимальной концентрации в сыворотке оперированных животных.

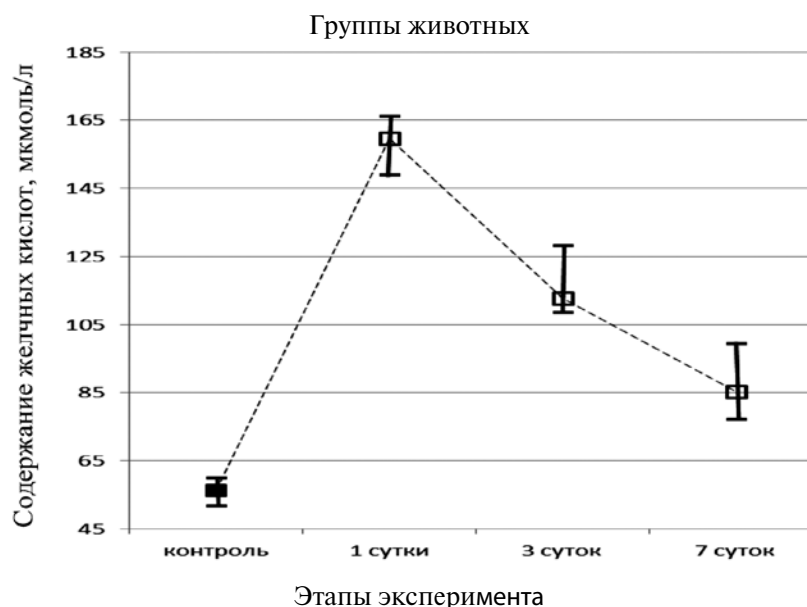
В периоды стабилизации, перфузии с добавлением желчи и реперфузии регистрировали частоту сердечных сокращений (ЧСС), рассчитывали комплекс силовых и скоростных показателей сократимости: систолическое и диастолическое давление (СД и ДД),

скорость сокращения (+dP/dt) и скорость расслабления (-dP/dt) ЛЖ на основании анализа кривой давления. Одновременно с регистрацией давления брали пробы перфузата, прошедшего через коронарное русло, определяли содержание глюкозы (глюкозоксидазным методом), лактата (энзиматическим колориметрическим методом), активности аспаратаминотрансферазы (АсАТ) – кинетическим методом (оптимизированный УФ тест) с помощью наборов реактивов Human GmbH (Германия). Потребление глюкозы и выделение лактата рассчитывали на 1 кг сухой массы миокарда за 1 мин на 1 мм рт. ст. развиваемого давления. Потерю кардиомиоцитами АсАТ вычисляли на 1 кг сухой массы миокарда за 1 мин.

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft). Определение значимости различий в независимых выборках проведено с помощью критерия Манна-Уитни. Результаты представлены в виде медианы (Me) с нижним (LQ) и верхним (Hq) квартилями. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

### Результаты и обсуждение

Субтотальная резекция печени была проведена у 38 животных. Летальность вследствие декомпенсации кровообращения (8 крыс) составила 21%. В ходе ис-



**Рис. 1.** Изменение общего содержания желчных кислот в сыворотке крови после субтотальной резекции печени, мкмоль/л. Данные представлены как Me [LQ; Hq]. Примечание: - p<0,05 достоверность различий по отношению к контролю.



следования у выживших животных обнаружено статистически значимое повышение общего содержания желчных кислот в сыворотке крови в послеоперационном периоде по сравнению с показателем контрольной группы (рис. 1). Так, через 1 сут после резекции печени уровень общей концентрации желчных кислот был повышен в 2,8 раза, на 3-и сут в 2,0 раза, на 7-е сут в 1,5 раза относительно уровня у интактных животных.

Увеличение общего содержания желчных кислот в сыворотке после резекции печени может быть результатом повреждения желчных протоков, нарушения секреции и оттока желчи, отторжения некротизированных тканей с поверхности среза печени в послеоперационном периоде [14-16], что может при-

водить к попаданию компонентов желчи в системный кровоток.

Далее было изучено влияние желчных кислот на сократительную функцию и метаболизм изолированных сердец интактных животных. Показатели сократительной функции изолированных сердец на этапах эксперимента представлены в таблице. При добавлении желчи в перфузат развивалась брадикардия, статистически значимое снижение силовых и скоростных показателей сократительной функции по сравнению с периодом стабилизации.

Во время реперфузии раствором Кребса-Хензельта исходного состава ЧСС, силовые и скоростные показатели сократимости изолированных сердец частич-



**Рис. 2.** Потребление глюкозы и выделение лактата изолированными сердцами интактных крыс при перфузии с желчью, мкмоль/(кг · мин · мм рт. ст.). Данные представлены как Ме [LQ; HQ]. Примечание: □, △, — p<0,05 достоверность различий по отношению к этапу стабилизации.

Таблица

**Силовые и скоростные показатели сократительной функции изолированных сердец при добавлении желчи в перфузат, Ме [LQ; HQ].**

Показатель	Этапы эксперимента		
	стабилизация	желчь	реперфузия
ЧСС, мин <sup>-1</sup>	183,0 [174,7; 191,5]	128,0 [103,0; 141,0]*	144,0 [115,5; 155,7]*
СД, мм рт. ст.	92,0 [85,5; 92,7]	68,0 [59,5; 68,5]*	77,0 [75,5; 80,0]
ДД, мм рт. ст.	4,0 [3,2; 4,0]	10,0 [8,2; 10,7]*	8,0 [6,2; 9,0]*
+dP/dt, мм рт. ст./с	1322,5 [1312,5; 1348,7]	975,0 [936,7; 1001,7]*	1068,0 [1002,7; 1115,7]
-dP/dt, мм рт.ст./с	812,0 [786,0; 877,2]	533,5 [521,0; 557,7]*	648,0 [624,0; 668,0]*

Примечание. \* — p<0,05 статистическая значимость различий по отношению к периоду стабилизации.

но восстанавливались, но не достигали исходных значений.

Исследование проб перфузата, прошедшего через коронарное русло, на содержание глюкозы, лактата, активность АсАТ, показало, что перфузия с добавлением желчи статистически значимо увеличивала потребление глюкозы на 45%, выделение в перфузат лактата в 2,3 раза и выход АсАТ на 66% по сравнению с периодом стабилизации (рис. 2). При реперфузии раствором Кребса-Хензелята исходного состава эти показатели частично восстанавливались, но не достигали исходных значений.

В ходе проведенных экспериментов было убедительно показано, что желчь угнетает автоматизм, сократительную функцию и метаболизм миокарда, вызывает повреждение мембран кардиомиоцитов (по данным выхода АсАТ). Увеличение потребления глюкозы на единицу выполняемой функции и накопление лактата в кардиомиоцитах свидетельствуют о развитии гипоксии и вторичной митохондриальной дисфункции [17, 18].

По данным литературы, основным компонентом желчи, обладающим кардиотоксическими и вазоактивными свойствами, являются желчные кислоты [19-22]. Ранее было установлено, что желчные кислоты снижают медленный входящий в клетку ток  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  и увеличивают выходящий ток  $\text{K}^+$  в кардиомиоцитах, что ведет к снижению продолжительности потенциала действия и перегрузке клеток ионами кальция [23]. Экспериментальные данные также подтверждают, что желчные кислоты нарушают “пейсмекерную” функцию кардиомиоцитов [24]. В миокарде и системной циркуляции желчные кислоты могут взаимодействовать как с рецепторами плазматической мембраны, сопряженными с G-белком, такими как TGR5 и мускариновые рецепторы, так и с ядерными рецепторами, а именно FRX и VDR [25-27]. Результатом такого взаимодействия является отрицательный хронотопный эффект, избыточное поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку, нарушение энергетического метаболизма кардиомиоцитов [28].

Сопоставляя данные литературы с полученными в ходе исследования результатами, мы пришли к заключению, что возможными механизмами действия желчных кислот на миокард после субтотальной резекции печени являются как их влияние на функционирование мембран кардиомиоцитов с развитием ионного дисбаланса и нарушений биоэнергетики миокарда, так и их непосредственное воздействие на мембраны эндотелиоцитов коронарного русла, что реализуется в виде дисфункции эндотелия, проявляющейся преобладанием вазоконстрикции, а в ряде случаев развитием ангиоспазма и последующей ишемии миокарда.

## Заключение

Таким образом, после субтотальной резекции печени у крыс выявлено повышение общего содержания желчных кислот в сыворотке крови, наиболее выраженное через 1 сут после операции. В ходе экспериментов на изолированном сердце показана значимая роль холемии, развивающейся после субтотальной резекции печени, в генезе функционально-метаболических нарушений в миокарде, проявляющихся угнетением автоматизма, снижением силы и скорости сокращения, нарушением утилизации глюкозы и повышением проницаемости мембран кардиомиоцитов.

## Литература

1. Simons J.P. et al. In-hospital mortality from liver resection for hepatocellular carcinoma: a simple risk score. *Cancer*. 2010; 116, (7): 1733-8.
2. Kanas G.P. et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clinical epidemiology*. 2012; 4: 283-301.
3. Вишневецкий В.А., Ефанов М.Г., Икрамов Р.З. Практические аспекты современной хирургии печени. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2009; 2: 28-34.
4. Патютко Ю.И. *Хирургическое лечение злокачественных опухолей печени*. М. Практическая медицина; 2005.
5. Журавлев В.А., Агалаков В.И. Обширные резекции печени при метастатическом раке. *Клиническая хирургия*. 1981; 5: 47-8.
6. Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Барская Л.О. Изменение показателей электрокардиограммы после предельно допустимой резекции печени у крыс. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2014; 127(4): 48-52.
7. Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Барская Л.О. Изменения системной гемодинамики после предельно допустимой резекции печени у крыс. *Общая реаниматология*. 2015; 11(1): 14-21.
8. Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Барская Л.О. Свободнорадикальное окисление в миокарде после предельно допустимой резекции печени у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 160(11): 569-71.
9. Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Барская Л.О. Изменение агрегатного состояния крови в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени у крыс. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2015; 4(55): 56-9.
10. Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Барская Л.О. Сократительная функция и метаболизм миокарда в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(2): 63-8.
11. Lopez-Jimenez F., Pniagua D., Lamas G.A. La interpretacion de los ensayos clinicos negativos. *Rev. Invest. Clin*. 1998; 50: 435-440.
12. Fallen E.L., Elliot W.C., Richard G. Apparatus for study of ventricular function and metabolism in the isolated perfused rat heart. *J. Appl. Physiol*. 1967; 22(4): 836-839.
13. Mendoza M.E., Monte M.J., El-Mir M.Y., Badia M.D., Marin J.J.G. Changes in the pattern of bile acids in the nuclei of rat liver cells

- during hepatocarcinogenesis. *Clinical Science*. 2002; 102: 143–150 (Printed in Great Britain).
14. Гальперин Э.И., Чевокин А.Ю., Игнатюк В.Г., Котовский А.Е. Послеоперационные билиарные осложнения при резекциях печени. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2011; 1: 12-7.
  15. Чардаров Н.К., Багмет Н.Н., Скипенко О.Г. Билиарные осложнения после резекций печени. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2010; 8: 61-8.
  16. Vigano L., Ferrero A., Sgotto E., Tesoriere R.L., Calgario M., Capusotti L. Bile leak after hepatectomy: predictive factors of spontaneous healing. *Am. J. Surg*. 2008; 196 (2): 195-200.
  17. Yan Y., Liu J., Wei C., Li K., Xie W., Wang Y., Cheng H. Bidirectional regulation of Ca<sup>2+</sup> sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res*. 2008; 77 (2): 432-441.
  18. Ventura-Clapier R., Garnier A., Veksler V., Joubert F. Bioenergetics of the failing heart *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; 1813 (7): 1360-1372.
  19. Hylemon P.B., Zhou H., Pandak W.M., Ren S., Gil G., Dent P. Bile acids as regulatory molecules. *J. Lipid. Res*. 2009; 50 (8): 1509–1520.
  20. Desai M.S. Penny D.J. Bile acids induce arrhythmias: old metabolite, new tricks. *Heart*. 2013; 99 (22): 1629-1630.
  21. Khurana S., Raina H., Pappas V., Raufman J.-P., Pallone T.L. Effects of deoxycholyglycine, a conjugated secondary bile acid, on myogenic tone and agonist-induced contraction in rat resistance arteries. *PlosOne*. 2012; 7: Article ID 32006.
  22. Temiz G., Mezili C., Tiftikçioğlu Y.Ö. et al. Evaluation of the effects of bile on the arterial tonus in a rabbit model. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open*. 2015; 3 (11): Article ID 570.
  23. Gorelik J., Shevchuk A., de Swiet M. et al. Comparison of the arrhythmogenic effects of tauro- and glycoconjugates of cholic acid in an in vitro study of rat cardiomyocytes. *BJOG*. 2004; 111(8): 867–870.
  24. Khurana S., Raufman J.-P., Pallone T.L. Bile acids regulate cardiovascular function. *Clin. Transl. Sci*. 2011; 4 (3): 210-218.
  25. Tishkoff D.X., Nibelink K.A., Holmberg K.H. et al. Functional vitamin D receptor (VDR) in the t-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility. *Endocrinology*. 2008; 149 (2): 558–564.
  26. Wang Y.D., Chen W.D., Moore D.D., Huang W. FXR: a metabolic regulator and cell protector. *Cell Res. Nov*. 2008; 18 (11): 1087–1095.
  27. Mathew S., Lund R.J., Chaudhary L.R. et al. Vitamin D receptor activators can protect against vascular calcification. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2008; 19 (8): 1509-1519.
  28. Sheikh Abdul Kadir S.H., Miragoli M., Abu-Hayyeh S. et al. Bile acid-induced arrhythmia is mediated by muscarinic M2 receptors in neonatal rat cardiomyocytes. *PLoSOne*. 2010; 5: Article ID 9689.
  4. Patyutko Yu.I. *Surgical treatment of malignant liver tumors*. M.: Prakticheskaya meditsina; 2005. (in Russian)
  5. Zhuravlev V.A., Agalakov V.I. Extensive liver resections with metastatic cancer. *Klinicheskaya hyrurgiya*. 1981; 5: 47-8. (in Russian)
  6. Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O. Changes of parameters of the electrocardiogram after the maximum permissible resection of the liver in rats. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2014; 127(4): 48-52. (in Russian)
  7. Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O. Systemic hemodynamic changes after maximally allowable liver resection in rats. *Obshchaya reanimatologiya*. 2015; 1: 14-21. (in Russian)
  8. Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O. Free radical oxidation in the myocardium after maximum permissible liver resection in rats. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. 2015; 160 (11): 569-71. (in Russian)
  9. Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O. Change in the aggregate state of blood in the early period after the maximum permissible liver resection in rats. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2015; 4(55): 56-9. (in Russian)
  10. Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O. Contractile function and metabolism of the myocardium in the early period after the maximum permissible liver resection in rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60 (2): 63-68. (in Russian)
  11. Lopez-Jimenez F., Pniagua D., Lamas G.A. La interpretacion de los ensayos clinicos negativos. *Rev. Invest. Clin*. 1998; 50: 435-440.
  12. Fallen E.L., Elliot W.C., Richard G. Apparatus for study of ventricular function and metabolism in the isolated perfused rat heart. *J. Appl. Physiol*. 1967; 22(4): 836-839.
  13. Mendoza M.E., Monte M.J., El-Mir M.Y., Badia M.D., Marin J.J.G. Changes in the pattern of bile acids in the nuclei of rat liver cells during hepatocarcinogenesis. *Clinical Science*. 2002; 102: 143–150 (Printed in Great Britain).
  14. Galperin E.I., Chevokin A.Yu., Ignatyuk V.G., Kотовский А.Е. Postoperative biliary complications in liver resections. *Hirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova*. 2011; 1: 12-17. (in Russian)
  15. Chardarov N.K., Bagmet N.N., Skipenko O.G. Biliary complications after liver resections. *Hirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova*. 2010; 8: 61-68. (in Russian)
  16. Vigano L., Ferrero A., Sgotto E., Tesoriere R.L., Calgario M., Capusotti L. Bile leak after hepatectomy: predictive factors of spontaneous healing. *Am. J. Surg*. 2008; 196 (2): 195-200.
  17. Yan Y., Liu J., Wei C., Li K., Xie W., Wang Y., Cheng H. Bidirectional regulation of Ca<sup>2+</sup> sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res*. 2008; 77 (2): 432-441.
  18. Ventura-Clapier R., Garnier A., Veksler V., Joubert F. Bioenergetics of the failing heart *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; 1813 (7): 1360-1372.
  19. Hylemon P.B., Zhou H., Pandak W.M., Ren S., Gil G., Dent P. Bile acids as regulatory molecules. *J. Lipid. Res*. 2009; 50 (8): 1509–1520.
  20. Desai M.S. Penny D.J. Bile acids induce arrhythmias: old metabolite, new tricks. *Heart*. 2013; 99 (22): 1629-1630.
  21. Khurana S., Raina H., Pappas V., Raufman J.-P., Pallone T.L. Effects of deoxycholyglycine, a conjugated secondary bile acid, on myogenic tone and agonist-induced contraction in rat resistance arteries. *PlosOne*. 2012; 7: Article ID 32006.

## References

1. Simons J.P. et al. In-hospital mortality from liver resection for hepatocellular carcinoma: a simple risk score. *Cancer*. 2010; 116, (7): 1733-8.
2. Kanas G.P. et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clinical epidemiology*. 2012; 4: 283-301.
3. Vishnevskiy V.A., Efanov M.G., Ikramov R.Z. Practical aspects of modern liver surgery. *Tihookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; 2: 28-34. (in Russian)

22. Temiz G., Mezili C., Tiftikçioğlu Y.Ö. et al. Evaluation of the effects of bile on the arterial tonus in a rabbit model. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open.* 2015; 3 (11): Article ID 570.
23. Gorelik J., Shevchuk A., de Swiet M. et al. Comparison of the arrhythmogenic effects of tauro- and glycoconjugates of cholic acid in an in vitro study of rat cardiomyocytes. *BJOG.* 2004; 111( 8): 867–870.
24. Khurana S., Raufman J.-P., Pallone T.L. Bile acids regulate cardiovascular function. *Clin. Transl. Sci.* 2011; 4 (3): 210–218.
25. Tishkoff D.X., Nibbelink K.A., Holmberg K.H. et al. Functional vitamin D receptor (VDR) in the t-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility. *Endocrinology.* 2008; 149 (2): 558–564.
26. Wang Y.D., Chen W.D., Moore D.D., Huang W. FXR: a metabolic regulator and cell protector. *Cell Res. Nov.* 2008; 18 (11): 1087–1095.
27. Mathew S., Lund R.J., Chaudhary L.R. et al. Vitamin D receptor activators can protect against vascular calcification. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 19 (8): 1509–1519.
28. Sheikh Abdul Kadir S.H., Miragoli M., Abu-Hayyeh S. et al. Bile acid-induced arrhythmia is mediated by muscarinic M2 receptors in neonatal rat cardiomyocytes. *PLoSOne.* 2010; 5: Article ID 9689.

**Сведения об авторах:**

**Ермолаев Павел Александрович**, канд. мед. наук, врач-сердечно-сосудистый хирург, ассистент каф. топографической анатомии и оперативной хирургии, e-mail: yermol@inbox.ru;

**Храмых Татьяна Петровна**, доктор мед. наук, зав. каф. топографической анатомии и оперативной хирургии;

**Барская Любовь Олеговна**, ассистент каф. топографической анатомии и оперативной хирургии.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 591.1

Шибкова Д.З.<sup>2</sup>, Шилкова Т.В.<sup>1</sup>, Овчинникова А.В.<sup>1</sup>

## Эффекты влияния электромагнитного поля радиочастотного диапазона на органы кроветворения у экспериментальных животных

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный гуманитарно-педагогический университет», 454074, г. Челябинск, Россия, ул. Бажова, 46-а;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», 454080, г. Челябинск, Россия, просп. Ленина, д. 76

Цель – оценка влияния электромагнитного излучения радиочастотного диапазона на органы кроветворения самок и самцов мышей линии СВА. Методика. Опытные группы животных подвергали воздействию электромагнитного излучения радиочастотного диапазона (диапазон сотовой связи) с интенсивностью 1,2 мВт/см<sup>2</sup>, периодом экспозиции 10 мин ежедневно в течение 5 сут. Через 30 сут с момента начала облучения часть животных выводили из эксперимента для исследования органов кроветворения, другую часть спаривали для получения потомства. Результаты. Установлено, что воздействие исследуемого фактора вызывает статистически значимые изменения в красном костном мозге, селезенке, тимусе, периферической крови у экспериментальных животных и их потомства. Через 30 сут у облученных самок мышей в крови возрастало количество эритроцитов, у половозрелых самцов количество эритроцитов уменьшалось. Содержание гемоглобина изменялось однонаправленно у облученных самок и самцов, что проявлялось тенденцией к снижению его уровня. У самцов и самок отмечалось снижение числа нейтрофилов. Число лимфоцитов у самцов было в пределах нормы, у самок отмечалась тенденция к увеличению доли лимфоцитов. Однонаправленные изменения у самок и самцов отмечены в эритроидном ростке – уменьшение числа полихроматофильных и оксифильных нормоцитов, вследствие ускоренного созревания клеток и их выхода в кровь. В тимусе облученных самок и самцов уменьшалось число ядросодержащих клеток, в селезенке, напротив, их число увеличивалось. У потомства облученных животных снижалось число лейкоцитов с увеличением доли юных и палочкоядерных нейтрофилов, доля лимфоцитов снижалась по сравнению с потомством необлученных животных. Заключение. Выявленные изменения расцениваются как компенсаторно-приспособительные реакции в органах кроветворения у экспериментальных животных.

**Ключевые слова:** электромагнитное излучение; экспериментальные животные; органы кроветворения; периферическая кровь.

**Для цитирования:** Шибкова Д.З., Шилкова Т.В., Овчинникова А.В. Эффекты влияния электромагнитного поля радиочастотного диапазона на органы кроветворения у экспериментальных животных. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 69-76.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.69-76

**Для корреспонденции:** Шибкова Дарья Захаровна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. Центра спортивной науки (ЮУрГГПУ), e-mail: shibkova2006@mail.ru

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

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБОУ ВО «Мордовский государственный педагогический институт им. М.Е. Евсевва» по договору на выполнение НИР от 14.04.2017 г. № 16-452.

**Поступила** 10.11.2017

Shibkova D.Z.<sup>2</sup>, Shilkova T.V.<sup>1</sup>, Ovchinnikova A.V.<sup>1</sup>

## THE EFFECTS OF AN ELECTROMAGNETIC FIELD RADIO FREQUENCY ON HEMATOPOIETIC ORGANS IN EXPERIMENTAL ANIMALS

<sup>1</sup>South Ural State Humanitarian Pedagogical University, 46a, Bazhova st., Chelyabinsk, 454074, Russia

<sup>2</sup>Federal State Autonomous Educational Institution of Higher South Ural State University (national research university), 76, Lenin prospekt, 454080, Chelyabinsk, Russia

**The purpose** – identify the effects of the influence of electromagnetic radiation (EMR) at the radio frequency band hemopoietic organs of males and females CBA mice in different models of irradiation. **Methods.** The experimental group of animals exposed to RF EMF with an intensity of 1.2 mW / cm<sup>2</sup> exposure period of 10 minutes daily for 5 days. After 30 days from the start of irradiation

of the animals were taken out of the experiment for the study of blood, the other part mated to produce offspring. **Results.** It was found that when exposed to the test factor there was a significant change in the bone marrow, spleen, thymus, peripheral blood of experimental animals and their offspring. The findings indicate the development of compensatory and adaptive reactions of the blood of experimental animals.

**Keywords:** electromagnetic radiation; experimental animals; forming organs, peripheral blood.

**For citation:** Shibkova D.Z., Shilkova T.V., Ovchinnikova A.V. The effects of an electromagnetic field radio frequency on hematopoietic organs in experimental animals. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1): 69-76. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.69-76

**For correspondence:** Darya Z. Shibkova, Doctor of biological sciences, professor, Center for Sports Science, «South Ural State University, (National Research University)», e-mail: shibkova2006@mail.ru

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

**Acknowledgement.** The work was supported by «Mordovia State Pedagogical Institute named after M.E. Evseev» under the Agreement for research engineering from 14.04.2017g. № 16-452.

**Information about authors:**

Shibkova D.Z., <http://orcid.org/0000-0002-8583-6821>

Shilkova T.V., <http://orcid.org/0000-0001-7268-6417>

Ovchinnikova A.V., <http://orcid.org/0000-0002-6448-3270>

**Received** 10.11.2017

## Введение

Современные условия жизни человека характеризуются наличием большого количества факторов среды, оказывающих постоянное воздействие на его здоровье. Одним из факторов, способствующих загрязнению окружающей среды, является электромагнитное излучение радиочастотного диапазона (ЭМИ РЧ). По мнению ряда авторов [1, 2] электромагнитное загрязнение, прежде всего, связано с широким распространением таких источников ЭМИ РЧ как базовые станции и мобильные телефоны. Среди населения значительная доля пользователей мобильными телефонами приходится на людей репродуктивного возраста и детей. В связи с этим, актуальность приобретает проблема исследования биологических эффектов воздействия ЭМИ РЧ диапазона, изучению которых посвящены единичные работы [3, 4].

В живом организме в ответ на воздействие ЭМИ РЧ диапазона на разных уровнях его организации формируются адаптивные реакции [4, 5]. ЭМИ РЧ диапазона рассматривают как стресс-фактор, на который система крови и репродуктивная система отвечают адаптивными перестройками [6]. Актуальными остаются вопросы выявления характера изменений в органах кроветворения в зависимости от моделей облучения экспериментальных животных, их возраста и пола, а также эффекты, которые могут проявляться у потомства облученных родителей.

Цель исследования – выявить эффекты влияния электромагнитного излучения радиочастотного диапазона на органы кроветворения самок и самцов мышной линии СВА и их потомство.

## Методика

Все работы с лабораторными животными проводили в соответствии с «правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министра здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом университета.

Исследование проводилось на базе лаборатории «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (ЮУрГГПУ). Мышей линии СВА, выращенных в виварии на базе лаборатории, в возрасте 1 мес подвергали воздействию ЭМИ РЧ диапазона<sup>1</sup>. В качестве источника электромагнитного излучения была использована лабораторная исследовательская СВЧ - установка, первый сигнал которой представляет собой непрерывную последовательность радиоимпульсов трапециевидной формы с частотой импульсов 217 Гц и несущей частотой ЭМИ РЧ 925 МГц. Средняя плотность потока мощности эквивалентной плоской волны (S) была равна 1,2 мВт/см<sup>2</sup> (12 Вт/м<sup>2</sup>) и соответствовала предельно допустимой энергетической экспозиции (200 мкВт·ч/см<sup>2</sup>), принятой Санитарными Правилами и нормами ЭМП РЧ (Россия). Длительность экспозиции – 10 мин ежедневно в течение 5 сут. Электромагнитная волна излучалась вертикально сверху вниз. Излучатель располагали сверху над животными на расстоянии равном длине волны электромагнитного излучения. Контейнер с животными располагался в спе-

<sup>1</sup> Полевик Н. Д., Пряхин Е. А. Способ снижения опасности воздействия на биологические объекты искусственных электромагнитных излучений / Патент РФ, 2005. № 2262955, БИ. № 30

циальной камере, поверхности которой были покрыты радиопоглощающим материалом (пенопластовые кубики, заполненные елочками из графитовых нитей, верхушкой ориентированных внутрь камеры), что исключало влияние отраженной ЭМВ на амплитуду воздействующего ЭМИ РЧ.

Эксперименты выполнены на 20 самках и 20 самцах мышей СВА в возрасте 1 мес и 30 крысятах их потомства. При достижении половой зрелости (самки и самцы с массой тела  $20,5 \pm 0,5$  и  $24,5 \pm 0,5$  г соответственно, возраст 1 мес), животные были разделены на экспериментальные группы:

- 1-я — самки (контроль «ложное облучение»);
- 2-я — самки, облученные ЭМИ РЧ диапазона;
- 3-я — самцы (контроль «ложное облучение»);
- 4-я — самцы, облученные ЭМИ РЧ диапазона;
- 5-я — потомство от самок и самцов (контроль «ложное облучение»);
- 6-я — потомство от облученных самок и самцов;
- 7-я — потомство от облученных самок и самцов группы «ложное облучение».

У животных из 1-й, 2-й, 3-й и 4-й групп исследовали параметры периферической крови, костного мозга, селезенки и тимуса. У животных 5-й, 6-й и 7-й групп анализировали показатели периферической крови.

Забор крови осуществляли из хвостовой вены. В периферической крови определяли общее количество эритроцитов, лейкоцитов, уровень гемоглобина и показатели лейкограммы; в костном мозге, селезенке и тимусе подсчитывали общее число ядросодержащих клеток (ЯСК) в камере Горяева стандартным методом [7]. Для определения числа ядерных клеток органы гомогенизировали в специальной среде в охлажденном гомогенизаторе, а полученную суспензию отфильтровывали на капроновом фильтре. Определение массы органов (селезенка, тимус) проводили на торсионных весах типа ВТ (точность измерения до 0,1 мг). Опре-

деление клеточности селезенки и тимуса проводили на мазках-отпечатках, окрашенных по Романовскому-Гимзе (просчитывали 500 клеток) [7].

Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0.

## Результаты и обсуждение

На первом этапе эксперимента проводили исследование показателей периферической крови, клеточности органов кроветворения у животных, подвергнутых воздействию ЭМИ РЧ диапазона.

*Периферическая кровь.* У самок мышей СВА через 30 сут с момента начала облучения ЭМИ РЧ в периферической крови на 70,5% возросло количество эритроцитов по сравнению с контролем (табл. 1).

В отличие от самок у облученных половозрелых самцов (4-я группа) в периферической крови наблюдалось уменьшение общего количества эритроцитов на 14% ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к 3-й группе «ложное облучение» (табл. 1). Содержание гемоглобина изменялось однонаправлено у облученных самок и самцов, что выражалось тенденцией к снижению его уровня на 9% и 7% соответственно по сравнению с показателями ложнооблученных животных. На наш взгляд поддержание уровня гемоглобина, обеспечивающего нормальное течение окислительно-восстановительных процессов в организме облученных самок, обусловлено ускоренным выходом оксифильных нормоцитов в кровяное русло, что приводит к статистически значимому увеличению общего числа эритроцитов. Аналогичные результаты представлены в работе [8].

Общее количество лейкоцитов у облученных самок 2-й группы не изменялось, а у облученных самцов отмечалось снижение числа лейкоцитов на 35% ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контролем. Состав лейкоци-

Таблица 1

Показатели периферической крови самцов и самок мышей СВА ( $M \pm m$ )

Группа животных	Гемоглобин (г/л)	Общее число эритроцитов, $10^{12}$ в 1 л	Общее число лейкоцитов, $10^9$ в 1 л
Самки мышей СВА			
1-я группа («ложное облучение»), n=10	$129,8 \pm 5,1$	$7,8 \pm 1,3$	$2,8 \pm 0,7$
2-я группа («облучение ЭМП РЧ»), n=10	$118,2 \pm 5,9$	$13,3 \pm 1,5^*$	$2,7 \pm 1,1$
Самцы мышей СВА			
3-я группа («ложное облучение»), n=10	$132,2 \pm 4,5$	$13,5 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,6$
4-я группа («облучение ЭМП РЧ»), n=10	$123,2 \pm 6,6$	$11,6 \pm 0,8^*$	$2,4 \pm 0,4^*$

Примечание. \*  $p \leq 0,05$  по отношению к группе «ложное облучение».

тов в периферической крови облученных животных представлен в таблице 2.

У самцов облученной группы отмечалось статистически значимое снижение доли сегментоядерных нейтрофилов на 35%, у самок – на 31% сегментоядерных и 49% палочкоядерных нейтрофилов соответственно по отношению к группам «ложное облучение». Число лимфоцитов у облученных самцов было в пределах физиологической нормы, у самок отмечалась тенденция к повышению доли лимфоцитов (на 10,6% по сравнению с контролем).

Показатель соотношения лейкоцитов (индекса Бредекка) расценивается, как интегральный показатель функционального состояния организма [9].

Отношение доли лимфоцитов к палочкоядерным гранулоцитам (индекс Бредекка) периферической крови в группе самок превышал контроль более чем в 2 раза, в группе самцов - на 31,5%, что может указывать на повышение резистентности организма облученных животных как проявление адаптационно-компенсаторной реакции на воздействие ЭМИ РЧ диапазона. Аналогичное повышение индекса Бредекка (в 1,7 раза) было установлено у беременных мышей СВА, подвергнутых воздействию ЭМИ РЧ диапазона, по отношению к контролю [6]. Противоположная реакция – снижение показателя индекса Бредекка, была нами выяв-

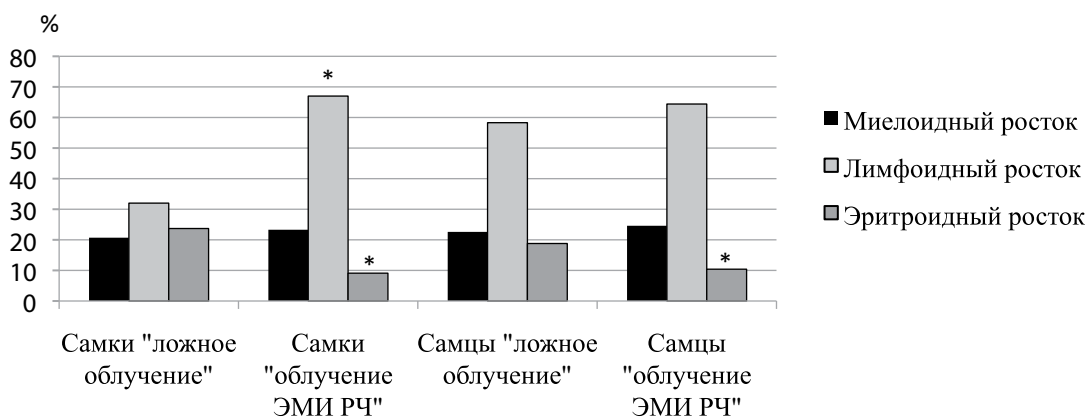


Рис. 1. Соотношение ростков кроветворения в костном мозге экспериментальных животных. \* p<0,05 по отношению к группе «ложное облучение».

Таблица 2

Влияние ЭМИ РЧ на показатели лейкограммы периферической крови самцов и самок мышей СВА, (M±m), %

Показатель Лейкограммы		Группы животных			
		1	2	3	4
		Самки мышей СВА		Самцы мышей СВА	
		ложное облучение, n=10	облучение ЭМИ РЧ, n=10	ложное облучение, n=10	Облучение ЭМИ РЧ, n=10
Нейтрофилы	Юные	3,6±0,8	2,8±0,2	4,2±0,9	2,4±0,9
	Палочкоядерные	6,5±2,1	3,3±1,3*	6,9±0,9	5,6±0,5
	Сегментоядерные	8,4±2,2	5,8±0,5*	13,5±1,2	8,8±1,1*
Эозинофилы		0	0	0	0
Базофилы		1,8±1,1	0,2±0,1*	0	0,3±0,3
Моноциты		0,4±0,1	0	0,9±0,5	0,1±0,1*
Лимфоциты		79,4±3,2	87,8±6,4	74,9±4,8	79,5±5,1
Индекс Бредекка, усл. ед.		12,2	26,6	10,8	14,2

Примечание. \* p<0,05 по отношению к группе «ложное облучение».



лена ранее в случае хронического  $\gamma$  - облучения мышей линии СВА [10], что расценивается как напряжение механизмов адаптации.

Изменения показателей периферической крови сопровождались сменой направлений дифференцировки клеток в костном мозге у облученных самок и самцов.

**Костный мозг.** В костном мозге у облученных самок отмечалось снижение числа ЯСК на 36% по сравнению с контролем. У облученных самцов отмечено повышение доли ядерных клеток на 47% относительно контроля. Однонаправленные изменения у облученных самок и самцов наблюдались в эритроидном ростке – сокращение общего числа клеток на 46,8% и 44,7% соответственно по сравнению с группами («ложное облучение») (рис. 1).

Сокращение доли клеток эритроидного ростка в костном мозге у облученных самок (табл. 3) происхо-

дило за счет полихроматофильных и оксифильных нормоцитов в 1,6 и 2,9 раза соответственно, что указывает на ускорение процесса созревания клеток и их выхода в периферическую кровь.

В группе облученных самцов сокращение доли эритроидного ростка происходило за счет оксифильных нормоцитов – в 4,3 раза по отношению к контрольной группе (табл. 3). Сокращение числа оксифильных нормоцитов указывает на угнетение процессов созревания полихроматофильных нормоцитов, что, в свою очередь, и могло привести к снижению числа эритроцитов в периферической крови облученных самцов (табл. 1).

В опытной группе самок увеличение доли клеток миелоидного ростка происходило за счет сегментоядерных нейтрофилов, процентное содержание которых увеличилось в 2,3 раза по сравнению с контролем. Также наблюдались изменения в составе лимфоидного

Таблица 3

Показатели клеточности костного мозга мышей СВА, (M $\pm$ m, %)

Показатели	Группы животных			
	1-я	2-я	3-я	4-я
	Самки мышей СВА		Самцы мышей СВА	
	ложное облучение n=10	облучение ЭМИ РЧ n=10	ложное облучение n=10	облучение ЭМИ РЧ n=10
Клетки миелоидного ростка, всего	20,7 $\pm$ 1,6	23,3 $\pm$ 1,7	22,6 $\pm$ 1,6	24,6 $\pm$ 0,6
Миелобласты	0	0	0,08 $\pm$ 0,04	0
Промиелоциты	1,2 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,9	3,3 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,1
Миелоциты	1,8 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,7	4,0 $\pm$ 1,1	7,3 $\pm$ 2,5*
Палочкоядерные нейтрофилы	13,3 $\pm$ 0,6	11,9 $\pm$ 4,5	10,7 $\pm$ 2,2	12,6 $\pm$ 3,9
Сегментоядерные нейтрофилы	2,3 $\pm$ 1,5	5,4 $\pm$ 1,1*	2,7 $\pm$ 1,6	2,4 $\pm$ 0,7
Юные нейтрофилы	1,6 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 0,8
Базофилы	0,2 $\pm$ 0,02	0	0,4 $\pm$ 0,01	0
Эозинофилы	0	0	0	0
Моноциты	0,6 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,06	0,4 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,2
Клетки лимфоидного роста, всего	55,8 $\pm$ 5,2	67,0 $\pm$ 6,3*	58,3 $\pm$ 7,8	64,4 $\pm$ 5,4
Лимфобласты	0,4 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2
Пролимфоциты	0	0	0	0
Лимфоциты	55,4 $\pm$ 5,3	66,6 $\pm$ 6,5*	58,0 $\pm$ 5,8	64,0 $\pm$ 3,4
Клетки эритроидного роста, всего	17,1 $\pm$ 9,2	9,1 $\pm$ 1,9*	18,8 $\pm$ 2,6	10,4 $\pm$ 3,8*
Эритробласты	0,1 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,01	0	0,2 $\pm$ 0,1
Нормоциты базофильные	0	0	0,9 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,01*
Нормоциты полихроматофильные	10,7 $\pm$ 1,8	6,8 $\pm$ 1,2*	6,7 $\pm$ 0,8	7,4 $\pm$ 1,9
Нормоциты оксифильные	6,3 $\pm$ 1,4	2,2 $\pm$ 1,2*	12,0 $\pm$ 1,8	2,8 $\pm$ 0,6*
Мегакарициты	0,25 $\pm$ 0,01	0	0	0,2 $\pm$ 0,01
Ретикулярные клетки	0	0	0	0

Примечание. \*  $p < 0,05$  по отношению к группе «ложное облучение».

ростка: установлено увеличение доли лимфоидных клеток на 16,7% за счет зрелых лимфоцитов (табл. 3). У опытной группы самок, облученных ЭМИ РЧ диапазона, ускорение процессов созревания и повышение доли зрелых лимфоцитов было выявлено и в тимусе [6].

В костном мозге у облученных самцов отмечалась тенденция к повышению относительного числа клеток миелоидного и лимфоидного ростков (рис. 1). В составе миелоидного ростка костного мозга происходили качественные изменения: наблюдалось увеличение на 85% числа миелоцитов и обнаруживалась тенденция к повышению доли юных и палочкоядерных нейтрофилов, по сравнению с контролем. Повышение числа молодых форм гранулоцитов в костном мозге указывает на одновременную активизацию процес-

сов пролиферации клеток миелоидного ростка и торможение процесса их созревания (табл. 3).

*Тимус и селезенка.* Морфометрические данные клеточного состава тимуса и селезенки облученных животных было представлено нами ранее [11], установлено снижение массы органов: у самок на 30% и 13%, а у самцов на 15% и 32% соответственно по сравнению с соответствующим контролем. В тимусе у облученных самок и самцов имело место статистически значимое сокращение числа ЯСК на 35% и 31% относительно контроля (табл. 4).

В селезенке у облученных самок и самцов наблюдалось статистически значимое повышение количества ЯСК на 46% и 34% соответственно по сравнению с ложнооблученными животными (табл. 4).

Таблица 4

**Содержание ядерных клеток в тимусе и селезенке животных при воздействии ЭМИ РЧ, (M±m)**

Группа животных	Количество ЯСК в тимусе, 10 <sup>6</sup>	Количество ЯСК в селезенке, 10 <sup>6</sup>
Самки группы контроля «ложное облучение», n=10	40,9 ± 0,1	85,0 ± 0,1
Самки опытной группы (облучение ЭМП РЧ), n=10	28,1 ± 0,1*	123,9 ± 0,1*
Самцы группы контроля «ложное облучение», n=10	20,5 ± 6,5	34,9 ± 2,1
Самцы опытной группы (облучение ЭМП РЧ), n=10	13,3 ± 0,1*	46,8 ± 0,1*

Примечание. \* p<0,05 по отношению к группе «ложное облучение».

Таблица 5

**Клеточный состав тимуса и селезенки мышей СВА, (M±m)**

Показатель, %	Самки, «ложное облучение», n=10	Самки, облучение ЭМП РЧ, n=10	Самцы, «ложное облучение» n=10	Самцы, облучение ЭМП РЧ, n=10
Клеточность тимуса				
Тимоциты:	15,53 ± 0,02	14,82 ± 0,01*	15,00 ± 0,10	12,47 ± 0,02*
-бластные тимоциты средние	50,13 ± 0,01	22,8 ± 0,01*	50,33 ± 0,70	52,27 ± 0,20
-тимоциты малые	34,33 ± 0,01	54,22 ± 0,03*	34,33 ± 0,30	35,40 ± 0,1
Клеточность селезенки				
Лимфатический ряд	96,73 ± 0,01	94,48 ± 0,01*	94,27 ± 0,10	90,47 ± 0,02*
Миелоидный ряд	1,86 ± 0,02	2,53 ± 0,10*	5,10 ± 0,20	5,32 ± 0,20
Эритроидный ряд	0,73 ± 0,30	0,96 ± 0,10*	0,27 ± 0,10	2,83 ± 0,02*

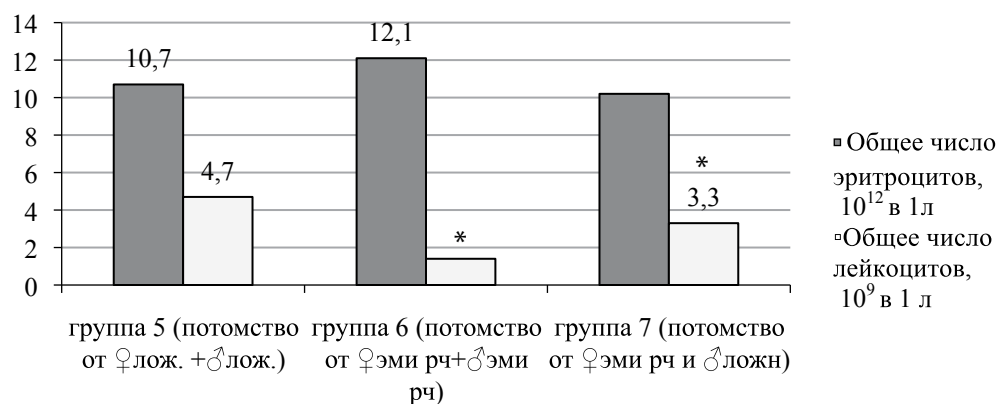
Примечание. \* p<0,05 по отношению к группе «ложное облучение».

Таблица 6

**Лейкограмма потомства мышей СВА, (M±m, %)**

Показатель лейкограммы	Группа № 5 (самки и самцы, «ложное облучение»), n=10	Группа № 6 (самки и самцы, облученные ЭМИ РЧ), n=10	Группа № 7 (самки, ЭМИ РЧ, и самцы, «ложное облучение»), n=10
Юные нейтрофилы	0	2,3 ± 0,2*	4,7 ± 0,9*
Палочкоядерные нейтрофилы	2,9 ± 0,1	17,3 ± 4,3*	10,5 ± 3,1*
Сегментноядерные нейтрофилы	19,3 ± 2,4	22,0 ± 3,5	25,5 ± 5,1
Эозинофилы	1,9 ± 0,4	0	0
Базофилы	0	0,5 ± 0,2*	0
Моноциты	1,0 ± 0,4	1,5 ± 0,7	0,5 ± 0,2
Лимфоциты	75,3 ± 2,7	57,5 ± 8,2*	59,8 ± 9,0*

Примечание. \* p<0,05 по отношению к группе потомства, полученных при спаривании самок и самцов, «ложное облучение».



**Рис. 2.** Показатели периферической крови потомства мышей СВА.

\*  $p < 0,05$  по отношению к группе потомства «ложное облучение».

При дифференцированном подсчете клеточности тимуса у облученных самок отмечалось снижение доли бластных клеток и средних лимфоцитов на 4,6% и 54,5%, соответственно, а также повышение на 58% количества зрелых лимфоцитов по отношению к группе контроля (табл. 5). У облученных самцов наблюдалось понижение доли бластных тимоцитов на 17% по сравнению с группой ложнооблученных.

Увеличение ЯСК в селезенке у облученных самок сопровождалось повышением доли клеток миелоидного ряда на 36,0% и эритроидного ряда на 31,5%. Изменение клеточного состава селезенки у облученных самцов выражалось 10-тикратным повышением числа клеток эритроидного ряда (табл. 5). Данные о характере изменений в селезенке и тимусе у облученных животных противоречивы [12, 13].

При изучении отдаленных эффектов воздействия ЭМИ РЧ диапазона по показателям периферической крови у потомства мышей СВА, полученных при разных моделях спаривания родительских особей, установлены различия. В частности, наиболее выраженные изменения отмечались у мышей 6-й группы, которые характеризовались статистически значимым снижением числа лейкоцитов (на 70,2%) и тенденцией к увеличению числа эритроцитов (на 13,1%) по сравнению с показателями потомства группы контроля. У потомства мышей 7-й группы выявлено статистически значимое снижение числа лейкоцитов (на 29,8%) по отношению к контролю (рис. 2).

При сравнительной оценке показателей лейкограммы у потомства выявлено статистически значимое повышение доли юных и палочкоядерных нейтрофилов: у животных 6-й группы в 2,3 и 5,9 раза, у 7-й —

в 4,7 и 3,6 раза соответственно по сравнению с контролем. У потомства в 6-й и 7-й групп установлено статистически значимое снижение доли лимфоцитов соответственно на 23,6% и 20,6% (табл. 6). Сокращение числа лимфоцитов в периферической крови может свидетельствовать об угнетении клеточного иммунитета у потомства облученных животных [13].

На основании результатов, полученных в экспериментальном исследовании, можно сделать заключение, что у самок и самцов мышей СВА, а также у их потомства в ответ на воздействие ЭМИ РЧ диапазона (интенсивность 1,2 мВт/см<sup>2</sup>, период экспозиции 10 мин ежедневно в течение 5 сут) формируются различные ответные реакции. Выявленные изменения расцениваются как компенсаторно-приспособительные реакции в органах кроветворения у экспериментальных животных.

## Литература

1. Григорьев Ю.Г. Принципиально новое электромагнитное загрязнение окружающей среды и отсутствие адекватной нормативной базы - к оценке риска (анализ современных отечественных и зарубежных данных). Гигиена и санитария. 2014; 93(3): 11-6.
2. Divan H., Kheifets L., Obel C., Olsen J. Cell phone use and behavioral problems in young children. *J. Epidemiol. Community Health.* 2012; 66 (6): 524-9.
3. Thomas S., Heinrich S., von Kries R., Radon K. Exposure to radio-frequency electromagnetic fields and behavioral problems in Bavarian children and adolescents. *Eur. J. Epidemiol.* 2010; 25 (2): 135-41.
4. Ерофеева Л.М. Состояние тимуса мышей в различные сроки. Морфология. 2000; 117(1): 42 – 6.
5. Шибкова Д.З., Шилкова Т.В., Овчинникова А.В. Ранние и отдаленные эффекты влияния электромагнитного поля радиочастотного диапазона на репродуктивную функцию и морфофункциональное состояние потомства экспериментальных животных. Радиационная биология. Радиоэкология. 2015; 55(5): 514-9.

6. Шилкова Т.В., Овчинникова А.В., Шибкова Д.З. Влияние электромагнитного поля радиочастотного диапазона на уровень гемоглобина крови экспериментальных животных. В мире научных открытий. 2014; 2(50): 387-93.
7. Меньшиков В.В., Демкаторская П.Н. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник под ред. В.В. Меньшикова. М.; Медицина, 1987.
8. Жевновская А.Н., Гашев С.Н., Соловьёва С.В. Влияние электромагнитного излучения промышленной частоты на гематологические показатели периферической крови грызунов. Принципы экологии. 2016; 2: 84-90.
9. Жуков А.П., Шарафутдинова Е.Б., Датский А.П. Информативность лейкоцитарных индексов в лабораторном скрининге легочной патологии у телят. Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2016; 3(59): 101-4.
10. Шибкова Д.З., Аклеев А.В. Адаптационно-компенсаторные реакции системы кроветворения при хроническом радиационном воздействии: монография. М.; Изд-во РАДЭКОН; Челябинск; Изд-во ЧГПУ; 2006.
11. Овчинникова А.В. Отдаленные эффекты воздействия электромагнитного излучения радиочастотного диапазона на органы иммунной системы экспериментальных животных. Вестник Челябинского государственного педагогического университета. 2015; 5: 166-72.
12. Пряхин Е.А., Аклеев А.В. Электромагнитные поля и биологические системы: стресс и адаптация. Челябинск, 2011.
13. Григорьев Ю.Г., Шафиркин А.В. Биоэффекты хронического воздействия электромагнитных полей радиочастотного диапазона малых интенсивностей. Радиационная биология. Радиэкология. 2003; 43(5): 501-11.
3. Thomas S., Heinrich S., von Kries R., Radon K. Exposure to radio-frequency electromagnetic fields and behavioral problems in Bavarian children and adolescents. *Eur. J. Epidemiol.* 2010; 25 (2): 135-41.
4. Erofeeva L.M. Status of the thymus of mice at different times of irradiation. *Morfologiya.* 2000; 117(1): 42 – 6. (in Russian)
5. Shibkova D.Z., Shilkova T.V., Ovchinnikova A.V. Early and late effects of electromagnetic field effect radiofrequency reproductive and morphofunctional condition progeny experimental animals. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya.* 2015; 55(5): 514 – 9. (in Russian)
6. Shilkova T.V., Ovchinnikova A.V., Shibkova D.Z. The Influence of electromagnetic field of the radio frequency range on the level of blood hemoglobin in experimental animals. *V mire nauchnykh otkrytiy.* 2014; 2(50): 387- 93. (in Russian)
7. Men'shikov, V.V., Ed. *Laboratory Methods in clinic [Laboratornye metody issledovaniya v klinike]*. Moscow; Meditsina; 1987. (in Russian)
8. Zhevnovskaya A.N., Gashev S.N., Solov'yova S.V. The Influence of electromagnetic radiation of industrial frequency on hematological parameters of peripheral blood of rodents. *Printsiipy ekologiy.* 2016; (2): 84-90. (in Russian)
9. Zhukov A.P., Sharafutdinova E.B., Datskiy A.P. The Informative value of leukocyte indices in the laboratory screening of pulmonary pathology in calves. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta.* 2016; 3(59): 101-4.
10. Shibkova D.Z., Akleev A.V. *Adaptive-compensatory reactions of the hemopoietic system in chronic radiation exposure [Adaptatsionno-kompensatornye reaktsii sistemy krovetvoreniya pri khronicheskom radiatsionnom vozdeystvii]*: monografiya. Moscow; RADEKON; Chelyabinsk; Chelyabinsk state pedagogical University; 2006. (in Russian)
11. Ovchinnikova A.V. Long-term effects of exposure to electromagnetic radiation in the radio frequency range of organs of the immune system of experimental animals. *Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta.* 2015; (5): 166-72. (in Russian)
12. Pryakhin E.A., Akleev A.V. *Electromagnetic fields and biological systems: stress and adaptation [Elektromagnitnye polya i biologicheskie sistemy: stress i adaptatsiya]*. Chelyabinsk; 2011. (in Russian)
13. Grigor'ev Yu.G., Shafirkin A.V. Bioeffect chronic exposure to radiofrequency electromagnetic fields of small intensity. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya.* 2003; 43(5): 501-11. (in Russian)

### References

1. Grigor'ev Yu.G. Fundamentally new electromagnetic pollution and the lack of an adequate regulatory framework - the risk assessment (analysis of the current domestic and foreign data). *Gigiena i sanitariya.* 2014; 93(3): 11- 6. (in Russian)
2. Divan H., Kheifets L., Obel C., Olsen J. Cell phone use and behavioral problems in young children. *J. Epidemiol. Community Health.* 2012; 66 (6): 524-9.

### Сведения об авторах:

**Шибкова Дарья Захаровна**, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. Центра спортивной науки ЮУрГГПУ, e-mail: shibkova2006@mail.ru;

**Шилкова Татьяна Викторовна**, канд. биол. наук, доцент каф. общей биологии и физиологии ЮУрГГПУ, e-mail: shilkovatv@mail.ru;

**Овчинникова Анастасия Валерьевна**, аспирант каф. общей биологии и физиологии ЮУрГГПУ, e-mail: 19\_anastasia\_89@mail.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Стрелкова Л.Б., Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Панина М.И.

## Гепатозащитное действие экстракта володушки при экспериментальном тетрациклиновом гепатите

ФГБНУ ВИЛАР Федеральное государственное научное учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»,  
117216, г. Москва, Россия, ул. Грина, д. 7, стр. 1

В последние годы возросла распространённость лекарственных поражений печени. В профилактике и лечении таких заболеваний актуальным считают применение препаратов растительного происхождения. Перспективным объектом для разработки таких препаратов является растение володушка золотистая. В ФГБНУ ВИЛАР разработан и стандартизирован сухой экстракт травы володушки золотистой. В составе экстракта содержатся флавоноиды, сапонины, полисахариды, дубильные вещества катехиновой природы. Содержание фенольных соединений в пересчете на рутин составляет не менее 6%. **Цель** — оценка гепатозащитного действия экстракта володушки при экспериментальном тетрациклиновом гепатите. **Методика.** Исследовано влияние экстракта володушки (*Bupleurum aureum* Fisch.) на состояние печени крыс в условиях экспериментального тетрациклинового гепатита в сравнении с известным растительным лекарственным препаратом гепатопротекторного действия Силимаром. Гепатопротекторные и детоксицирующие свойства экстракта володушки оценивали по изменению содержания микросомального белка и цитохрома P<sub>450</sub> в микросомальных фракциях печени экспериментальных групп животных, а также по изменению активности ключевых ферментов системы детоксикации микросом печени, катализирующих ферментативные реакции: цитохрома P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазы. **Результаты.** Установлено, что экстракт володушки в экспериментально-терапевтической дозе (100 мг/кг) обладает статистически значимыми гепатопротекторными и детоксицирующими свойствами, оказывает существенный эффект на активность ферментов микросомальной системы детоксикации (цитохром P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазу) в печени крыс. **Заключение.** Экстракт володушки является перспективным объектом для создания новых высокоэффективных лекарственных средств растительного происхождения для профилактики и лечения лекарственных поражений печени.

**Ключевые слова:** экспериментальный тетрациклиновый гепатит, гепатопротекторные и детоксицирующие свойства, лекарственные поражения печени, экстракт сухой травы володушки золотистой.

**Для цитирования:** Стрелкова Л.Б., Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Панина М.И. ГЕПАТОЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА ВОЛОДУШКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТЕТРАЦИКЛИНОВОМ ГЕПАТИТЕ. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 78-82.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.01.78-82

**Для корреспонденции:** Ферубко Екатерина Владимировна, канд. мед. наук, зав. отделом экспериментальной и клинической фармакологии, e-mail: eferubko@yandex.ru

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

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

Поступила 13.03.2018

Strelkova L.B., Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Panina M.I.

## HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF THE THOROUGHWAX EXTRACT IN EXPERIMENTAL TETRACYCLINE-INDUCED HEPATITIS

National Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants,  
Grina Str. 7, Bldg. 1, Moscow 117216, Russian Federation

Prevalence of drug-induced hepatic disorders has greatly increased during recent years, and the use of herbal remedies is considered relevant for their prevention and treatment. A promising object for development of such drugs is thoroughwax (*Bupleurum aureum*). A dry extract of this herb was developed and standardized at the National Research Institute of Therapeutic and Aromatic Plants. The extract contains flavonoids, saponins, polysaccharides, and tanning substances of the catechine group. The content of phenolic substances is not less than 6% in rutin equivalents. **Aim.** To study hepatoprotective effects of the thoroughwax (*Bupleurum aureum* Fisch.) extract in rats with experimental tetracycline-induced hepatitis as compared to a well-known herbal hepatoprotective agent, Silimar. Hepatoprotective and detoxifying properties of the thoroughwax extract were assessed by changes in concentrations of microsomal protein and cytochrome P450 in hepatic microsomal fractions and changes in activities of key enzymes of the hepatic microsomal detoxifying system, which catalyzes enzyme reactions of cytochrome P450 and glutathione transferase. **Results.** The

thoroughwax extract at an experimental therapeutic dose of 100 mg/kg provided significant hepatoprotective and detoxifying effects and induced a strong activation of the microsomal detoxifying enzymes, cytochrome P450 and glutathione transferase, in the rat liver. The thoroughwax extract is promising for development of new, effective herbal drugs for prevention and treatment of drug-induced hepatic disorders.

**Keywords:** thoroughwax dry extract, experimental tetracycline-induced hepatitis, hepatoprotective and detoxifying effect, drug-induced hepatic disorders.

**For citation:** Strelkova L.B., Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Panina M.I. Hepatoprotective effect of the thoroughwax extract in experimental tetracycline-induced hepatitis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1): 78-82. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.78-82

**For correspondence:** Ekaterina V. Ferubko, Ph. D. (Med.), Head of department of experimental and clinical pharmacology of the Center of Medicine, All-Russian scientific research institute of Medicinal and Aromatic plants; Bldg.1, 7 Grina Str., Moscow 117216, Russia, e-mail: eferubko@yandex.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Strelkova L.B., <https://orcid.org/0000-0002-9199-3858>

Kurmanova E.N., <https://orcid.org/0000-0002-9243-5268>

Ferubko E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1949-2597>

Panina M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7651-0037>

**Received** 13.03.2018

## Введение

За последнее время существенно возросла распространённость лекарственных поражений печени, это связано с либерализацией доступа населения к медикаментам при отсутствии адекватной информации о возможных противопоказаниях и побочном действии препаратов. Любое лекарственное средство может привести к развитию лекарственных поражений печени, однако наиболее часто повреждающее действие оказывают антибактериальные лекарственные средства (тетрациклин, амоксициллин), нестероидные противовоспалительные средства (парацетамол, диклофенак и др.), противотуберкулёзные препараты, анаболические стероиды [1].

Тетрациклин – распространенный и доступный антибиотик с широким спектром активности, который включен Всемирной организацией здравоохранения в перечень важнейших лекарственных средств. Применение тетрациклина эффективно в случае назначения его при инфекционных заболеваниях, вызванных микроорганизмами, чувствительными к нему. Так, показаниями к применению тетрациклина являются: инфекционные заболевания дыхательных путей и пневмония, вызванные *Klebsiella spp.*, *Mycoplasma pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*; инфекции мягких тканей и кожи; актиномикоз; холера; сибирская язва; сыпной и возвратный тиф; чума; туляремия и т.д. При лечении тетрациклином довольно часто наблюдаются побочные реакции, среди которых особенно опасно его гепатотоксическое действие. Острые медикаментозные поражения печени в России

выявляются у 2,7% госпитализированных больных [2]. Острый лекарственный гепатит разной степени тяжести представляет собой наиболее часто встречающееся повреждение печени, вызванное лекарственными средствами. Как правило, он обусловлен реакциями идиосинкразии, риск развития лекарственного гепатита повышается при длительном и многократном применении препарата. В клинической картине в продромальном периоде преобладают диспепсические нарушения, астенический, аллергический синдромы. С развитием желтушного периода отмечаются потемнение мочи, обесцвечивание кала, выявляются увеличение и болезненность печени. Повышение аминотрансферазной активности и уровня щелочной фосфатазы находится в прямой зависимости от выраженности цитолиза и распространенности некротических изменений в печени. Увеличивается уровень  $\gamma$ -глобулинов в сыворотке. При отмене лекарственного препарата регресс клинической симптоматики происходит достаточно быстро [3, 4]. Подобные осложнения связаны с отсутствием полной информации о возможных противопоказаниях к назначению тетрациклина пациентам и его побочных эффектах, и, как следствие, неоправданными назначениями этого антибиотика.

В профилактике и лечении лекарственных поражений печени перспективным считают применение препаратов растительного происхождения. Последние обладают достаточной эффективностью, широким спектром действия, малой токсичностью и связанной с этим возможностью их длительного применения [5]. Для профилактики и лечения этих заболеваний наш-

ли широкое применение растительные препараты, такие как силимар, флакумин, карсил и другие. Силимар - отечественный растительный препарат, представляет собой сухой очищенный экстракт, представляющий собой сухой очищенный экстракт, получаемый из плодов расторопши пятнистой – *Silybum marianum* (L.) Gaerth семейства Астровые – *Asteraceae*. Основными действующими веществами силимара являются флаволигнаны. Силимар (лекарственная форма – табл. 0,1 г) разрешен для медицинского применения в качестве гепатопротекторного средства [6].

Перспективным объектом для разработки новых лекарственных препаратов с целью профилактики и лечения лекарственных поражений печени, на наш взгляд, является растение володушка золотистая (длиннолистная) – (*Bupleurum aureum* Fisch. seu *longifolium* L.), активно используемое в народной медицине. На сегодняшний день накоплена большая теоретическая база по фитохимическому изучению данного растения, научно доказана фармакологическая активность травы володушки, а также проведены работы по ботанико-ресурсным исследованиям. Володушка золотистая произрастает на территории РФ и имеет на сегодняшний день стабильную сырьевую базу в дикой природе [7, 8].

### Методика

Исследования были согласованы с биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР и проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к Приказу МЗ СССР за № 755 от 12.08.1977), «Правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986), Приказа МЗ РФ за № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики».

В ФГБНУ ВИЛАР разработан и стандартизирован сухой экстракт травы володушки золотистой. В составе экстракта содержатся флавоноиды, сапонины, полисахариды, дубильные вещества катехиновой природы. Содержание фенольных соединений в пересчете на рутин составляет не менее 6% [8].

Эксперименты проводили в соответствии с Федеральным законом «О лекарственных средствах» (ст. 36), а также согласно рекомендациям [9]. В эксперименте были использованы нелинейные крысы-самцы массой 160 – 180 г в количестве 40 особей. Крыс содержали в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Производитель животных – филиал «Андреевка» ФГБНУ НЦБТ ФМБА России (Московская область).

Исследование влияния данного экстракта на состояние печени крыс проводилось в условиях эксперимен-

тального токсического гепатита. В работе использовали модель тетрациклинового гепатита [10]. Модель тетрациклинового гепатита характеризуется гепатотоксическим эффектом, обусловленным подавлением этим антибиотиком выработки транспортных белков, обеспечивающих выведение фосфолипидов из гепатоцита, что приводит к жировой дистрофии печени. Действие тетрациклина также сопровождается деструкцией малых междольковых протоков, приводящей к внутрипечёночному холестазу [11-13]. Нами в предварительных исследованиях было установлено, что при воспроизведении токсического тетрациклинового гепатита в соответствии указанной методикой у крыс наблюдалось повышение активности индикаторных ферментов цитолитического синдрома (аспартатаминотрансферазы - на 29%) и холестаза (щелочной фосфатазы - на 24%).

Фармакологические свойства экстракта изучали при его внутрижелудочном введении лабораторным крысам. Подопытные животные были разделены на 5 групп по 8 особей: первая группа – интактные животные; вторая – контрольные животные, у которых воспроизводилась модель токсического тетрациклинового гепатита; третья, четвёртая и пятая группы – опытные животные, которые дополнительно получали экстракт володушки в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и препарат сравнения силимар в дозе 100 мг/кг, суспендированный в 1% крахмальной взвеси, соответственно.

Экстракт володушки и силимар предварительно вводили 1 раз в сут в течение 5 сут опытным группам лабораторных животных, в это же время контрольные крысы получали эквивалентный объём дистиллированной воды. С 6-х по 10-е сут эксперимента животным контрольной и опытных групп вводили внутрижелудочно тетрациклин в дозе 500 мг/кг. За 1 ч до введения тетрациклина опытные животные получали экстракт володушки (3-я и 4-я опытные группы), силимар (5-я опытная группа), а контрольные животные получали дистиллированную воду [10]. Через 48 ч после последнего введения тетрациклина крыс подвергали эвтаназии в CO<sub>2</sub> камере и извлекали печень для дальнейшего исследования.

Из печени интактных, контрольных и подопытных животных выделяли микросомальную фракцию с применением метода дифференциального центрифугирования [14]. В микросомальных фракциях печени экспериментальных групп животных определяли содержание микросомального белка [15] и цитохрома P<sub>450</sub> [16], а также показатели скорости монооксигеназных реакций, катализируемых цитохромом P<sub>450</sub> – р-гидроксилирования анилина, N-деметилирования диметиланилина (ДМА) и скорости реакции конъюгации с участием глутатион-трансферазы (ГТФ), отражающие активность детоксицирующей микросомальной системы печени. С учетом

всех исследуемых показателей оценивали гепатопротекторные и детоксицирующие свойства володушки по сравнению с препаратом сравнения силимаром на модели тетрациклинового гепатита.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0 (США). Значимость различий между выборками с распределением, приближающимся к нормальному, оценивали с помощью «t»-критерия Стьюдента. Различия принимали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Результаты изучения гепатопротекторных и детоксицирующих свойств экстракта володушки в сравнении с референтным препаратом силимаром в экспериментах на животных с воспроизведенным тетрациклиновым гепатитом представлены в табл. 1 и 2.

Табл. 1 демонстрирует данные по изменению общего содержания микросомального белка и доли цитохрома P<sub>450</sub> в микросомальных фракциях печени различных экспериментальных групп животных.

В табл. 2 представлены данные об изменениях активности ключевых ферментов системы детоксикации микросом печени: ферментов цитохрома P<sub>450</sub>, катализирующих реакции гидроксилирования анилина и деметилирования ДМА, определяемые по скорости со-

ответствующих монооксигеназных реакций, а также активности ГТФ — по скорости образования продукта реакции конъюгации с глутатионом, у различных экспериментальных групп животных.

Из данных, представленных в таблице 1, следует, что в микросомах печени контрольных крыс (с тетрациклиновым гепатитом без лечения) по сравнению с интактными животными параллельно уменьшению общего количества микросомального белка происходит статистически значимое уменьшение (на 13 %), содержания цитохрома P<sub>450</sub>, свидетельствующее о токсическом воздействии тетрациклина на печень. У опытных групп, получавших дополнительно экстракт володушки в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и силимар, по сравнению с контрольными животными при незначительном снижении общего количества микросомального белка наблюдается статистически значимое увеличение содержания доли цитохрома P<sub>450</sub> на мг белка может свидетельствовать о компенсаторной индукции цитохрома P<sub>450</sub> в печени под действием изучаемых растительных лекарственных средств на фоне токсического воздействия антибиотика тетрациклина. Содержание цитохрома P<sub>450</sub> в экспериментальных группах возрастает в ряду контроль < интактные < силимар < экстракт володушки в

Таблица 1

**Влияние экстракта володушки на содержание микросомального белка и цитохрома P<sub>450</sub> в условиях модели тетрациклинового гепатита у крыс, (M±m)**

Условия опыта	Содержание белка	Содержание цитохрома P <sub>450</sub>
	мг белка /мл суспензии	нмоль цитохрома P <sub>450</sub> /мг белка
Интактные (n=8)	6,67 ± 0,23	0,705 ± 0,01
Контрольные (n=8) (тетрациклиновый гепатит) (n=8)	6,06 ± 0,42	0,613 ± 0,03*
Экстракт володушки 50 мг/кг + тетрациклин (n=8)	5,58 ± 0,02	0,815 ± 0,02*
Экстракт володушки 100 мг/кг + тетрациклин (n=8)	5,70 ± 0,36	0,864 ± 0,03*
Силимар 100 мг/кг + тетрациклин (n=8)	5,51 ± 0,11*	0,785 ± 0,04*

Примечание. \* – статистическая значимость различий,  $p < 0,05$ .

Таблица 2

**Влияние экстракта володушки на скорость ферментативных реакций, катализируемых цитохромом P<sub>450</sub> и ГТФ в условиях модели тетрациклинового гепатита у крыс, (M±m)**

Условия опыта	Гидроксилирование анилина	Деметилирование ДМА	Активность ГТФ
	нмоль НАДФН/мг белка мин	нмоль НАДФН/мг белка мин	нмоль/ мг белка мин
Интактные (n=8)	3,14 ± 0,03	7,17 ± 0,05	118,43 ± 2,26
Контрольные (тетрациклиновый гепатит) (n=8)	2,90 ± 0,06*	7,05 ± 0,02	108,43 ± 2,26*
Экстракт володушки 50мг/кг + тетрациклин (n=8)	3,58 ± 0,03*	7,37 ± 0,05	147,82 ± 2,74*
Экстракт володушки 100 мг/кг + тетрациклин (n=8)	4,56 ± 0,04*	7,94 ± 0,06	176,43 ± 2,26*
Силимар 100 мг/кг + тетрациклин (n=8)	3,36 ± 0,04*	7,61 ± 0,07	130,14 ± 3,13*

Примечание. \* – статистическая значимость различий,  $p < 0,05$ .



дозе 50 мг/кг < экстракт володушки в дозе 100 мг/кг. Полученные результаты, отражающие содержание цитохрома  $P_{450}$  в общем количестве микросомального белка, в группе животных, получавших экстракт володушки, свидетельствует о более эффективном действии экстракта по сравнению с препаратом силимар.

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что у контрольных крыс (токсический гепатит без лечения) по сравнению с интактными животными происходит снижение скорости гидроксилирования анилина - на 8%, свидетельствующее о токсическом воздействии тетрациклина на печень. Экстракт володушки и силимар на фоне экспериментального тетрациклинового гепатита статистически значимо увеличивали специфическую гидроксилазную активность цитохрома  $P_{450}$ , но слабо влияли на его деметилазную активность. Так, у опытных групп животных, получавших экстракт володушки в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг, гидроксилазная активность цитохрома  $P_{450}$  статистически значимо возрастала на 22% и 53%, соответственно, по сравнению с контролем (тетрациклиновый гепатит), что превышало на 7% и на 38% - показатели группы, получавшей силимар. В опытной группе при введении силимара в дозе 100 мг/кг скорость реакции гидроксилирования увеличивалась только на 7% по сравнению с интактными животными и на 15% по сравнению с контролем. Таким образом, в данном случае был установлен высокий активирующий эффект экстракта володушки в дозе 100 мг/кг на гидроксилазную активность фермента микросомальной системы детоксикации печени крыс цитохрома  $P_{450}$ .

Большое значение для сравнительной оценки детоксицирующих свойств экстракта володушки имеет изучение его влияния на активность ГТФ, которая участвует в конъюгации токсических продуктов, образующихся в монооксигеназной системе цитохрома  $P_{450}$  на первом этапе биотрансформации. У контрольных крыс с воспроизведенным токсическим гепатитом по сравнению с интактными животными происходит снижение скорости ферментативных реакций, катализируемых ГТФ, на 8%, что свидетельствует о токсическом воздействии тетрациклина на печень. В таблице 2 показано, что по сравнению с контрольной группой животных, у опытной группы, получавшей экстракт володушки в дозе 50 мг/кг, скорость ГТФ-реакции достоверно увеличивается на 33%, а у опытной группы, получавшей экстракт володушки в дозе 100 мг/кг, — на 57%. По сравнению с опытной группой, получавшей силимар, активность ГТФ у групп, получавших экстракт володушки в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг, возрастала на 15% и 39%, соответственно; при этом в группе крыс, получавшей препарат си-

лимар, скорость ГТФ-реакции статистически значимо увеличивалась (на 18%) только в сравнении с контрольной группой животных. Скорость реакции конъюгации, катализируемая ГТФ микросом печени, статистически значимо возрастает в экспериментальных группах животных в порядке увеличения эффекта активации: интактные < контрольные < опытные, получавшие силимар в дозе 100 мг/кг < опытные, получавшие экстракт володушки в дозе 50 мг/кг < опытные, получавшие экстракт володушки в дозе 100 мг/кг. Полученные результаты по изучению активности ГТФ в группе животных, получавших экстракт володушки, свидетельствует о более выраженных активирующих детоксикацию свойствах экстракта володушки по сравнению с силимаром.

Таким образом, установлен высокий активирующий эффект экстракта володушки в дозе 100 мг/кг на ферменты микросомальной системы детоксикации печени крыс цитохрома  $P_{450}$  и глутатионтрансферазу. Полученные данные свидетельствуют о статистически значимых гепатопротекторных и детоксицирующих свойствах экстракта володушки.

## Выводы

В условиях экспериментального моделирования медикаментозного поражения печени у крыс (на модели тетрациклинового гепатита) подтверждено токсическое действие тетрациклина на микросомальные ферменты печени, проявляющееся в уменьшении количества цитохрома  $P_{450}$  и угнетении активности ферментов, катализирующих реакции гидроксилирования и конъюгации.

Экспериментально установлено, что сухой экстракт травы володушки золотистой в условиях модели тетрациклинового гепатита у крыс обладает гепатопротекторными и стимулирующими детоксикацию свойствами в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг, в степени, превышающей данные свойства силимара в дозе 100 мг/кг; при этом отмечен дозозависимый эффект экстракта володушки. Установлен высокий активирующий эффект экстракта володушки в дозе 100 мг/кг на ферменты микросомальной системы детоксикации печени крыс цитохрома  $P_{450}$  и глутатионтрансферазу.

По результатам проведенных экспериментов установлено, что экстракт, полученный из травы володушки золотистой, обладающий гепатопротекторными и стимулирующими детоксикацию свойствами, является перспективным объектом для создания новых лекарственных препаратов растительного происхождения для профилактики и лечения токсических, в том числе лекарственных, поражений печени.

## Литература

## References

1. Буеверов А.О. Лекарственные поражения печени. *Российский медицинский журнал*. 2012; 3: 107-10.
2. Полунина Т.Е. Диагностика и тактика ведения пациентов с лекарственными поражениями печени. *Трудный пациент*. 2013; 11 (4): 15-21.
3. Zuckerman J.M., Qamar F., Bono B.R. Review of macrolides (azithromycin, clarithromycin), ketolids (telithromycin) and glycylicylines (tigecycline). *Medical Clinics of North America*. 2011; Vol. 95: 761–91.
4. Логинов А.Ф., Буторова Л.И., Логинов В.А. Лекарственные поражения печени: диагностика, лечение. *Российский медицинский журнал. Гастроэнтерология*. 2016; 11: 721–7.
5. Рейзис А.Р., Борзакова С.Н., Аксёнова В.А. Лекарственно-индуцированные поражения печени – актуальная проблема современной медицины. *Гастроэнтерология*. 2010; 3: 49-54.
6. Крепкова Л.В., Шкаренков А.А., Сокольская Т.А. Экспериментальное и клиническое изучение фитопрепаратов из расторопши пятнистой. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2008; 4: 3-6.
7. Мингажаева А.М., Баширова Р.М., Усманов Ю.И. *Растения рода Вирлеум (рекомендации по введению в культуру)*. Издание Башкирского университета; 2002.
8. Канунникова Ю.С., Джавахян М.А. Разработка технологии получения володушки золотистой экстракта сухого. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2014; 7: 65-6.
9. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть первая. Москва; Гриф и К; 2012.
10. Скакун Н.П., Олейник А.Н. Сравнительное действие атропина и метацина на внешнесекреторную функцию печени. *Фармакология и токсикология*. 1967; 30(3): 334.
11. Белоусов Ю.Б. *Общая и частная клиническая фармакокинетика*. Москва; Ремедиум; 2006.
12. Полунина Т.Е., Маев И.В. Медикаментозные гепатиты. *Фарматека*. 2006; 12: 127.
13. *Болезни печени и желчевыводящих путей: Руководство для врачей*. Москва; ООО «Издательский дом «М-Вести»; 2002.
14. Карузина И.И., Бачманова Г.И., Менгазетдинов Д.Э., Мясоедова К.Н., Жихарева В.О., Кузнецова Г.И., Арчаков А.И. Выделение и свойства цитохрома P<sub>450</sub> из микросом печени кроликов. *Биохимия*. 1979; 6: 1049-57.
15. Авдеев В.Г. Методы определения концентрации белка. *Вопросы медицинской химии*. 1977; 4: 562-71.
16. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment. *Journal Biological Chemistry*. 1964; 7: 2370-8.
1. Bueverov A.O. Drug-induced hepatic disorders. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal. Gastroenterologiya*. 2012; 3: 107-10. (in Russian)
2. Polunina T.E. Diagnostics and tactics of maintaining patients with medicinal damages of a liver. *Trudnyy patsient*. 2013; 11 (4): 15-21. (in Russian)
3. Zuckerman J.M., Qamar F., Bono B.R. Review of macrolides (azithromycin, clarithromycin), ketolids (telithromycin) and glycylicylines (tigecycline). *Medical Clinics of North America*. 2011; Vol. 95: 761–91.
4. Loginov A.F., Butorova L.I., Loginov V.A. Drug-induced hepatic disorders: diagnostics, treatment. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal. Gastroenterologiya*. 2016; 11: 721–7. (in Russian)
5. Reyzis A.R., Borzakova S.N., Aksenova V.A. Drug-induced hepatic disorders - a current problem of the modern medicine. *Gastroenterologiya*. 2010; 3: 49-54. (in Russian)
6. Krepkova L.V., Shkarenkov A.A., Sokol'skaya T.A. The experimental and clinical studying of phytomedicines from a thistle spotty. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2008; 4: 3-6. (in Russian)
7. Mingazhaeva A.M., Bashirova R.M., Usmanov Yu.I. *Sort plants Bupleurum (recommendations about introduction to culture)*. [Rasteniya roda Bupleurum (rekomentatsii po vvedeniyu v kul'turu)]. Edition of the Bashkir university; 2002. (in Russian)
8. Kanunnikova Yu.S., Dzhavahyan M.A. Development of technology of receiving thoroughwax (*Bupleurum aureum*) extract dry. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2014; 7: 65-6. (in Russian)
9. *Guide to carrying out preclinical researches of pharmaceuticals. Part one. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. CHast' pervaya. Moscow; Grif i K; 2012. (in Russian)
10. Skakun N.P., Olejnik A.N. Comparative effect of atropine and methacium on secretory function of a liver. *Farmakologiya i toksikologiya*. 1967; 30(3): 334. (in Russian)
11. Belousov Yu.B. *Common and private clinical pharmacokinetic [Obshchaya i chastnaya klinicheskaya farmakokinetyka]*. Moscow; Remedium; 2006. (in Russian)
12. Polunina T.E., Maev I.V. Medicamentous hepatitis. *Farmateka*. 2006; 12: 127. (in Russian)
13. *Diseases of a liver and biliary tract: The management for doctors [Bolezni pecheni i zhelcheyvodyashchikh putey: Rukovodstvo dlya vrachey]*. 2002. Moscow; LLC M-Vesti Publishing House; 2002. (in Russian)
14. Karuzina I.I., Bachmanova G.I., Mengazetdinov D.E., Myasoedova K.N., Zhikhareva V.O., Kuznetsova G.I., Archakov A.I. Selection enzymes cytochrome P450 from microsomas of a liver of rabbits. *Bio-khimiya*. 1979; 6: 1049-57. (in Russian)
15. Avdeev V.G. Methods of definition of concentration of protein. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1977; 4: 562-71. (in Russian)
16. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment. *Journal Biological Chemistry*. 1964; 7: 2370-8.

## Сведения об авторах:

**Стрелкова Людмила Борисовна**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. отдела медико-биологических проблем НИЦ БМТ ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

**Курманова Елена Николаевна**, науч. сотр. отдела экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

**Ферубко Екатерина Владимировна**, канд. мед. наук, зав. отделом экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: eferubko@yandex.ru;

**Панина Марина Ивановна**, доктор мед. наук, проф., руководитель Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений».

© Коллектив авторов, 2019

УДК 546.74:616.–005.1–08

Гаглоева Э.М.<sup>1</sup>, Брин В.Б.<sup>1,2</sup>, Скупневский С.В.<sup>1,2</sup>, Боцьева Н.В.<sup>1</sup>, Молдован Т.В.<sup>1</sup>

## Влияние хлорида никеля на показатели гемокоагуляции и липопероксидации у крыс в эксперименте

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Северо–Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 362019, РСО–Алания, г. Владикавказ, Россия, ул. Пушкинская, д. 40;<sup>2</sup>ФГБУН «Институт биомедицинских исследований Владикавказского научного центра» Российской академии наук, 362025, РСО–Алания, г. Владикавказ, Россия, ул. Пушкинская, д. 47

**Цель исследования** – изучить состояние системы гемостаза при хронической интоксикации хлоридом никеля, исследовать взаимосвязь показателей гемокоагуляции с процессами липопероксидации у крыс в эксперименте.

**Методика.** опыты проводили на крысах-самцах Вистар (n=50, 230-250 г). Раствор NiCl<sub>2</sub> (5 мг/кг) вводили внутрижелудочно ежедневно в течение 2 нед, 1 и 2 мес. По завершении эксперимента исследовали состояние тромбоцитарного и коагуляционного звеньев гемостаза, антикоагулянтную и фибринолитическую активность крови, а также определяли активность процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантных ферментов. **Результаты.** Установлено, что через 2 нед и 1 мес интоксикации у крыс отмечались гиперкоагуляционные изменения показателей свертывающей системы крови: повышение агрегационной активности тромбоцитов, увеличение концентрации фибриногена, снижение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и протромбинового времени. В этот период регистрировалось увеличение антитромбиновой и фибринолитической активности крови. Через 2 мес наблюдалось подавление активности клеточного звена гемостаза - тромбоцитопения, ослабление степени АДФ–индуцируемой агрегации тромбоцитов. Выявлялась тенденция к уменьшению концентрации фибриногена. На фоне снижения АЧТВ и тромбинового времени отмечалось увеличение протромбинового времени. В то же время регистрировалось угнетение противосвертывающего звена системы гемостаза (снижалась активность антитромбина III), наблюдалось истощение резервных возможностей фибринолитического звена (замедление фXIIa-зависимого эглобулинового лизиса) и увеличение содержания растворимых фибрин мономерных комплексов, что свидетельствует о наличии тромбемии. Через 2 нед, один и два месяца интоксикации у животных выявлялись корреляционные связи между основными показателями системы гемостаза и активностью процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантных ферментов. **Заключение.** Полученные данные подтверждают наличие взаимосвязи активности процессов липопероксидации и системы гемостаза, в том числе при хронической никелевой интоксикации. Результаты исследования позволяют рекомендовать применение антиоксидантов для разработки способов коррекции гемостатических сдвигов при воздействии на организм тяжелых металлов.

**Ключевые слова:** никель; перекисное окисление липидов; гемостаз.

**Для цитирования:** Гаглоева Э.М., Брин В.Б., Скупневский С.В., Боцьева Н.В., Молдован Т.В. Влияние хлорида никеля на показатели гемокоагуляции и липопероксидации у крыс в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 83-90.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.83-90

**Для корреспонденции:** Брин Вадим Борисович, доктор мед. наук, зав. каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Северо–Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: vbbrin@yandex.ru

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

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

**Поступила:** 11.03.2018

Gagloeva E.M.<sup>1</sup>, Brin V.B.<sup>1,2</sup>, Skupnevskiy S.V.<sup>1,2</sup>, Botsieva N.V.<sup>1</sup>, Moldovan T.V.<sup>1</sup>

## EFFECTS OF NICKEL CHLORIDE ON INDICES OF HEMOCOAGULATION AND LIPID PEROXIDATION IN RATS

<sup>1</sup>North Ossetian State Medical Academy, Pushkinskaya Str. 40, Vladikavkaz 362019, Republic of North Ossetia-Alania, Russian Federation;<sup>2</sup>Institute of Biomedical Research, Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya Str. 47, Vladikavkaz 362025, Republic of North Ossetia-Alania, Russian Federation

**The aim.** To study the state of the hemostasis system in chronic nickel intoxication and to investigate the relationship between hemocoagulation indices and lipoperoxidation processes in rats. **Methods.** Experiments were carried out on male Wistar rats (n=50, 230-250 g). A solution of nickel chloride (5 mg/kg) was administered daily intragastrically for two weeks, one and two months. At the end of the experiments, indices of platelet and coagulation hemostasis systems, anticoagulant

and fibrinolytic activity of blood plasma, and activities of lipid peroxidation and antioxidant enzymes were studied. **Results.** Hypercoagulative changes in indices of the coagulation system were observed in rats after two weeks and one month of intoxication, including increased platelet aggregation and fibrinogen concentration and shortened activated partial thromboplastin time and prothrombin time. During the same period, increased antithrombin and fibrinolytic activities were observed. The depressed activity of the cellular component of hemostasis evident as thrombocytopenia and impaired ADP-induced platelet aggregation was detected after two months of intoxication. A tendency to decrease in fibrinogen concentration was observed. The shortened activated partial thromboplastin time and thrombin time were associated with prolonged prothrombin time. At the same time, inhibition of the anticoagulant component of hemostasis (decreased antithrombin III activity), exhaustion of the fibrinolysis system reserve (delayed fXIIa-dependent euglobulin lysis), and a significant increase in soluble fibrin monomeric complexes indicative of thrombinemia were observed. After two weeks, one and two months of nickel intoxication, a correlation was found between the major indices of the hemostasis system and the activities of lipid peroxidation and antioxidant enzymes. **Conclusion.** The study confirmed a relationship between the lipid peroxidation activity and the hemostasis system, specifically in chronic nickel intoxication. This result allows to recommend the use of antioxidants in developing methods for correction of hemostatic induced affected by heavy metals.

**Keywords:** nickel; lipid peroxidation; hemostasis.

**For citation:** Gagloeva E.M., Brin V.B., Skupnevskiy S.V., Botsieva N.V., Moldovan T.V. Effects of nickel chloride on indices of hemocoagulation and lipid peroxidation in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1): 83-90. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.83-90

**For correspondence:** Brin Vadim Borisovich, Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Normal Physiology, North Ossetian State Medical Academy, Russia Ministry of Health, Vladikavkaz, Russia, 362019, North Ossetia–Alania, Pushkinskaya 40, e-mail: vbbrin@yandex.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Gagloeva E.M., <https://orcid.org/0000-0002-7220-1798>

Brin V.B., <https://orcid.org/0000-0001-8382-3210>

Skupnevskiy S.V., <https://orcid.org/0000-0002-6233-5944>

**Received** 11.03.2018

Botsieva N.V., <https://orcid.org/0000-0003-3829-3331>

Moldovan T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6055-7092>

## Введение

Распространенность и длительность воздействия тяжелых металлов на организм человека обусловлены антропогенным загрязнением окружающей среды [1, 2]. Ранее было показано, что введение в организм животных солей тяжелых металлов оказывает патогенное влияние на сердечно-сосудистую систему, приводит к развитию артериальной гипертензии и кардиопатии, токсической нефро- и гепатопатии [2 – 4]. Установлено, что ведущими механизмами таких эффектов являются мембранотропное действие и оксидативный стресс [2, 5].

Известно, что при воздействии на организм любых неблагоприятных факторов одним из механизмов формирования адаптивного ответа является реакция свертывающей системы крови [6, 7]. Артериальная гипертензия, патология печени и почек, оксидативный стресс могут сопровождаться развитием коагулопатий [6, 8]. Роль тяжелых металлов в развитии коагулопатий недостаточно изучена. Существуют лишь единичные и противоречивые данные, где сообщается о разнонаправленных изменениях в системе гемостаза под влиянием различных соединений тяжелых металлов. Имеются сведения о том, что тяжелые металлы обладают прокоагу-

лянтной активностью в последовательности  $Ni^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+}$ , обусловленной Хагеман-зависимой активацией внутреннего пути свертывания крови [9]. Токсическое влияние свинца [10], ртути и кадмия [11] на мембраны тромбоцитов приводит к увеличению их адгезивной и агрегационной активности, освобождению индукторов агрегации и вторичной активации коагуляционного звена гемостаза. Напротив, при никелевой интоксикации выявлены изменения системы гемостаза, проявляющиеся тенденцией к снижению агрегационной активности тромбоцитов у человека [12]. Такая противоречивость и разрозненность сведений определили цель настоящего исследования: изучить состояние системы гемостаза при хронической интоксикации хлоридом никеля, исследовать взаимосвязь показателей гемокоагуляции с процессами липопероксидации у крыс в эксперименте.

## Методика

Опыты проводились на крысах самцах Вистар массой 200–300 гр. Раствор хлорида никеля (II) вводили через атравматичный зонд в желудок (5 мг/кг) ежедневно в течение 2 нед (n=10 крыс), 1 и 2 мес (n=10 в каждом). При этом в единице раствора, равной 0,2 мл, со-

держалось 0,5 мг никеля (расчет по металлу), что не считается водной нагрузкой. Контролем служили 20 интактных животных с внутривенным введением соответствующего количества питьевой воды.

По окончании экспериментов у крыс под тиопенталовым наркозом (0,4 г на 100 гр) брали кровь из печеночного синуса. Стабилизацию и получение образцов плазмы крови осуществляли с учетом международных стандартов по клинической лабораторной диагностике для исследований гемостаза [6, 13]. Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с 11-й статьёй Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации, «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных» (1985) и правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199). Работа одобрена этической комиссией института.

Для оценки состояния гемостаза определяли: агрегацию тромбоцитов по G. Born [14] (агрегометр «Solar», индуктор – ADP, конечная концентрация 10,0 мкг/мл); спонтанную агрегацию тромбоцитов выявляли после включения магнитной мешалки без внесения индуктора [15]; активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ); протромбиновое время (ПВ); лебетоксовое время (ЛЕТ) [16], тромбиновое время (ТВ); содержание фибриногена по методу Клаусса; концентрацию растворимых фибрин–мономерных комплексов (РФМК) определяли с помощью количественного варианта фенантролинового теста [17]; активность антитромбина III (АТ III); XIIa- калликреин зависимый фибринолиз (XIIa-ЗЛ) [13]. Исследование гемокоагуляционных свойств крови проводилось по стандартным методикам [6, 13] с применением диагностических наборов фирмы «Технология стандарт», (Россия). Для оценки липидпероксидации и антиоксидантного потенциала определяли содержание: метгемоглобина по стандартной методике [18], малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах [19], гидроперексид (ГП- диеновых конъюгатов и диеновых кетонов) в плазме крови [20], церулоплазмина (медная оксидаза) по реакции с п–фенилендиамином в ацетатном буфере [18]; исследовали активность супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах [21], активность каталазы по методу E. Beutler [18]. Тесты выполнялись на спектрофотометре «Solar-300», турбидиметрическом коагулометре «CGL–2110» и агрегометре «AP–2110» Solar (Беларусь).

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.), Microsoft Excel 2003. Для ко-

личественной оценки данных рассчитывались статистические показатели с вычислением медианы (Me) и [25–75] перцентилей выборки. Для оценки статистической значимости различий использовался непараметрический U-критерий Манна–Уитни [22]. Для анализа силы взаимосвязей между исследуемыми параметрами рассчитывали коэффициент ранговой корреляции (г<sub>s</sub>) Спирмена. Для всех тестов статистически значимыми считались различия, уровень значимости которых отвечал условию  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Через 2 нед введения раствора хлорида никеля (II) через зонд в желудок у крыс выявлялась гиперкоагуляционная направленность изменений системы гемостаза (табл. 1). Наблюдалось увеличение агрегационной активности тромбоцитов и тенденция к возрастанию их количества в крови. Регистрировалось снижение АЧТВ (табл. 1). Содержание фибриногена в плазме увеличивалось. Это подтверждает данные о том, что активация системы гемостаза является одним из универсальных механизмов реализации и поддержания патохимических и патофизиологических реакций стресса в организме [7, 17].

Введение  $Ni^{2+}$  в течение 1 мес приводило у подопытных животных к росту прокоагулянтной активности. Выявлялась спонтанная агрегация тромбоцитов в 20% случаев. У крыс контрольной группы спонтанная агрегация отсутствовала. Степень АДФ–индуцированной агрегации тромбоцитов статистически значимо возрастала (табл. 1), сохранялась тенденция к увеличению количества тромбоцитов в плазме крови. Изменения плазменного гемостаза характеризовались хронометрической гиперкоагуляцией (по укорочению АЧТВ и ПВ). Содержание фибриногена сохранялось выше уровня контроля, но уменьшалось по сравнению с данными, полученными через 2 нед. Увеличение коагуляционного потенциала сопровождалось активацией противосвёртывающих и фибринолитических механизмов, о чем свидетельствуют увеличение активности АТ III и уменьшение времени XIIa–зависимого фибринолиза.

Длительное токсическое воздействие никеля (введение в течение 2 мес) приводит к коагуляционному дисбалансу, при этом в процесс вовлекается как начальный, так и конечный этапы гемокоагуляции. Наблюдается подавление активности клеточного звена гемостаза–тромбоцитопения. Выявляется ослабление степени АДФ–индуцируемой агрегации тромбоцитов относительно данных, полученных у опытных животных (табл. 1). Введение никеля в течение 2 мес при-

водит к ослаблению первоначально АДФ-индуцируемой агрегации тромбоцитов, наблюдаемой после введения никеля в течение 1 мес, но до уровня чуть выше значения в группе контроля.

После интоксикации никелем в течение 2 мес также регистрировалось увеличение протромбинового времени, что указывает на нарушения во внешнем пути гемокоагуляции. В данных условиях эксперимента можно высказать предположение о наличии дефицита факторов протромбинового комплекса (II, VII, X) вследствие их усиленного потребления при длительной стимуляции свертывающей системы крови, либо о наличии нарушения их синтеза вследствие уменьшения белково-синтетической функции печени при хронической интоксикации. Согласно ранее полученным данным, при никелевой интоксикация развивается токсическое поражение печени: выраженная паренхиматозная дистрофия гепатоцитов, венозное полнокровие, очаговые кровоизлияния, лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы у крыс [4]. В то же время показатели лебетоксового теста (ЛЕТ) от контрольных данных не отличались. Коагулаза яда гюрзы (лебетокс) запускает процесс свертывания крови путем активации фактора X в присутствии фактора V и ионов Ca<sup>2+</sup>. При

дефиците фактора X время свертывания в лебетоксовом тесте возрастает [16], а при дефиците фактора VII коагуляционный эффект лебетокса не ослабляется в отличие от протромбинового теста (ПВ). Можно полагать, что выявленное нами изолированное увеличение времени свертывания по ПВ при нормальном ЛЕТ свидетельствует о снижении активности VII фактора. Среди всех факторов, синтезируемых в печени, VII фактор является наиболее чувствительным маркером печеночного повреждения [8], что связано с коротким временем его полужизни. В то же время совпадение результатов ЛЕТ в опытных и контрольных образцах плазмы крови в наших исследованиях говорит о том, что изменения активности факторов X, V, II и I компенсированы. Показано, что эффективное функционирование системы гемостаза возможно даже при значительном снижении содержания фактора VII в плазме крови, поскольку он выполняет свою единственную функцию в системе свертывания крови – индукцию коагуляционного гемостаза [6, 8, 13].

К концу 2-месячной интоксикации никелем выявлялось сокращение АЧТВ, регистрировалось ускоренное образование фибрина (по снижению протромбинового времени). Вместе с тем, происходило подавление

Таблица 1

**Влияние хлорида никеля на показатели системы гемостаза у крыс при хронической интоксикации в дозе 5 мг/кг массы тела по металлу**

Параметры	Контроль Интактный	NiCl <sub>2</sub> 2 нед	NiCl <sub>2</sub> 1 мес	NiCl <sub>2</sub> 2 мес
Количество тромбоцитов, 10 <sup>9</sup> /л	566 [499–575]	627 [549–664]	604 [539–641]	297 ***/ΔΔΔ [290–351]
АДФ-агрегация тромбоцитов, %	57,13 [46,67–60,88]	71,41 * [63,12–75,6]	75,34 ** [66,62–85,02]	60,28 ΔΔ [51,09–61,51]
Протромбиновое время, с	17,25 [15,37–19,98]	16,48 [14,1–16,73]	14,3 * [13,47–16,66]	21,25 */ΔΔ [19,4–22,08]
Лебетоксовое время, с	23,22 [20,47–25,89]	24,21 [20,22–26,8]	21,57 [20,37–24,22]	25,52 [21,4–27,33]
АЧТВ, с	27,32 [27,03–29,36]	23,48 *** [22,48–25,37]	22,45 *** [21,92–24,48]	22,28 *** [20,90–25,58]
Тромбиновое время, с	23,49 [22,49–24,37]	22,78 [21,85–25,0]	23,26 [22,85–25,96]	18,84 ***/ΔΔ [17,63–20,34]
Фибриноген, г/л	2,05 [1,99–2,95]	4,81 *** [4,35–5,4]	3,92 **/◇ [2,77–4,09]	1,94 ΔΔΔ [1,82–2,35]
XIIa – ЗЛ, с	682,3 [664,7–732,9]	593,5 [567–719]	480,49 *** [454,48–606,29]	856 *** /ΔΔΔ [798–1044]
Антитромбин (III), %	100,2 [95,27–112,03]	102,3 [100,4–117,5]	125,68 ** [109,12–127,048]	79,64 ***/ ΔΔΔ [77,26–91,21]
РФМК, мг/100мл	3,59 [2,65–4,0]	3,68 [2,88–4,14]	4,21 [3,28–4,94]	5,77 **/ΔΔ [4,43–6,17]

*Примечание.* Данные представлены в виде медианы, [25–75] проценти выборки, p – уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей: / \* / \*\* / \*\*\* / – p ≤ /0,05 / 0,01 / 0,001/ – степень статистической значимости относительно контроля; / ◇ / – p ≤ /0,05 / 0,01 / 0,001/ –относительно опыта с NiCl<sub>2</sub> через 2 нед; / Δ / ΔΔ / ΔΔΔ / – p ≤ /0,05 / 0,01 / 0,001/ – относительно опыта с NiCl<sub>2</sub> через 1 мес; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы, XIIa – ЗЛ – фактор Хагеман зависимый лизис.

активности АТ III и увеличение времени лизиса эуглобулиновой фракции плазмы. При этом уровень фибриногена снижался, приближаясь к контрольным значениям, относительно данных у опытных крыс, которым никель вводился в течение 1 мес. Содержание РФМК увеличилось, что свидетельствует о наличии гипертромбинемии [6]. Выявленные сдвиги гемостазиологических показателей могут указывать на формирование состояния «претромботической готовности» [13, 17] у экспериментальных животных через 2 мес введения соли никеля.

К настоящему времени накоплен богатый фактический материал, позволяющий выделить в качестве ведущего механизма нарушения клеточного метаболизма – активацию перекисного окисления липидов и окислительный стресс. Сведения о параллельной активации процессов липопероксидации и свертывания крови [23], а также данные о способности антиоксидантов ограничивать гемокоагуляционные сдвиги [12, 23] обосновали необходимость изучения взаимосвязи между свободнорадикальными процессами и гемостазом при хронической никелевой интоксикации, что до сих пор детально не исследовалось.

Данные, полученные у опытных животных, демонстрируют развитие окислительного стресса при хронической никелевой интоксикации, активацию прооксидантных процессов и угнетение антиоксидантного ферментного звена (табл. 2). Причем, выраженность патологических изменений фиксируется в логике «время экспозиции – ответ». Качественно схожие выводы о стрессогенном эффекте никеля были также получены

исследователями, изучавшими его действие на различные биосистемы [24].

Более детальный анализ данных табл. 2 показывает, что введение раствора хлорида никеля (II) сопровождается значительным нарастанием в крови животных опытной группы нефункционального пигмента – метгемоглобина. В основе этих данных могут лежать различные по своему механизму процессы. Во-первых, никель, являясь тяжелым металлом, относится к классу тиоловых ядов, тем самым обладая способностью ингибировать активность метгемоглобинредуктазы. Во-вторых, как видно из табл. 2, экспозиция хлоридом никеля приводит к липопероксидации, что неизбежно сопровождается истощением эндогенных восстановительных субстратов клетки, которые служат источником восстановительного потенциала для перевода MetHb–Fe(III)→Hb–Fe(II) с помощью метгемоглобинредуктазы.

Определенный интерес вызывают данные о низком содержании гидроперекисей (диеновых конъюгатов и диеновых кетонов) в плазме животных опытных групп (относительно интактной). Исходя из механизма их образования, логично было бы предположить, что данное обстоятельство является благоприятным прогностическим фактором, свидетельствующим об ингибировании процессов перекисной направленности. Однако, данная гипотеза не согласуется с результатами анализов измерения ТБК– активных веществ в крови (по наиболее характерному маркеру – МДА). Поэтому можно высказать предположение, что низкий уровень гидроперекисей не связан с улучшением

Таблица 2

**Влияние хлорида никеля на показатели системы ПОЛ–АОЗ у крыс при хронической интоксикации в дозе 5 мг/кг массы тела по металлу**

Параметры	Контроль интактный	Опыт – NiCl <sub>2</sub> в течение 2 нед	Опыт – NiCl <sub>2</sub> в течение 1 мес	Опыт – NiCl <sub>2</sub> в течение 2 мес
Метгемоглобин (%)	0,082 [0,062–0,111]	0,105 [0,095–0,137]	0,404**/◇◇ [0,209–0,442]	0,726**/△△ [0,454–0,745]
Малоновый диальдегид (мкмоль/л)	28,14 [27,74–29,89]	34,85*** [32,43–35,53]	41,61***/◇◇ [36,41–42,04]	47,62***△ [40,88–48,02]
Содержание гидроперекисей (233 нм)	0,0613 [0,0496–0,0768]	0,066 [0,0389–0,676]	0,0688 [0,0454–0,0726]	0,0229***/△△△ [0,0198–0,0304]
Содержание гидроперекисей (278нм)	0,0348 [0,025–0,039]	0,0204* [0,0202–0,0298]	0,0203*** [0,0153–0,0207]	0,018*** [0,0136–0,0193]
Церулоплазмин мг/л	254,7 [224,1–288,89]	300,45 [268,06–335,94]	378,4***/◇◇ [369,2–460,3]	510,3***/△△ [444,08–551,4]
Активность супероксиддисмутазы (ед.ингибир.,%)	72,18 [63,98–72,63]	69,09 [63,08–69,65]	61,71* [60,65–69,45]	57,88** [57,11–65,13]
Активность каталазы (*10 <sup>-4</sup> ME/rHb)	6,72 [5,02–7,23]	6,30 [4,70–6,78]	5,2 [4,45–6,09]	4,37* [4,0–5,39]

*Примечание.* Данные представлены в виде медианы, [25–75] проценти выборки, p – уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей: / \* / \*\* / \*\*\* / – p ≤ /0,05 / 0,01 / 0,001/ – степень достоверности относительно контроля / ◇ / ◇◇ / ◇◇◇ / – p ≤ /0,05 / 0,01 / 0,001/ – относительно опыта с NiCl<sub>2</sub> через 2 нед. / △ / △△ / △△△ / – p ≤ /0,05 / 0,01 / 0,001/ – относительно опыта с NiCl<sub>2</sub> через 1 мес.

картины (что особенно заметно на 2-м мес интоксикации никелем). Это может быть обусловлено адаптационным срывом и истощением биоантиоксидантного пула, молекулы которого способны выступать в роли эффективных радикальных ловушек [25]. Результатом этого является линейное нарастание в крови уровня МДА, являющегося вторичным продуктом перекисной деструкции мембран клеток.

Состояние антиоксидантной системы в наших исследованиях охарактеризовано на основании изучения активности трех базовых ферментов: церулоплазмينا, супероксиддисмутазы и каталазы. Из табл. 2 видно, что поступление никеля (5 мг/кг) в организм животных во все сроки исследования приводит к увеличению содержания церулоплазмينا, определяющего активность СОД в плазме. Наибольший адаптивный эффект нарушен в группе, получавшей никель в течение 2 мес. Отмечается также [26], что экспонирование крыс солями никеля приводит к статистически значимому увеличению (более чем в 1,3 раза) в сыворотке крови меди, входящей в активный центр металлофермента.

Интрацеллюлярное звено антиоксидантной защиты, напротив, характеризуется планомерным снижением активности ферментов СОД и каталазы. К 2-й нед интоксикации фиксируется лишь общая отрицательная тенденция, отличия между опытной и контрольной группами статистически незначимы. Хроническое же поступление хлорида никеля приводит к выраженным изменениям, причем одним из механизмов отмеченной нами активации ПОЛ, может являться ослабление ферментативного звена антиоксидантной защиты, ведущее к инициации свободнорадикальных процессов. Таким образом, поступление хлорида никеля в организм животных сопровождается дисбалансом в системе ПОЛ – антиоксидантной защиты в сторону активации прооксидантного направления, а степень выявленных патологических изменений находится в прямой зависимости от длительности интоксикации.

Корреляционный анализ результатов проведенных экспериментов с никелевой интоксикацией в течение 2 мес выявил определенные взаимосвязи между показателями системы гемостаза и характером сдвигов ПОЛ–АОЗ у экспериментальных животных, причем сила и статистическая значимость связей возрастала соответственно длительности интоксикации.

Через 2 нед эксперимента выявлялась связь между уровнем МДА и степенью АДФ-агрегации тромбоцитов: коэффициент ранговой корреляции Спирмена  $r_s=0,67$ ;  $p<0,05$ . Выявлялась достоверная связь с увеличением концентрации фибриногена в плазме крови

( $r_s=0,76$ ,  $p<0,02$ ), что подчеркивает значение свободнорадикального окисления в развитии интоксикации.

Через 1 мес экспериментов возрастала сила связей МДА с изменением степени АДФ агрегации тромбоцитов ( $r_s=0,91$ ;  $p<0,001$ ) и уровня фибриногена в плазме крови ( $r_s=0,88$ ,  $p<0,01$ ). Выявлена корреляция с ростом АТ III ( $r_s=0,68$ ;  $p<0,05$ ) и сокращением времени эуглобулинового фибринолиза ( $r_s=-0,72$ ,  $p<0,05$ ).

К концу эксперимента (через 2 мес интоксикации) выявлена значимая положительная корреляция АТ III с активностью антиоксидантных ферментов СОД ( $r_s=0,77$ ;  $p<0,02$ ) и каталазой ( $r_s=0,73$ ;  $p<0,05$ ). Выявлялась высокая степень корреляции показателей фибринолитической системы (по времени ХПа–ЗЛ) со снижением СОД и энзиматической активностью каталазы ( $r_s=-0,84$ ;  $p<0,01$  и  $r_s=-0,69$ ;  $p<0,05$ ), что может свидетельствовать о роли свободнорадикального окисления в угнетении фибринолиза при никелевой интоксикации. Тесно положительно ассоциированы сдвиги показателей РФМК и сдвиги МДА ( $r_s=0,77$ ;  $p<0,02$ ), а со сдвигами СОД отрицательно и менее тесно ( $r_s=-0,65$ ;  $p<0,05$ ).

## Заключение

Проведенные исследования показали, что внутрижелудочное введение хлорида никеля ежедневно в течение 2 мес способствует развитию токсической коагулопатии. Полученные данные подтверждают существование взаимосвязи активности процессов липопероксидации и системы гемостаза [23, 27, 28], а также наличие связи данных у крыс при хронической никелевой интоксикации. Результаты исследования позволяют рекомендовать применение антиоксидантов для разработки способов коррекции гемостатических сдвигов при воздействии на организм тяжелых металлов.

## Литература

1. Авцын А.П., Жаворонков М.А., Риш Л.С., Строчкова С.С. *Микроэлементозы человека*. М.; Медицина; 1991.
2. Дзугоева Ф.С., Такоева Е.А. Патобиохимические механизмы токсического влияния хлорида никеля в эксперименте у крыс. *Вестник новых медицинских технологий*. 2009; 16(3): 36–7.
3. Брин В.Б., Кокаев Р.И. Эффекты хлорида никеля на фоне кальцитонин-опосредованной гипокальциемии. *Владикавказский медико-биологический вестник*. 2015; 21(31): 19–24.
4. Албегова Ж.К., Брин В.Б., Молдован Т.В., Закс Т.В. Влияние хронической интоксикации хлоридом никеля на морфологические изменения внутренних органов и накопление металла у крыс. *Вестник новых медицинских технологий*. 2011; 18 (1): 159–61.
5. Arif Tasleem Jan, Mudsser Azam, Kehkashan Siddiqui, Arif Ali, Inho Choi, Qazi Mohd. Rizwanul Haq. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of



- Antioxidants. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16: 29592–630 (www.mdpi.com/journal/ijms).
6. Петрищев Н.Н., Папаян Л.П. *Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний.* СПб; 1999.
  7. Киселёв В.И., Шахматов И.И., Вдовин В.М., Лычева Н.А., Алексеева О.В. Бондарчук Ю.А. и др. Однократное длительное действие стрессоров различной природы в развитии ДВС-синдрома у крыс. *Бюллетень сибирской медицины.* 2014; 13(6): 131–8.
  8. Батырова А.С., Баканов М.И., Сурков А.Н. Современные представления о системе гемостаза при хронических заболеваниях печени. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015; (8): 40–7.
  9. Mutch NJ1, Waters EK, Morrissey JH. Immobilized transition metal ions stimulate contact activation and drive factor XII-mediated coagulation. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(10): 2108–15. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04890.x.
  10. Podolyan S.K. Effect of lead chloride on the system of regulation of the aggregate state of blood in white rats. *Bukovins'kiy medichniy visnik.* 1998; 3: 131–6. (in Ukrainian).
  11. Arbi S, Oberholzer HM, Van Rooy MJ, Venter C, Bester MJ. Effects of chronic exposure to mercury and cadmium alone and in combination on the coagulation system of Sprague–Dawley rats. *Ultrastruct Pathol.* 2017; 15: 1–9. DOI:10.1080/01913123.2017.1327909
  12. Chen C.Y., Lin T.H. Effects of nickel chloride on human platelets: enhancement of lipid peroxidation, inhibition of aggregation and interaction with ascorbic acid. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A.* 2001; 62(6): 431–8.
  13. Баркаган З.С., Момот А.П. *Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза.* Ньюдиамед–АО; 2008.
  14. Born G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962; 194(9): 927–9.
  15. Лапотников В.А., Хараш Л.М. Возможности метода определения спонтанной агрегации тромбоцитов. *Военно-медицинский журнал.* 1982; (8): 68–9.
  16. Баркаган З.С., Цывкина Л.П. *Диагностика нарушений гемостаза с помощью змеиных ядов. Методические рекомендации МЗ СССР.* Москва; 1988.
  17. Момот А.П., Цывкина Л.П., Тараненко И.А. *Современные методы распознавания тромбоцитарной готовности.* Барнаул: Издательство Алтайского университета; 2011.
  18. Данилова Л.А. *Справочник по лабораторным методам исследования.* СПб.; Питер; 2003.
  19. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids.* 1980; 15: 137–40.
  20. Камышников В.С. *Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. Справочник.* Мн.; Интерпрессервис; 2003.
  21. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопросы медицинской химии.* 1999; 45(3): 263–72.
  22. Стентон Гланц. *Медико-биологическая статистика.* М.; Практика; 1999.
  23. Бышевский А.Ш., Карпова И.А., Полякова В.А. *Внутрисосудистое свертывание крови, коагулоактивность тромбоцитов и толерантность к тромбину.* М.; 2015.
  24. Chang–Yu Chen. Nickel–induced plasma lipid peroxidation and effect of antioxidants in human blood: involvement of hydroxyl radical formation and depletion of alpha–tocopherol. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 2002; 189: 843–52.
  25. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2007; 3: 2–18.
  26. Manoj Misra. Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology.* 1990; 64: 1–17.
  27. Зубаиров Д.М. Современные доказательства концепции непрерывного свертывания крови в организме. *Тромбоз, гемостаз и реология.* 2010; 1: 17–21.
  28. Кузник Б. И. *Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии: монография.* Чита: Экспресс-издательство; 2010. (ISBN 978-5-9566-0253-9).

## References

1. Avcyn A.P., Zhavoronkov M.A., Rish L.C., Strochkova S.S. *Microelementoses of man. [Mikroelementozy cheloveka].* Moscow; Meditsina; 1991. (in Russian)
2. Dzugkoeva F.S., Takoeva E.A. Pathobiochemical mechanisms of toxic effect of nickel chloride in experiments in rats. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy.* 2009; 16(3): 36–7. (in Russian)
3. Brin V.B., Kokaev R.I. Effects of nickel chloride on the background of calcitonin-mediated hypocalcemia. *Vladikavkazskiy medikobiologicheskii vestnik.* 2015; 21(31): 19–24. (in Russian)
4. Albegova Zh.K., Brin V.B., Moldovan T.V., Zaks T.V. Effect of chronic intoxication with nickel chloride on the morphological changes in internal organs and the accumulation of metal in rats. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy.* 2011; 18 (1): 159–61. (in Russian)
5. Arif Tasleem Jan, Mudsser Azam, Kehkashan Siddiqui, Arif Ali, Inho Choi, Qazi Mohd. Rizwanul Haq. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16: 29592–630 (www.mdpi.com/journal/ijms).
6. Petrishhev N.N., Papayan L.P. *Hemostasis. Physiological mechanisms, principles of diagnosis of the main forms of hemorrhagic diseases. [Fiziologicheskiye mekhanizmy, printsipy diagnostiki osnovnykh form gemorragicheskikh zabolevaniy].* Sankt–Peterburg; 1999. (in Russian)
7. Kisel'ov V.I., Shahmatov I.I., Vdovin V.M., Lycheva N.A., Alekseeva O.V., Bondarchuk Ju.A. et al. A single long-term action of stressors of different nature in the development of DIC syndrome in rats. *Bulleten' sibirskoy meditsiny.* 2014; 13(6): 131–8. (in Russian)
8. Batyrova A.S., Bakanov M.I., Surkov A.N. Modern ideas about the system of hemostasis in chronic liver diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2015; 8: 40–7. (in Russian)
9. Mutch NJ1, Waters EK, Morrissey JH. Immobilized transition metal ions stimulate contact activation and drive factor XII-mediated coagulation. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(10): 2108–15. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04890.x.
10. Podolyan S.K. Effect of lead chloride on the system of regulation of the aggregate state of blood in white rats. *Bukovins'kiy medichniy visnik.* 1998; 3: 131–6. (in Ukrainian)
11. Arbi S, Oberholzer HM, Van Rooy MJ, Venter C, Bester MJ. Effects of chronic exposure to mercury and cadmium alone and in combination on the coagulation system of Sprague–Dawley rats. *Ultrastruct Pathol.* 2017; 15: 1–9. DOI:10.1080/01913123.2017.1327909
12. Chen C.Y., Lin T.H. Effects of nickel chloride on human platelets: enhancement of lipid peroxidation, inhibition of aggregation and in-

- teraction with ascorbic acid. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 2001; 62(6): 431–8.
13. Barkagan Z.S., Momot A.P. *Diagnosis and controlled therapy of hemostasis disorders. [Diagnostika i kontroliruyemaya terapiya narusheniya gemostaza]*. N'yudiamed—AO; 2008. (in Russian).
  14. Born G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962; 194(9): 927–9.
  15. Lapotnikov VA, Kharash LM Possibilities of the method for determining spontaneous platelet aggregation. *Voyenno-med. zhurn*. 1982; (8): 68-9. (in Russian)
  16. Barkagan Z.S., Cыvkina L.P. *Diagnosis of violations of hemostasis with the help of snake venoms. [Diagnostika narusheniya gemostaza s pomoshch'yu zmeinykh yadov]*. Methodical recommendations of the Ministry of Health of the USSR. Moscow; 1988. (in Russian)
  17. Momot A.P., Cыvkina L.P., Taranenko I.A. *Modern methods of recognition of thrombotic readiness. [Sovremennyye metody raspoznavaniya tromboticheskoy gotovnosti]*. Barnaul, Izdatel'stvo Altayskogo universiteta; 2011. (in Russian)
  18. Danilova L.A *Handbook on laboratory methods of research. [Spravochnik po laboratornym metodam issledovaniya]*. Sankt Peterburg, Piter; 2003. (in Russian)
  19. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*. 1980; 15: 137–40.
  20. Kamyshnikov V.S. *Clinical and biochemical laboratory diagnostics. Directory. [Kliniko—biokhimicheskaya laboratornaya diagnostika. Spravochnik]*. Mn.: Interpresservis; 2003. (in Russian)
  21. Sirota T.V. A new approach in the study of the process of auto oxidation of adrenaline and its use for measuring the activity of superoxide dismutase. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1999; 45(3): 263–72. (in Russian)
  22. Stenton Glanc. *Medico-biological statistics. [Mediko-biologicheskaya statistika]*. Moscow; Praktika; 1999. (in Russian)
  23. Byshevskiy A.Sh., Karpova I.A., Polyakova V.A. *Intravascular coagulation, coaguloactivity of thrombocytes and tolerance to thrombin. [Vnutrisosudistoye svertyvaniye krovi, koaguloaktivnost' trombotsitov i tolerantnost' k trombinu]*. Moscow; 2015. (in Russian)
  24. Chang—Yu Chen. Nickel—induced plasma lipid peroxidation and effect of antioxidants in human blood: involvement of hydroxyl radical formation and depletion of alpha—tocopherol. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2002; 189: 843–52.
  25. Sazontova T.G., Arkhipenko Yu.V. Implications of the balance between pro-oxidants and anti-oxidants — equisignificant components of metabolism. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2007; 3:2-18. (in Russian)
  26. Manoj Misra. Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology*. 1990; 64: 1–17.
  27. Zubairov D.M. Modern evidence of the concept of continuous blood clotting in the body. *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2010; 1: 17-21.
  28. Kuznik B.I. Cellular and molecular mechanisms of hemostasis regulation in norm and pathology: monograph. *[Kletochnyye i molekulyarnyye mekhanizmy regulyatsii sistemy gemostaza v norme i patologii: monografiya]*. Chita: Ekspres-izdatel'stvo; 2010. (ISBN 978-5-9566-0253-9). (in Russian)

#### Сведения об авторах:

**Брин Вадим Борисович**, доктор мед. наук, проф., зав каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО СОГМА; зав. отделом физиологии и патологии висцеральных систем ФГБУН ВНЦ РАН и РСО-А;

**Гаглоева Эльмира Муратовна**, канд. мед. наук, ассистент каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО СОГМА;

**Скупневский Сергей Валерьевич**, канд. биол. наук, доцент каф. химии и физики ФГБОУ ВО СОГМА; зав. отделом медико-генетических исследований ФГБУН ВНЦ РАН и РСО-А;

**Боцьева Надежда Викторовна**, канд. мед. наук, доцент каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО СОГМА;

**Молдован Татьяна Васильевна**, канд. мед. наук, доцент каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО СОГМА.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.155.321:57.053

**Бабаева А.Г.<sup>1</sup>, Геворкян Н.М.<sup>2</sup>, Тишевская Н.В.<sup>3</sup>**

# Адаптивная изменчивость суммарной РНК лимфоидных клеток как причина невоспроизводимости вызываемых ею эффектов

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека», 117418, г. Москва, Россия, ул. Цюрупы, д. 3;

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», 119121, г. Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8;

<sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», 454090, г. Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64

В обзоре анализируются причины невоспроизводимости эффектов лимфоцитарной РНК в процессах регенерации и иммуногенеза. Подчеркивается необходимость учета изменчивости свойств РНК при изменении функционального режима лимфоцитов в разных фазах регенерационного процесса и иммунного ответа. Рассмотренные в обзоре вопросы имеют решающее значение для разработки нового фармакотерапевтического направления по созданию оригинальных лечебных препаратов на основе органных РНК, не имеющих аллогенного и ксеногенного ограничений.

**Ключевые слова:** регенерация; иммуногенез; лимфоцитарная РНК; процессы развития.

**Для цитирования:** Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. Адаптивная изменчивость суммарной РНК лимфоидных клеток как причина невоспроизводимости вызываемых ею эффектов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(1): 91-98.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.91-98

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

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

**Для корреспонденции:** Геворкян Нина Михайловна, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

**Поступила** 27.09.2017

**Babaeva A.G.<sup>1</sup>, Gevorkyan N.M.<sup>2</sup>, Tishevskaya N.V.<sup>3</sup>**

## ADAPTIVE VARIABILITY OF TOTAL RNA IN LYMPHOID CELLS AS A CAUSE FOR NON-REPRODUCIBILITY OF ITS EFFECTS

<sup>1</sup>Scientific-Research Institute of Human Morphology of the Russian Academy of Medical Sciences,

3 Tsyurupy str., 117418, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Scientific-Research Institute of Biomedical Chemistry V.N. Orekhovicha Russian Academy of Medical Sciences,

10 Pogodinskaya str., 119121, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>South Ural State Medical University,

64 Vorovsky str., 454092, Chelyabinsk, Russia

A review of the analysis of the causes of non-reproducibility of the effects of lymphocyte RNA during regeneration and immunogenesis. The necessity to take into account the variability of RNA properties when the functional regimen of lymphocytes varies in different phases of regenerative process and immune response is emphasized.

**Keywords:** regeneration; immunogenesis; lymphocyte RNA; developmental processes.

**For citation:** Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V. Adaptive variability of total RNA in lymphoid cells as a cause for non-reproducibility of its effects. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1): 91-98. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.91-98

**For correspondence:** Gevorkyan N.M., e-mail: gevorkiann@yandex.ru

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

**Received** 27.09.2017

За последние годы изучение эффектов РНК, которые указывают на возможность их использования в медицинской практике, вызывает особый интерес. Уже создано немало РНК-содержащих препаратов, которые пополнили арсенал лечебных средств. Источником РНК для их изготовления служат в основном либо пекарские дрожжи, либо органы и ткани крупного рогатого скота (КРС). Различают четыре разновидности препаратов РНК: 1) дрожжевые, 2) органные, 3) лимфоцитарно-макрофагальные, активированные иммунным процессом и 4) лимфоцитарно-макрофагальные, активированные репаративными процессами, (морфогенетически активные. Нами обнаружено, что экзогенная суммарная РНК интактных лимфоидных клеток также обладает высоким морфогенетическим потенциалом [1]. Лечебное действие этих препаратов разное и пока охарактеризовано лишь кратко из-за отсутствия достаточных сведений. Так, препараты РНК из дрожжей (НКАД, нуклеинат натрия, ридостин, полирибонат, виталанг-2) оказывают выраженное неспецифическое стимулирующее действие на иммунную систему. Они усиливают гуморальный иммунный ответ на тимус-зависимый антиген, ускоряют миграцию Т-лимфоцитов и макрофагов, усиливают лейкопоэз.

Особенностью следующей группы препаратов, выделенных из органов и тканей КРС (органные РНК), является их корригирующее действие на пролиферацию и дифференцировку клеток органа, гомологичного органу-источнику суммарной РНК. Действие этих препаратов строго органоспецифично. Показана стимуляция восстановительных процессов печени, миокарда, кости, легких под влиянием суммарной РНК и рибонуклеопротеинов (РНП) гомологичных органов [2, 3]. Отсутствие аллогенного и ксеногенного ограничений в действии РНК дает возможность использовать эти препараты для органотерапии. Так, немецкой фирмой Düscherhoff Pharma создано 50 органных препаратов РНК, в том числе и лимфоидных, объединенных общим названием *Regenerenzen*.

Наиболее изученными являются эффекты, вызываемые экзогенной иммунной РНК (РНК лимфоидных клеток и макрофагов иммунизированных животных). Это самая многочисленная группа препаратов РНК. Многими исследователями показано [4], что препараты иммунной РНК обладают способностью передавать иммунологическую информацию интактным реципиентам, воспроизводить у них все формы иммунного ответа, обеспечивать иммунологическую память и признаки вторичного иммунного ответа, заменять необходимость повторного введения антигена при изготовлении вакцин.

Несмотря на успехи в этом направлении, есть данные, в которых из-за частой невоспроизводимости ука-

занных эффектов ставится под сомнение тот факт, что их обеспечивает именно РНК.

О нестабильности результатов при РНК-терапии упоминают и другие авторы [2, 5]. Однако какова реальная частота невоспроизводимости эффектов РНК, неизвестно. Обычно в публикациях не отражают степень невоспроизводимости экспериментальных и клинических наблюдений, так как практика публикаций отрицательных результатов ограничена лишь случаями опровержения уже устоявшихся фактов.

Это обстоятельство может вызвать серьезные затруднения как в обеспечении эффективности лечения, так и в создании препаратов РНК со стабильными предсказуемыми свойствами. По-видимому, именно это и является причиной странной ситуации, когда при достаточно большом количестве данных об РНК как субстрате, обеспечивающем перенос иммунологической информации и иммунологическую память, упоминания об этом свойстве РНК в современных учебниках нет. Не исключено, что определенную роль в этом сыграл Ф. Бернет [6], который скептически высказывается в отношении открытия Ф. Адлера и М. Фишмэна [7] о возможности переноса иммунологической информации с помощью иммунной РНК. Автор приводит ряд доводов в пользу того, что это открытие может быть артефактом, и, более того, ссылается на такой авторитет в иммунологии, как Н. Эрне, который в частной беседе говорил, что ему не удалось подтвердить эти данные. Как писал известный натуралист Ж. Бюффон, «ничто так не заразительно, как заблуждение, поддерживаемое громким именем». Безусловно, мнение таких авторитетных ученых могло укрепить неуверенность в том, что функцию переноса осуществляет именно иммунная РНК, но оно не может остановить поиск того субстрата, который его осуществляет, так как факт переноса иммунологической информации иммунными лимфоцитами не подвергается сомнению. Следовательно, либо в иммунных лимфоцитах есть другой субстрат, осуществляющий эту функцию, либо не найдены условия, способствующие осуществлению этой функции РНК.

Согласно концепции Лоуренса о «факторе переноса» [8], в лейкоцитах крови доноров при сенсibilизации образуется некий фактор, точная природа и механизм действия которого остаются невыясненными [9]. В виде предположения было указано [10], что фактором переноса является двуспиральная РНК. Большинство же иммунологов сходится во мнении, что «фактор переноса» не существует, что в лейкоцитах есть компоненты, обладающие адьювантным свойством. В то же время Л. Йегер отмечает, что эффекты, вызываемые этим фактором, часто невоспроизводимы [5].

Тем не менее, поиски «фактора переноса» продолжают и по сей день, в том числе и среди разных биологически активных веществ, и среди микро-РНК. Не прекращались также и поиски причин противоречивости данных о переносной способности лимфоцитарной суммарной РНК, на том основании, что если это свойство когда-то проявилось, значит, оно присуще данному субстрату, а отсутствие его выявления связано с невыясненными условиями его функционирования. -

К решению этой проблемы вернулись в связи с появлением новой экспериментальной модели, касающейся морфогенетической функции лимфоцитов, изучения механизмов ее реализации и создания препаратов 4-й группы: суммарной РНК лимфоидных клеток, активированных восстановительными процессами.

Изучение механизмов реализации морфогенетической функции лимфоцитов дает основание утверждать, что невозпроизводимость эффектов РНК, в том числе и иммунной, имеет много скрытых причин, которые не учитываются при попытке их воспроизведения. Причины эти связаны с особыми свойствами как самой лимфоцитарной РНК, так и процессов, происходящих с ее участием. Сходство принципов функционирования лимфоцитов при реализации иммунологической и морфогенетической активностей [1] дает основание предполагать, что причины, обнаруженные при выявлении морфогенетической функции, окажутся сходными с таковыми и в случае иммунной РНК.

Воспроизводимость результатов является одним из самых главных правил экспериментального анализа, позволяющих перевести наблюдаемые явления из разряда предполагаемых в категорию установленных очевидных фактов. Однако невозможность требует особо скрупулезной корректности оценки наблюдаемых морфофункциональных проявлений. Надежность оценки обеспечена строгими правилами и жесткими требованиями к используемым методам исследований и прежде всего к тест-системам. Они должны быть адекватными и однозначно отражающими анализируемое явление. В ряде случаев для установления значимости факта может потребоваться дополнительный анализ. Самые простые примеры – это такие признаки как увеличение массы органа или определение уровня пролиферативной активности по митотическому индексу. Это может быть, как, проявлением реального увеличения морфогенетической активности клеток, так и результатом патологического изменения органа, или отражением замедления процесса пролиферации за счет изменения скорости деления клеток.

Далее мы остановимся лишь на тех методических деталях экспериментального вмешательства, которые нередко не соблюдаются как малозначимые. На самом

деле эти, кажущиеся «малозначимыми», детали, как показал анализ данных литературы и многолетний личный опыт экспериментальной работы, играют решающую роль для правильной оценки изучаемого явления. Они могут коренным образом изменить конечный результат, вызвать его итоговую нестабильность и неоднозначность. То, каким образом и как этот фактор влияет на межтканевые и межклеточные взаимодействия, на взаимодействия между регуляторной системой и ее мишенью, целесообразно проследить на конкретных примерах. Важно то, что подавляющее большинство противоречивых данных выявляется при изучении процессов развития – как в норме, так и при патологии, – особенно в условиях воздействия на них различных факторов с целью их модуляции.

Частота неоднозначных результатов повышается в тех случаях, когда изучается фазовый характер процесса, особенно когда меняется активность модулятора, реактивность органа-мишени и системы регуляции. Незнание этих особенностей процессов развития или невнимательное к ним отношение как раз и могут быть скрытой причиной получения противоречивых эффектов. В нашу задачу входит анализ подобных ситуаций с целью выявления возможных источников ошибочных выводов на примере изучения морфогенетической и иммунологической активностей лимфоидных клеток и их суммарной РНК, изменчивости проявлений их активности при таких фазовых процессах как регенерация и иммуногенез. Из множества процессов развития выбраны именно эти процессы, а в качестве индуктора выбрана суммарная РНК, во-первых, потому, что регуляторная роль лимфоцитов и их РНК при регенерации и при иммунном ответе исследованы довольно планомерно, и мы располагаем большим личным экспериментальным материалом их изучения; во-вторых, четко показана ключевая роль лимфоцитов в реализации регенерационного и иммунного ответов, переноса регенерационной и иммунологической информации и явления регенерационной и иммунологической памяти; в-третьих, установлено, что эти функции лимфоидных клеток обеспечивает выделенная из них суммарная РНК [1, 3], и при адоптивном переносе она воспроизводит эффекты самих клеток, присущие им в момент выделения из них РНК; в-четвертых, способность РНК воспроизводить указанные эффекты лимфоидных клеток может быть использована для изготовления эффективных лечебных препаратов, не имеющих ни аллогенного, ни ксеногенного ограничений.

Морфогенетическую активность лимфоцитов и их суммарной РНК оценивают по их каталитической и индукционной способности воспроизводить и модулировать у реципиента морфогенетические процессы,

цито- и гистогенез, дифференцировку клеток, а также влиять на скорость этих процессов и в целом — на рост органа, его массы. Иммунологическую активность лимфоцитов и их РНК оценивают по их способности воспроизводить различные признаки иммунного ответа, скорость и степень их выраженности.

В целом использованные методы имеют четкие морфологические или функциональные признаки, которые позволяют судить о морфофункциональном состоянии изучаемого органа и получить его количественную оценку. В частности, если речь идет о таком показателе, как митотический индекс или увеличение массы органа, то увеличение этих показателей без дополнительных анализов не означает прогрессивное развитие процесса. Как уже указывалось, повышение митотического индекса может означать не только рост митотической активности, но также и его торможение: удлинение времени митотического цикла, что приводит к накоплению делящихся клеток в препарате. Такая ситуация, к примеру, возникает в результате снижения процессов метаболизма и скорости деления клеток и наблюдается при гипотермии, при злокачественном росте, а также у животных, впадающих в зимнюю спячку.

Некоторые исследователи увеличение митотического индекса в экспериментальных условиях гипотермии трактуют однозначно, без дополнительных доказательств, как увеличение пролиферативной активности. Однако согласно элементарной логике, снижение метаболизма, отмечаемое всеми авторами, приводит к снижению энергетического потенциала, что не может способствовать осуществлению такого энергозатратного процесса, как митоз, особенно преодолению самой энергетически емкой фазы митоза — разделения на дочерние клетки. Поэтому клетки застревают в последней фазе цикла, что приводит к их накоплению в препарате. Именно по этой причине получены данные, которые расцениваются как противоречивые, в то время как на самом деле эти данные подтверждают друг друга. Мышам с опухолью Герена вводили транспортную или рибосомную РНК, полученную из клеток гомологичной опухоли [11]. Это приводило к резкому снижению (на 40%) в опухолевых клетках уровня синтеза ДНК, на фоне которого наблюдалось небольшое (15%) повышение митотического индекса (разнонаправленности этих показателей не бывает!). Следовательно, высокий митотический уровень в опухолевых клетках, расцениваемый как показатель их пролиферативной активности, в ряде случаев отражает замедление процессов деления. Способом проверки достоверности стимуляции митотической активности является определение соотношения фаз митозов, индекса

меченых ядер и митотического индекса, а также увеличение массы опухоли.

Аналогично этому, увеличение массы органа может быть обусловлено патологическим процессом: отеком, кровенаполнением органа, его жировой или клеточной инфильтрацией, кистозным перерождением, малигнизацией и т.д. Истинная природа этих изменений определяется дополнительным изучением гистоструктуры органа, а также гистологическим изучением соотношения фаз митоза (увеличение количества поздних фаз — анафазы и телофазы — и уменьшение дифференцированных клеток указывает на торможение; например, число ретикулоцитов в периферической крови при регенерации кроветворной ткани).

Довольно много ошибочных выводов при оценке результатов, ориентированных на изменение митотического индекса, было сделано до открытия закономерностей митотического цикла, когда не было известно, что от момента стимуляции пролиферации до момента появления митозов — довольно длительный период, и что поиск изменений вскоре после воздействия бессмыслен. Для каждой ткани этот срок индивидуален — к примеру, в случае регенерации печени он составляет примерно одни сутки. По неопровержимым данным, направленность изменения численности ДНК меченых ядер и митотического индекса всегда одинакова.

При оценке морфогенетической и иммунологической активности лимфоцитов сроки с момента получения сигнала к активации цитогенеза до момента его реализации в виде митоза могут быть и существенно продолжительнее. Реализация сигнала происходит по строго определенным правилам. Прежде всего, индуктор-лимфоцит и его суммарная РНК на протяжении любого нормального и патологического процесса развития — разные. До синтеза соответствующих РНК клетка морфогенетически ареактивна, и морфогенетическая активность выделенного из нее препарата РНК в этот латентный период отсутствует. Затем, еще до проявления начальных признаков регенерации в оперированном органе, лимфоциты донора и их РНК приобретают индукционную способность и при переносе реципиенту соответствующим образом изменяют морфогенетическую активность его лимфоцитов. На высоте пролиферативной активности в оперированном органе донора и лимфоциты, и выделенная из них РНК утрачивают индукционную способность. В этот и последующий периоды ее сменяет способность ингибировать пролиферацию клеток-мишеней реципиента. Из этих данных следует, что и лимфоциты, и их суммарная РНК, выделенная на разных сроках регенерационного процесса в оперированном органе донора, имеют разную морфо-

генетическую активность — как по степени выраженности, так и по направленности действия. Показано, что эти различия при регенерации обусловлены в лимфоидной регуляторной системе изменением соотношения Т-лимфоцитов, обладающих стимулирующим ( $CD4^+$  Т-лимфоциты) и тормозящим (цитотоксические  $CD8^+$  Т-лимфоциты) пролиферацию свойством. Без определения динамики изменения свойств РНК и учета этой динамики противоречивость результатов очень вероятна. Вероятность эта увеличивается в тех случаях, когда сроки между сменой фаз короткие. В ряде случаев для получения противоречивых данных достаточно несоответствия во времени начала проведения опытов всего в несколько часов. Эта закономерность изменения свойств лимфоцитов подробно изучена при регенерации многих органов (печени, почки, кроветворной ткани, слюнных желез) [12, 13] и подтверждена при изучении динамики изменения свойств суммарной РНК лимфоцитов при постгеморрагической регенерации кроветворной ткани [1].

Аналогичная динамика характерна и для развития иммунного процесса, в частности, при антителогенезе в ответ на введение тимусзависимого антигена (эритроцитов барана, ЭБ). Лимфоциты, выделенные в разные сроки после введения антигена, обладают неодинаковыми индукционными свойствами при их переносе сингенным реципиентам. На кривой, отражающей динамику способности лимфоцитов индуцировать антителогенез у реципиентов, также наблюдается латентный период (ареактивность лимфоцитов), фаза стимуляции и фаза угнетения [1]. Так же, как и при морфогенетической функции, выраженность иммунологической функции — уровень активности первой или второй фазы — определяется количеством и соотношением Т-хелперов и Т-супрессоров/цитотоксических лимфоцитов,  $CD4^+/CD8^+$ . Проверка показала, что направленность действия лимфоцитарной суммарной РНК совпадает с таковой самих лимфоцитов [1]. Изменение морфогенетической активности этих клеток при восстановительных процессах способно изменить динамику их иммунологической реактивности, меняющейся в соответствии с их морфогенетической активностью [12].

Определение антителообразующей способности лимфоцитов оперированных животных с регенерацией внутренних органов и кроветворной ткани в разные сроки после частичной их утраты в результате оперативного вмешательства показало, что в ответ на одинаковую дозу одного и того же антигена в разные сроки после вмешательства уровень антителогенеза разный [6, 12, 14]. Это особенно четко выявляется при изучении антителогенеза методом Макинодана и Олбрайт [15]. Суть метода заключается в том, что встреча лимфоцитов с ан-

тигеном (ЭБ) происходит в организме летально облученных животных, которые являются как бы живой пробиркой. В этих условиях иммунный ответ может осуществляться только за счет пересаженных лимфоцитов, что позволяет оценить потенциальную способность к антителогенезу в ответ на один и тот же антиген в одинаковой дозе на каждом конкретном сроке в течение всего регенерационного процесса. Анализ уровня этой способности свидетельствует о том, что при повышении морфогенетической активности лимфоцитов повышается и их иммунологическая реактивность, и наоборот, при снижении морфогенетической активности снижается и способность лимфоцитов к иммунному ответу. Этот параллелизм закономерен, также как закономерно и изменение направленности регуляторного действия суммарной РНК, соответствующее таковой самих лимфоцитов в момент выделения из них РНК. Усиление эффективности действия суммарной РНК лимфоцитов при сочетании двух однонаправленных динамических процессов, по-видимому, объясняется суммацией их эффектов, обусловленных многими факторами, в том числе и соотношением Т-лимфоцитов  $CD4^+/CD8^+$ , играющим ключевую роль в реализации этого сложного взаимодействия, которое обусловлено суммацией активностей индуктора и мишени. Это позволит понять «непредсказуемые» эффекты экзогенной РНК и целенаправленно изменять их в желаемом направлении.

Таким образом, фазовое изменение свойств РНК является весьма вероятной причиной отличий как на уровне морфогенетических, так и иммунологических эффектов, что создает иллюзию их невоспроизводимости.

Источником ошибочного заключения может быть и изменчивость свойств самой ткани регенерирующего органа-мишени при реализации регуляторной функции лимфоцитов. Это установлено не только в опытах, свидетельствующих о разной реактивности нормальной и регенерирующей ткани-мишени на воздействие суммарной РНК нормальных лимфоцитов, что можно объяснить вмешательством в процесс регуляции эндогенных факторов. Неоспоримым доказательством изменения морфогенетических свойств ткани регенерирующего органа являются факты, указывающие на изменение ее реактивности в ответ на различные воздействия и на приобретение ею ростстимулирующего влияния на гомологичный интактный орган нормальных животных. Так, РНП регенерирующей печени, гипертрофирующегося легкого, РНК регенерирующей кости, особенно выделенной из костной мозоли, стимулируют пролиферацию и ускоренный рост гомологичной ткани у нормальных животных, независимо от их вида. РНП и РНК из нормальных тканей такого

действия на нормальные гомологичные ткани-мишени в те же сроки не оказывают [2]. Какова динамика чувствительности регенерирующего органа к воздействию органной экзогенной суммарной РНК и как меняется способность последней воздействовать на ткани органа-мишени, изучено слабо. Имеются лишь косвенные данные, которые дают основание полагать, что свойства РНК регенерирующей ткани меняются в связи с переходом на модус ускоренной пролиферации.

Самые сложные и на вид необъяснимые эффекты наблюдаются в отношении процессов развития, к примеру, регенерирующего органа, под действием препаратов нормальной и активированной экзогенной суммарной РНК лимфоидных клеток. В этом случае реактивность органа зависит от его собственной чувствительности, так как он подвергается действию не только экзогенной суммарной РНК, наделенной определенной активностью, но и действию эндогенных факторов, меняющихся в зависимости от фазы регенерационного процесса. В результате такого взаимодействия могут проявиться разные эффекты экзогенной РНК. Как на ранних, так и на поздних стадиях регенерационного процесса введение суммарной РНК нормальных лимфоцитов понизит стимулирующий эффект в фазе стимуляции и ингибирующий — в фазе торможения. РНК активированных лимфоцитов со стимулирующими свойствами до определенной степени усилит эффект фазы стимуляции регенерации, после чего, по законам авторегуляции, последует фаза торможения, а РНК лимфоцитов с ингибирующим свойством, введенная на стадии торможения регенерации, усилит ингибирующий эффект. При воздействии лимфоцитарной РНК на поврежденный орган-мишень меняется и его резистентность к этому повреждающему агенту. Суммарная РНК клеток костного мозга интактных животных, введенная реципиентам за 30 мин и за 2 ч до их сублетального  $\gamma$ -облучения, способствует усиленной регенерации крови и предотвращает полномасштабное развитие лучевой болезни и гибель животных. При введении РНК за 6 ч до облучения активация процесса эритропоэза уже не наблюдалась, а радиоустойчивость проявлялась только в том, что предотвращала гибель всех животных в этой группе, в отличие от контрольной [16].

О том, что защитное действие зависит от свойств самих клеток-мишеней, свидетельствуют опыты с культурой эритробластических островков (ЭО) костного мозга (КМ) подопытных животных. ЭО КМ реципиентов, получивших препарат суммарной РНК КМ нормальных животных за 30 мин до облучения, оказались наиболее чувствительными к корригирующему действию препарата и проявляли все признаки стимуляции эритропоэза. ЭО КМ реципиентов этого же препарата, введенного за 2 часа до облучения, проявили признаки стимуляции

эритропоэза, но в менее выраженной степени. Реактивность ЭО КМ реципиентов этого препарата, введенного за 6 часов до облучения, значимо не отличалась от таковой у контрольных животных. Такая динамика протекторных эффектов РНК дает основание предполагать, что отсутствие эффекта защиты обусловлено не отсутствием морфогенетической функции лимфоцитарной РНК, а другими причинами, так как РНК во всех этих случаях одинакова. Возможно, это связано с кинетикой митотического цикла кровяных клеток.

Стимулирующая РНК, введенная на стадии торможения, и ингибирующая РНК, введенная на стадии стимуляции, могут привести к полной нейтрализации действия эндогенных факторов и, соответственно, к отсутствию какого-либо ожидаемого эффекта вводимой РНК, в случае равенства активности этих антагонистических факторов. Возможна также инверсия эффекта эндогенных факторов под действием большей активности введенной экзогенной РНК или уменьшение уровня изначального эффекта эндогенного фактора в случае его превосходства по сравнению с активностью экзогенной РНК.

Играет ли какую-то роль изначальный уровень пролиферативной активности регенерирующего органа и влияет ли он на чувствительность к препаратам экзогенной суммарной РНК, не изучено, но то, что он существенно влияет на результат при определении морфогенетической активности препарата, очевидно. Это определяется тем, что одним из главных показателей действия препарата служит изменение митотической активности клеток органа-мишени. И важно то, что характер этих изменений таит в себе опасность ошибочных выводов. В основе этого лежит неодинаковая реактивность разных тканевых структур к различным воздействиям.

По способности клеток тканей к пролиферации в нормальных условиях (физиологическая регенерация) различают стабильные и лабильные ткани. В норме стабильные ткани имеют очень низкий митотический индекс, что может служить препятствием для правильной оценки изменения уровня пролиферации их клеток, когда они служат тканью-мишенью. Это вызывает одинаковые затруднения при определении эффектов как стимулирующих, так и ингибирующих препаратов экзогенной суммарной РНК. Для устранения этих затруднений в эксперименте предпринимают воздействия, меняющие стартовый уровень пролиферации клеток этих органов в сторону усиления. Такая стимуляция может быть вызвана запуском процесса регенерации в ответ на рентгеновское облучение в малых дозах. Обычно требования к тест-системам следующие. Стимулирующие препараты следует тестировать на тканях с исходно низкой митотической активностью. А тормозящие проли-



ферацию — на тканевых системах со средней пролиферативной активностью: при очень низкой митотической активности трудно зарегистрировать ее уменьшение, а при очень высокой можно пропустить слабое торможение. Поэтому проверку эффективности изучаемых препаратов РНК и их последующее лечебное использование целесообразно проводить с учетом фазы процесса в ткани-мишени. Показано, что такой подход повышает (в разы) эффективность их действия. Надо стремиться, чтобы действие эндогенных регуляторных факторов совпадало с направленностью действия лекарства, что усилит его эффективность.

Вариабельность результатов действия РНК лимфоцитов может стать поводом для сомнений в том, что именно РНК несет ответственность за реализацию действия лимфоидных клеток, и именно она обеспечивает перенос морфогенетической и иммунологической информации. А причиной сомнений может быть невнимательное отношение к срокам изъятия РНК из лимфоцитов после их активации и к срокам ее введения реципиенту после начала процессов развития. Однако такая вариабельность эффектов является лишь свидетельством зависимости их проявления от определенных условий, от изменчивости функций лимфоцитов, обусловленных разными причинами, в том числе условиями внешней и внутренней среды. Поэтому утверждать, что эти эффекты невоспроизводимы, можно лишь при полной идентичности условий постановки опыта. Что же касается изменения чувствительности ткани регенерирующего органа-мишени к воздействию экзогенной РНК на разных сроках его регенерации, то к приведенным данным, в качестве подтверждения этой точки зрения, можно добавить еще некоторые примеры о влиянии лимфоцитов на регенерационный процесс [12] и о попытках РНК-терапии онкологических заболеваний [5].

Эффекты, обнаруженные при использовании индивидуальной иммунной РНК, полученной при иммунизации антигеном из опухоли больного, противоречивы [5]. И это закономерно, так как онкогенез является процессом развития, а, следовательно, и свойства опухоли, и состояние эндогенных средств защиты, и реактивность также меняются в процессе заболевания.

В этом отношении вариабельность результатов увеличивает число примеров невоспроизводимости эффектов РНК. Мы рассмотрели некоторые возможные скрытые причины этого явления. Однако такой анализ будет неполным, если оставить без внимания невоспроизводимость эффектов РНК, обусловленную неадекватностью тест-системы оценки и неправильной трактовкой полученных результатов.

Тест-системы должны полностью соответствовать поставленным задачам, но и не допускать разночтения

и двоякого толкования результатов. Об этом уже упоминалось, это касается не только оценки уровня пролиферации, но и уровня альтераций, в частности, вызываемых воспалительной реакцией. Для оценки последней адекватным методом считают определение степени инфильтрации лимфоцитами органа-мишени. Для констатации самого факта взаимодействия индуктора и органа-мишени этого достаточно, но на самом деле не ясно, на что она направлена — на уничтожение опухоли или на усиление ее роста за счет действия морфогенетически активных лимфоцитов? Решить этот вопрос можно с помощью иммуноферментного окрашивания, позволяющего определить популяционный состав инфильтрата.

Ошибочная трактовка результатов может быть обусловлена нейтрализацией эффектов. В случае, когда эндогенные факторы сильнее активности экзогенной лимфоидной РНК, проявляющийся эффект не соответствует направленности действия препарата, и можно прийти к ошибочному выводу о несоответствии действия препарата вызываемому эффекту.

В целом, подводя итог, можно прийти к следующему заключению. Невоспроизводимость эффектов экзогенной РНК является результатом того, что ее взаимодействие с регуляторными факторами организма реципиента и его органом-мишенью происходит в неодинаковых условиях. Действующий на лимфоцит стимул вызывает изменение уровня, но не направленности, его индукционной способности — как иммунологической, так и морфогенетической. Эта унипотентность четко проявляется в клеточной культуре. Эффект этой же самой РНК *in vivo* может быть иным, даже противоположным, что обусловлено ее совместным действием с другими факторами в организме реципиента. В отличие от действия РНК на культуру клеток, в системе организма вступает в силу явление суммации эффектов. Это порождает вариабельность результатов в ответ на одно и то же воздействие, и можно получить полную палитру вариантов невоспроизводимости РНК-эффектов, вплоть до их отсутствия.

Менее изучена, но четко прослеживается зависимость конечных эффектов, оказываемых препаратами экзогенной РНК, от изменяющейся чувствительности органа-мишени в процессах нормального и патологического развития. Эта зависимость особенно значима для оценки действия иммунной РНК, так как потребность в лечебных средствах именно этой разновидности и в настоящее время, и в перспективе очень велика.

Решение вопроса о способности препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток заменять корригирующее действие самих лимфоцитов [1] приобретает особую актуальность.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы по теме: «Создание клеточных моделей молекулярных процессов в органах и тканях» (НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича) и комплексной темы НИР «Регуляция кроветворной и некроветворной функций клеток костного мозга в эксперименте и клинике» № 01201354257 (Южно-Уральский государственный медицинский университет).

### Литература

1. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. *О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах*. М.; 2016.
2. Белоус А.М., Годин В.П., Панков Е.Я. *Экзогенные нуклеиновые кислоты и восстановительные процессы*. М.; Медицина, 1974.
3. Смирнов А.В. Специфические эффекты и возможные механизмы действия экзогенных РНК. *Успехи современной биологии*. 1988; т. 106, вып. 1(4): 20–36.
4. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102(11): 1280–301.
5. Йегер Л. (ред.) *Клиническая иммунология и аллергология*. М.; 1990.
6. Бернет Ф. *Клеточная иммунология*. М.; Мир, 1971.
7. Adler F.L., Fishman M., Dray S. Antibody formation initiated in vitro. III. Antibody formation and allotypic specificity directed by ribonucleic acid from peritoneal exudate cells. *J. Immunol.* 1966; Vol. 97: 554.
8. Lawrence H.S. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leucocytes. *J. Slin. Invest.* 1955; v. 34, p. 219.
9. Ярилин А.А. *Иммунология*. М.; ГЭОТАР-Медиа, 2010.
10. Петров Р.В. *Иммунология*. М.; Медицина, 1982.
11. Хрипков И.С. Проллиферативная активность клеток опухоли Герена при действии гомологичных опухолевых рибонуклеиновых кислот. *Морфология*. 2008; 11(3): 77–80.
12. Бабаева А.Г. *Регенерация и система иммуногенеза*. М.; Медицина, 1985.
13. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. *Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей*. М.; Изд-во РАМН. 2009.
14. Козлов В.А., Лозовой В.П., Журавкин И.Н. Антителогенез и миграция В-клеток из костного мозга в селезенку у мышей в условиях стимуляции и подавления эритропоэза. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1977; 3: 303–5.
15. Makinodan T., Albright J.T. Cellular variation the immune response: one possible model of cellular differentiation. *J. Cell. Physiol.* 1962; Vol. 60. Suppl. 1. Pt. 2: 129–44.
16. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Болотов А.А. Влияние предварительного введения суммарной РНК клеток костного мозга на динамику восстановления эритропоэза у крыс после остро-

го гамма-облучения. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(5): 670–3.

### References

1. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. *On morphogenetic properties of lymphoid and stem cell RNA in regenerative processes [O morfogeneticheskikh svoystvakh RNK limfoidnykh i stvolovykh kletok pri vosstanovitel'nykh protsessakh]*. Moscow; 2016. (In Russian)
2. Belous A.M., Godin V.P., Pankov E.Y. *Exogenous nucleic acids and recovery processes [Ekzogennye nukleinovye kisloty i vosstanovitel'nye protsessy]*. Moscow; Meditsina. 1974. (In Russian)
3. Smirnov A.V. Specific effects and possible mechanisms of action of exogenous RNA. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 1988; V. 106, Vyp. 1(4): 20–36. (In Russian)
4. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. Role of lymphocytic RNA in intercellular information exchange and regulation of regenerative processes. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2016; 102(11): 1280–301. (in Russian)
5. Jäger L. (red.) *Klinische Immunologie und Allergologie*. Moscow; 1990. (In Russian)
6. Bernet F. *Cellular Immunology [Kletochnaya immunologiya]*. Moscow; Mir, 1971. (In Russian)
7. Adler F.L., Fishman M., Dray S. Antibody formation initiated in vitro. III. Antibody formation and allotypic specificity directed by ribonucleic acid from peritoneal exudate cells. *J. Immunol.* 1966; Vol. 97: 554.
8. Lawrence H.S. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leucocytes. *J. Slin. Invest.* 1955; v. 34, p. 219.
9. Yarilin A.A. *Immunology. Textbook. [Immunologiya. Uchebnik]*. Moscow; GEOTAR-Media, 2010. (In Russian)
10. Petrov R.V. *Immunology. [Immunologiya]*. Moscow; Meditsina, 1982. (In Russian)
11. Khripkov I.S. Proliferative activity of Guerin tumor cells under the action of homologous tumor ribonucleic acids. *Morfologiya*. 2008; 11(3): 77–80. (In Russian)
12. Babaeva A.G. *Regeneration and Immunogenesis System [Regeneratsiya i sistema immunogeneza]*. Moscow; Meditsina, 1985. (In Russian)
13. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zotikov E.A. *The role of lymphocytes in the operative change in the program of tissue development. [Rol' limfotsitov v operativnom izmenenii programy razvitiya tkaney]*. Moscow; RAMS, 2009. (In Russian)
14. Kozlov V.A., Lozovoy V.P., Zhuravkin I.N. Antitelogenesis and migration of B cells from the bone marrow to the spleen in mice under conditions of stimulation and suppression of erythropoiesis. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1977; 3: 303–5. (In Russian)
15. Makinodan T., Albright J.T. Cellular variation the immune response: one possible model of cellular differentiation. *J. Cell. Physiol.* 1962; Vol. 60. Suppl. 1. Pt. 2: 129–44.
16. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Bolotov A.A. Effect of preliminary introduction of bone marrow cell total RNA on the dynamics of erythropoiesis restoration in rats after acute gamma-irradiation. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 161(5): 670–3. (In Russian)

### Сведения об авторах:

**Бабаева А.Г.**, акад. РАЕН, доктор мед. наук, консультант лаб. роста и развития ФГБНУ «НИИ морфологии человека»;

**Геворкян Нина Михайловна**, науч. сотр. лаб. биосинтеза белков «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» РАН, e-mail: gevorgiann@yandex.ru;

**Тишевская Наталья Викторовна**, доктор мед. наук, проф. каф. нормальной физиологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Кудина О.В., Асадуллаева Н.Я., Зайченко А.В.

## Экспериментальное моделирование гестоза у крыс

«Национальный фармацевтический университет» Минздрава Украины, 61002, г. Харьков, Украина, ул. Пушкинская, д. 53

Одной из ведущих проблем акушерства остается гестоз. В связи с инвазивностью и этическими проблемами использования большинства методов изучения тканей фетоплацентарного комплекса, поиск адекватных экспериментальных моделей гестоза является актуальной задачей современной фармакологии и экспериментальной терапии. **Цель исследования** – экспериментальное обоснование использования модели гестоза у крыс, вызванного введением ингибитора NO-синтазы N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинином, в доклиническом изучении потенциальных веществ для лечения и профилактики гестоза и плацентарной дисфункции. **Методика.** Экспериментальный гестоз вызывали введением ингибитора NO-синтазы N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинина в дозе 50 мг/кг с 13-го по 19-й день гестации у крыс. **Результаты.** Установлено, что N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинин вызывает гипертензию, протеинурию, повышение уровня эндотелина в сыворотке крови, нарушения гистоструктуры плаценты, матки, печени, почек, что приводит к развитию плацентарной дисфункции, почечной и печеночной неполноценности. Полиорганные изменения нарушают внутриутробное развитие плодов крыс, что проявляется задержкой их роста и развития: снижение массы тела и кранио-каудального размера. **Заключение.** Полученные данные соответствуют клинической и морфологической картине гестоза беременных, что позволяет использовать данную экспериментальную модель патологии при доклинических испытаниях лекарственных препаратов, предназначенных для лечения и профилактики данного заболевания.

**Ключевые слова:** экспериментальный гестоз; эндотелиальная дисфункция; задержка внутриутробного развития.

**Для цитирования:** Кудина О.В., Асадуллаева Н.Я., Зайченко А.В. Экспериментальное моделирование гестоза у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 99-105.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.99-105

**Для корреспонденции:** Кудина Олеся Викторовна, доцент, канд. фармацевтический наук, Национальный фармацевтический университет, каф. фармакологии, e-mail: olesiakudina@gmail.com

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

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

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику Центральной научно-исследовательской лаборатории «Национального фармацевтического университета» Минздрава Украины канд. биол. наук Ларьянковой Ю.Б., а также доценту кафедры гистологии Харьковского национального медицинского университета, канд. биол. наук Деевой Т.В. за помощь в проведении гистологических исследований.

**Поступила** 13.08.2018

Kudina O.V., Asadullayeva N.Ya., Zaychenko A.V.

### An experimental model of gestosis in rats

National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Pushkinskaya Str. 53, Kharkiv 61002, Ukraine

Gestosis remains one of the main problems in obstetrics. Due to the invasiveness and unethicity of most methods for studying tissues of the fetoplacental complex, searching for adequate experimental models of gestosis is a relevant challenge of modern pharmacology. **The aim** of the study was to experimentally substantiate the use of N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine, the NO synthase inhibitor, to model gestosis in rats for pre-clinical study of candidate substances for the treatment and prevention of gestosis and placental dysfunction. **Methods.** Experimental gestosis was induced in rats with the NO-synthase inhibitor, N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (50 mg/kg s.c., from day 13 to day 19 of gestation). **Results.** N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine induced hypertension; proteinuria; an increase in serum endothelin level; damage to the placenta, uterus, liver, and kidney, which led to placental dysfunction; and renal and hepatic impairment. The multisystemic changes impaired the fetal development, which was evident as a delay in fetus growth and maturation, weight loss, and decreased cranio-caudal size. **Conclusion.** The obtained results comply with the clinical and morphological picture of gestosis, which justifies using this experimental model in pre-clinical studies of the substances intended for treatment and prevention of this disease.

**Keywords:** experimental gestosis; endothelial dysfunction; intrauterine growth retardation.

**For citation:** Kudina O.V., Asadullayeva N.Ya., Zaychenko A.V. An experimental model of gestosis in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2019; 63(1): 99-105. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.99-105

**For correspondence:** *Olesia V. Kudina*, PhD in Pharmaceutical Sciences, Associative Professor, Department of Pharmacology, National University of Pharmacy, 61002, Kharkiv, Ukraine, e-mail: olesiakudina@gmail.com

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

**Funding.** The study had no sponsor ship.

**Acknowledgments.** We are grateful to the senior researcher Laryanovskaya Yu.B. from the Central Scientific-Research Laboratory of the National University of Pharmacy (Ministry of Healthcare of Ukraine) and associative professor Deeva T.V. from the Department of Histology of Kharkiv National Medical University for the help in histological studies.

**Information about authors:**

Kudina O.V., <https://orcid.org/0000-0002-8080-2286>

Zaychenko A.V., <https://orcid.org/0000-0002-3506-4800>

Asadullayeva N.Ya., <https://orcid.org/0000-0002-2431-7315>

**Received** 31.10.2017

## Введение

Гестоз остается ведущей причиной формирования плацентарной дисфункции (ПД), которая сопровождается практически все виды патологического течения беременности [1, 2]. Частота встречаемости гестозов составляет от 7 до 22% в зависимости от региона проживания [3–5]. В последние годы было доказано, что ключевым звеном гестоза является эндотелиальная дисфункция [6, 7], приводящая к развитию классической триады симптомов (гипертензия, протеинурия, отеки) и задержке внутриутробного развития плода (ЗВУРП) [8, 9]. Дети, перенесшие в перинатальном периоде синдром ЗВУРП, в последующем имеют высокий риск развития гипертонической болезни, сахарного диабета, неврологических заболеваний [10, 11]. Несмотря на наибольшую объективность и достоверность получаемых результатов, изучение инвазивными методами системы мать-плацента-плод практически невозможно из-за высокого риска и этических проблем применения большинства диагностических технологий. Поэтому разработка адекватных экспериментальных моделей гестоза и плацентарной дисфункции является актуальной задачей экспериментальной терапии и клинической фармакологии [12]. Цель исследования – экспериментальное обоснование использования модели гестоза у крыс, вызванного введением ингибитора NO-синтазы N $\omega$ -нитро-L-аргинином, в доклиническом изучении потенциальных веществ для лечения и профилактики гестоза и плацентарной дисфункции.

## Методика

Экспериментальные исследования выполнены в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных» в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) [[13, 14]. Работа одобрена этической комиссией университета.

В эксперименте использовали 20 самок белых нелинейных крыс (массой 200–220 г), выращенных в ви-

вариации Центральной научно-исследовательской лаборатории Национального фармацевтического университета. Все экспериментальные животные содержались в стандартных санитарных условиях вивария. При отборе животных для эксперимента самок с установленным эстральным циклом в фазе эструса подсаживали к самцам из расчета 3 самки на самца. Дату 1-го дня гестации определяли по наличию сперматозоидов в мазках [15].

Экспериментальный гестоз вызывали введением ингибитора NO-синтазы N $\omega$ -нитро-L-аргинина (NNLA) (Sigma, США) в дозе 50 мг/кг с 13-го по 19-й день гестации. Введение NNLA в период гестации приводит к появлению симптомов, напоминающих картину гестоза у беременных женщин (преэклампсия, гипертензия, протеинурия и ЗВУРП) [12, 16].

Ежедневно, с 14-го по 19-й день гестации беременным крысам измеряли систолическое и диастолическое артериальное давление с помощью тонометра LE 5001 (PANLAB, S.L. Energia, 112 08940 Cornell, Spain) и рассчитывали по формуле среднее артериальное давление (САД):  $(2 + \text{систолическое артериальное давление} \cdot \text{диастолическое артериальное давление}) / 3$ . Перед эвтаназией (на 20-й день беременности) определяли уровень белка в моче с помощью диагностического набора (Albu Phan, PLIVA-Lachema Diagnostica s.r.o.).

На 20-й день беременности под легким эфирным наркозом проводили эвтаназию крыс. На вскрытии регистрировали количество желтых тел в яичниках, мест имплантации в матке, количество живых и резорбированных плодов, на основании чего определяли до- и послеимплантационную смертность, общую эмбриональную смертность. Для установления влияния NNLA на внутриутробное развитие плодов проводили биометрические исследования – измерение массы и кранио-каудального размера (ККР) плода.

В патогенезе гестоза главная роль принадлежит эндотелиальной дисфункции, одним из специфических маркеров которой является эндотелин [16]. Поэтому было также изучено его содержание в сыворотке крови крыс методом иммуноферментного анализа с по-

мощью набора «Эндотелин (1-21)» (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG», серии 985 C) на иммуноферментном анализаторе «Stat Fax 303» в лаборатории КП «ВТП «Вода».

Для установления влияния NNLA на морфофункциональное состояние тканей маточно-плацентарного комплекса и органы мишени проводили гистологическое исследование плаценты, матки, почек и печени. Материал обрабатывали по стандартным гистологическим методикам [17, 18].

Плаценты целиком фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, при вырезании кусочков делали сагиттальные разрезы. Материал обрабатывали по стандартным гистологическим методикам: обезживали в спиртах восходящей концентрации, заливали в целлоидин-парафин, срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином; Шифф-периодной кислотой (для выявления гликогена и фибриноида). Для объективизации полученных данных интенсивность отложений гликогена оценивали по балльной системе (*полуколичественный* метод) отдельно в разных слоях плаценты. При этом считали: 0 баллов – отсутствие гликогена; 1-2 балла – незначительное содержание гликогена; 3 балла – умеренное содержание гликогена; 4 балла – значительное содержание гликогена.

При морфометрии использовались окуляры ув. х 15 с сеткой, цена деления 0,01 мм); определяли относительные размеры децидуальной оболочки, промежуточной зоны (трофоспонгиума) и лабиринта. Для исследования гистопрепаратов плаценты использовали микроскоп «Бимам Р-12».

Для морфологического исследования фиксировали в 10% растворе формалина, дегидратировали в спиртах восходящей крепости, заливали в целлоидин-парафин. Целлоидин-парафиновые срезы (3–5 мкм) образцов тканей матки, печени и почек окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы стенки маточного рога дополнительно окрашивали пикрофуксином по Ван-Гизону (для дифференцировки мышечных и коллагеновых волокон), проводили ШИК-реакцию по Мак-Манусу с ферментативным контролем с диастазой слюны (для выявления гликопротеинов – нейтральных полисахаридов, гликогена), применяли окраску коллоидной гидроокисью железа – метод Хейла (для выявления кислых гликозаминогликанов (ГАГ)). На срезах почек для выявления состояния базальных мембран капилляров клубочков и канальцев использовали ШИК-реакцию. Микроскопическое изучение микропрепаратов матки, печени и почек проводили под микроскопом Mikros 400 (Австрия). Микрофотографирование изображений осуществляли цифровым

фотоаппаратом Nikon Col Pix 4500. Фотоснимки обрабатывали на компьютере Pentium 4GHz с помощью программы Nikon View 5.

Статистическую обработку проводили с помощью программы «Statistica–5.0» с расчетом среднего и его стандартной ошибки, статистическую значимость различий по критерию Стьюдента (t) при нормальном распределении и непараметрических критериев (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) при его отсутствии, однофакторного дисперсионного анализа и критерия Ньюмена-Кейлса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Одними из симптомов гестоза беременных является повышение артериального давления и протеинурия [16, 19, 20], поэтому представляло интерес изучить влияние NNLA на изменение данных показателей. После первого введения самкам крыс NNLA отмечали постепенное статистически значимое повышение среднего артериального давления (САД) в динамике на протяжении 6 сут (табл. 1). На 19-й день гестации показатель САД был выше показателя 13-го дня беременности в 1,4 раза.

Повышение САД у крыс после введения NNLA сопровождалось протеинурией (табл. 2). На 20-й день беременности уровень белка в моче у животных составлял 0,86 г/л, что в 29 раз превышает показатель интактной группы беременных крыс.

Наиболее частым осложнением гестоза считается ЗВУРП [8, 21, 22], характеризующийся дефицитом массы и длины тела плода. Поэтому, необходимо было установить влияние NNLA на основные биометрические параметры, характеризующие эмбрио- и фетогенез, а также оценить степень созревания плодов со сниженной массой.

Введение токсиканта на 6,0% уменьшало количество жизнеспособных плодов, статистически значимо увеличивало (в 3,8 раза) эмбриолетальность по сравнению с интактными беременными крысами (табл. 3). В условиях гестоза наблюдалось статистически значимое снижение органомерических показателей развития плодов, таких, как масса тела (на 15,1%) и ККР (на 7,5%), что свидетельствует о задержке их внутриутробного развития.

Ведущей причиной патогенеза гестоза является дисфункция эндотелия, возникающая в результате нарушения биосинтеза оксида азота (NO). Наиболее значимым маркером эндотелиальной дисфункции является уровень эндотелина [16]. Введение NNLA беременным самкам крыс вызвало достоверное повышение

данного показателя в 2 раза, что подтверждает развитие значительных эндотелиальных нарушений при экспериментальном гестозе (табл. 4).

Известно, что развитие гестоза сопровождается ишемическими изменениями вплоть до появления очагов некроза в плаценте, матке и тканях других жизненно важных органов (печени, почках), приводящими к нарушению их функции [23].

Так, выраженные повреждения структуры плаценты при введении крысам NNLA наблюдали в 90% случаев. Значительно изменялась архитектура органа: децидуальная оболочка и лабиринт были сужены (на 41% и 11% соответственно), трофоспонгиум расширен (на 17%). У 35% беременных крыс определяли признаки периплацентита – поверхность плаценты с плодовой стороны была окружена лейкоцитарными массами, проникающими в орган. В трофоспонгиуме на месте гликогеновых островков в ряде случаев были обнаружены лакуны с лейкоцитарными массами. Также были выявлены патологические изменения, проявлявшиеся истончением лабиринтного отдела. Морфологическая картина была неоднотипна, однако все выявленные изменения свидетельствовали о нарушении материнского и фетального кровообращения. В пределах одного среза отмечались различия в топографических зонах лабиринтного отдела: отсутствие кровообращения в центральной зоне (как на материнской, так и на фетальной стороне) сопровождалось компенсаторным расширением или тромбированием сосудов периферической зоны. У плодов встречались «пустые» сосуды рядом с сосудами с нормальным кровенаполнением, а также затромбированные материнские лакуны. Встречались затромбированные фетальные балочки, а рядом – кровенаполненные материнские, а также спавшиеся «пустые» сосуды плода в окружении материнских сосудов с большим количеством лейкоцитов в просвете. Значительное количество лейкоцитов обнаруживалось в пупочных сосудах. Отмечены дистрофические процессы – перинуклеарные отеки в клетках цитотрофобласта. В лабиринтном отделе на материнской стороне плаценты в ряде случаев присутствовало скопление материнской крови с немногочисленными спавшимися сосудами плода, балочная структура не сохранялась. На фетальной стороне обращали внимание растянутые тонкостенные пустые материнские лакуны рядом с пустыми плодовыми балочками, эндотелий в которых практически не выявлялся. Иногда такие дегенеративные изменения завершались фокальным некрозом, проявлявшимся гомогенизацией структуры балочек и утратой способности к дифференцированному окрашиванию. Содержание глико-

гена в трофоспонгиуме и лабиринте было значительно снижено (на 47% и 55%, соответственно) по сравнению с плацентами группы интактных беременных крыс (контроль).

Таблица 1

**Изменение показателей среднего артериального давления крыс (мм рт. ст.) под воздействием NNLA на модели экспериментального гестоза ( $\bar{X} \pm S_x$ )**

Дни гестации	Группы животных	
	Интактные беременные крысы (контроль), n=10	Экспериментальный гестоз, n=10
13-й	96,5±1,87	114,1±3,26*
14-й	97,2±2,07	118,1±1,79*
15-й	99,1±2,96	118,9±3,77*
16-й	95,8±2,23	121,5±2,21*
17-й	98,9±1,52	122,1±1,32*
18-й	94,4±2,54	121,9±1,49*
19-й	91,8±2,15	124,4± 1,08*

*Примечание.* \* - статистически значимое отклонение по отношению к животным группы интактных беременных крыс (контроль,  $p \leq 0,05$ ); n – количество животных в каждой группе.

Таблица 2

**Содержание белка (г/л) в моче крыс на 20-е сут беременности при экспериментальном гестозе ( $\bar{X} \pm S_x$ )**

Показатель	Группы животных	
	Интактные беременные крысы (контроль), n=10	Экспериментальный гестоз, n=10
Белок г/л	0,03±0,03	0,86±0,09*

*Примечание.* \* - статистически значимое отклонение по отношению к животным группы контроля,  $p \leq 0,05$ ; n – количество животных в каждой группе.

Таблица 3

**Влияние Nω-нитро-L-аргинина на показатели эмбрио- и фетогенеза (модель экспериментального гестоза,  $\bar{X} \pm S_x$ )**

Показатели	Группы животных	
	Интактные беременные крысы (контроль), n=10	Экспериментальный гестоз, n=10
Количество плодов	9,80±0,33	9,40±1,10
Послеимплантационная гибель плодов	0,50±0,22	1,90±0,55*
Масса плодов, г	2,28±0,02 (n <sub>1</sub> =98)	1,97± 0,08* (n <sub>1</sub> =94)
Кранио-каудальный размер плодов, см	3,06±0,01 (n <sub>1</sub> =98)	2,83± 0,07* (n <sub>1</sub> =94)

*Примечание.* \* - статистически значимое отклонение по отношению к животным группы контроля,  $p \leq 0,05$ ; n – количество животных в каждой группе; n<sub>1</sub> – количество плодов.

На основе анализа гистологических данных видно, что при моделировании гестоза введением NNLA в матке беременных крыс к 20-м сут гестации доминируют гемодинамические нарушения с явлениями поврежденной ишемического генеза (парез, стазирование крови). Сосудистая декомпенсация сопровождается нарушением реологических свойств крови (агрегация эритроцитов, разделение форменных элементов и плазмы, тромбоз сосудов), признаками эндотелиальной деструкции (дистрофия эндотелия, нарушение целостности эндотелиальной выстилки кровеносных сосудов), нарушением проницаемости сосудистой стенки (кровоизлияния, плазморрагия, диапедез эритроцитов). Другие изменения слизистой и миометрия у беременных крыс, наблюдаемые как внеплацентарно, так и в плацентарном ложе вторичны. В плаценте под

влиянием токсиканта развиваются деструктивно-дистрофические процессы, как в материнских, так и в фетальных частях плацент, как следствие существенного нарушения кровоснабжения. Особенностью патологических процессов в плаценте является разрастание соединительной ткани, вследствие избыточной пролиферации фибробластов в стенках сосудов плода. Совокупность выявленных патологических изменений можно охарактеризовать как декомпенсированную плацентарную недостаточность.

В почках животных наблюдались видимые признаки эндотелиоза – варибельность размера клеток эндотелия, признаки отека эндотелиальных клеток, изменения базальных мембран капилляров, что может являться причиной облитерации просвета ряда гломерулярных капилляров, с развитием разной степени ишемизации увеличенных в размере почечных клубочков. В печени этих животных отмечались явления очагового стеатоза, очаговая паренхиматозная деструкция с запустеванием капилляров. Развитие дисфункции эндотелия в органах-мишенях подтверждается повышенным уровнем эндотелина в сыворотке крови, что также могло способствовать и повышению артериального давления.

Таким образом, выявленные на использованной модели гестоза нарушения маточного и плацентарного кровообращения, признаки почечной и печеночной «неполноценности» ухудшают жизнеобеспечение плода, что приводит к повышению их летальности, а у жизнеспособных плодов – к задержке их внутриутробного развития, о чем свидетельствует уменьшение массы и кранио-каудального размера тела плодов. Полученные результаты подтверждаются данными клинических анализов (альбуминурия, артериальная гипертензия, задержка внутриутробного развития плодов) у этих животных, что соответствует картине гестоза, наблюдаемой у беременных женщин [24, 25].

## Выводы

Введение ингибитора NO-синтазы N $\omega$ -нитро-L-аргинина самкам крыс с 13-го по 19-й день гестации приводит к развитию дисфункции эндотелия, что сопровождается увеличением уровня эндотелина в сыворотке крови, повышением артериального давления, протеинурией. Данные симптомы соответствуют клинической симптоматике гестоза беременных.

На фоне введения N $\omega$ -нитро-L-аргинина наблюдаются признаки развития плацентарной дисфункции, выражающиеся в существенных изменениях структуры плаценты, нарушении фетального и материнского кровообращения.

Таблица 4

**Содержание эндотелина в сыворотке крови крыс (модель экспериментального гестоза,  $\bar{X} \pm S_x$ )**

Показатель	Группы животных	
	Интактные беременные крысы (контроль), n=6	Экспериментальный гестоз, n=6
Содержание эндотелина (fmol/ml)	4,13 ± 0,46	8,36 ± 0,21*

*Примечания.* \* — статистически значимое отклонение по отношению к животным группы контроля,  $p < 0,05$ ; n — количество животных в каждой группе.

Таблица 5

**Морфометрические показатели плаценты интактного контроля и контрольной патологии, ( $\bar{X} \pm S_x$ )**

Показатели	Группы животных	
	Интактные беременные крысы (контроль), n=10	Экспериментальный гестоз, n=10
Процент случаев с выявленными патологическими изменениями	0	90
Ширина децидуальной оболочки, мм	0,187 ± 0,019	0,11 ± 0,011*
Ширина промежуточного слоя (трофоспонгиума), мм	0,41 ± 0,057	0,48 ± 0,05
Ширина лабиринтного слоя, мм	2,14 ± 0,075	1,91 ± 0,056*
	Содержание гликогена (в баллах):	
В промежуточной зоне (трофоспонгиуме)	3,5	1,85*
В лабиринте	3,75	1,70*

*Примечание.* \* — статистически значимое отклонение по отношению к животным группы контроля,  $p \leq 0,05$ ; n — количество животных в каждой группе.

В матке крыс на 20-е сут гестации применение Nω-нитро-L-аргинина приводит к развитию нарушений гемодинамики и сосудистой декомпенсации органа.

В почках крыс введение Nω-нитро-L-аргинина вызывает развитие эндотелиоза и ишемии, в печени — паренхиматозную деструкцию.

Полиорганный недостаток (ухудшение маточно-плацентарного кровоснабжения, почечная и печеночная «неполноценность»), вызванная введением Nω-нитро-L-аргинина, нарушают внутриутробное развитие плодов беременных крыс, что проявляется снижением массы и кранио-каудального размера тела плодов.

Полученные данные соответствуют клинической и морфологической картине гестоза беременных, что позволяет использовать данную экспериментальную модель патологии при доклинических испытаниях лекарственных препаратов, предназначенных для лечения и профилактики данного заболевания.

### Литература

1. Ritchie A., Brown M. *preeclampsia: from bench to bedside. [Neoslozhnennaya preeklampsiya]. Fetal and Maternal Medicine Review.* 2010; 21: 1-23.
2. Venckovskij V.M., Zaporozhan V.M., Senchuk A.Ja. *Gestosis of pregnant women.* Kyiv; 2012. (in Ukrainian)
3. Ветров В.В., Воинов В.А., Иванов Д.О. *Неосложненная преэклампсия.* СПб; Информ-Навигатор; 2012.
4. Jeyabalan A. Epidemiology of preeclampsia: Impact of obesity. *Nutrition reviews.* 2013; 71(1): 18–25.
5. Adu-Bonsaffoh K., Antwi D. A., Gyan B., Obed S. A. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of pre-eclampsia in Ghanaian women. *BMC Physiology.* 2017; 17: 5-12.
6. Sánchez-Aranguren L.C., Prada C.E., Riaño-Medina C.E., Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Frontiers in Physiology.* 2014; 5: 372-83.
7. Акиншина С.В., Бицадзе В.О., Гадаева З.К., Макасария А.Д. Значение тромботической микроангиопатии в патогенезе акушерских осложнений. *Акушерство, гинекология и репродукция.* 2015; 2: 62-71.
8. Лазарева Г.А. Хурасева А.Б., Клычева О.И. Современный взгляд на проблему фетоплацентарной недостаточности. *Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация.* 2014; 8 (189): 5-10.
9. Duhig K., Chappell L.C., Shennan A.H. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. *Obstetric Medicine.* 2016; 9(3): 113-6.
10. Лихачев С.А., Астапенко А.В., Осос Е.Л. Неврологические проявления гестоза. *Медицинские новости.* 2008; 14: 22-6.
11. Tedner S.G, Örtqvist A.K, Almqvist C. Fetal growth and risk of childhood asthma and allergic disease. *Clinical and Experimental Allergy.* 2012; 42(10): 1430-47.
12. Jakovleva L.V., Zaychenko G.V., Cipkun A.G., Laryanovskaya Yu.B., Butenko I.G., Deeva T.V. *Pre-clinical study of medicines for the treatment of placental*
13. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe, 1986.

14. Общие этические принципы экспериментов на животных. Материалы Первого национального конгресса по биоэтике. *Вестник НАНУ.* 2001; 9: 20.
15. Stefanov O.V., ed. *Preclinical studies of medicines.* K.: Avicenna, 2001. (in Ukrainian)
16. Li J., LaMarca B., Reckelhoff J.F. A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 2012; 303(1):H1-H8.
17. Меркулов Г.А. *Курс патологистологической техники.* М.; Медицина; 1969.
18. Пирс Э. *Гистохимия теоретическая и прикладная.* М.; Изд-во иностранной литературы; 1962.
19. Gilbert J.S., Ryan M.J., LaMarca B.B., Sedeek M., Murphy S.R., Granger J.P. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294:H541–550.
20. Steegers E.A., von Dadelszen P., Duvekot J.J., Pijnenborg R. Preeclampsia. *Lancet.* 2010;376:631-644.
21. Сидельникова В.М. *Эндокринология беременности в норме и при патологии.* М.; МЕДпресс-информ; 2007.
22. Sibley C.P. Treating the dysfunctional placenta. *The Journal of Endocrinology.* 2017;234(2):R81-R97
23. Репина М.А. *Преэклампсия и матерьяльная смертность.* СПб; Изд. дом СПбМАПО; 2005.
24. Науменко В.Г., Митяева Н.А. *Гистологический и цитологический методы исследования в судебной медицине.* М.; Медицина; 1980.
25. Романенко А.М., ред. *Клиническая морфология в урологии и нефрологии.* Киев; Здоров'я; 1990: 116-54.

### References

1. Ritchie A., Brown M. *preeclampsia: from bench to bedside. [Neoslozhnennaya preeklampsiya]. Fetal and Maternal Medicine Review.* 2010; 21: 1-23.
2. Venckovskij V.M., Zaporozhan V.M., Senchuk A.Ja. *Gestosis of pregnant women.* Kyiv; 2012. (in Ukrainian)
3. Vetrov V.V., Voinov V.A., Ivanov D.O. *Uncomplicated preeclampsia.* St. Petersburg: Inform-Navigator; 2012. (in Russian)
4. Jeyabalan A. Epidemiology of preeclampsia: Impact of obesity. *Nutrition reviews.* 2013; 71(1): 18–25.
5. Adu-Bonsaffoh K., Antwi D. A., Gyan B., Obed S. A. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of pre-eclampsia in Ghanaian women. *BMC Physiology.* 2017; 17: 5-12.
6. Sánchez-Aranguren L.C., Prada C.E., Riaño-Medina C.E., Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Frontiers in Physiology.* 2014; 5: 372-83.
7. Akinshina S.V., Bitsadze V.O., Gadaeva Z.K., Makatsariya A.D. The significance of thrombotic microangiopathy in the pathogenesis of obstetric complications. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya.* 2015; 2: 62-71. (in Russian)
8. Lazareva G.A. Khuraseva A.B., Klycheva O.I. Modern view on the problem of fetoplacental insufficiency. *Scientific bulletins of BelSU. Series: Meditsine. Pharmacy.* 2014; 8 (189): 5-10. (in Russian)
9. Duhig K., Chappell L.C., Shennan A.H. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. *Obstetric Medicine.* 2016; 9(3): 113-6.
10. Lihachev S.A., Astapenko A.V., Osos E.L. Neurological manifestations of preeclampsia. *Medical news.* 2008; 14: 22-6. (in Russian)



11. Tedner S.G., Örtqvist A.K., Almqvist C. Fetal growth and risk of childhood asthma and allergic disease. *Clinical and Experimental Allergy*. 2012; 42(10): 1430-47.
12. Jakovleva L.V., Zaychenko G.V., Cipkun A.G., Laryanovskaya Yu.B., Butenko I.G., Deeva T.V. *Pre-clinical study of medicines for the treatment of placental dysfunction*. Kyiv: State Expert Center of the Ministry of Health of Ukraine; 2009. (in Ukrainian)
13. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe; 1986.
14. General ethical principles of the experiments on animals. First national Congress on bioethics. *Vestnik of the NANU*. 2001; 9: 20. (in Russian)
15. Stefanov O.V., ed. *Preclinical studies of medicines*. K.: Avicenna, 2001. (in Ukrainian)
16. Li J., LaMarca B., Reckelhoff J.F. A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2012; 303(1):H1-H8.
17. Merkulov G.A. *Course of pathological histology. [Kurs patologogistologicheskoy tekhniki]*. Moscow; Meditsina; 1969. (in Russian)
18. Pierce E. *Histochemistry, theoretical and applied. [Gistokhimiya teoreticheskaya i prikladnaya]*. Moscow; Izd-vo inostrannoy literatury; 1962. (in Russian)
19. Gilbert J.S., Ryan M.J., LaMarca B.B., Sedeek M., Murphy S.R., Granger J.P. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H541-550.
20. Steegers E.A., von Dadelszen P., Duvekot J.J., Pijnenborg R. Preeclampsia. *Lancet*. 2010;376:631-644.
21. Sidelnikova V.M. *Endocrinology of pregnancy in norm and in pathology. [Endokrinologiya beremennosti v norme i pri patologii]*. Moscow; MEDpress-Inform; 2007. (in Russian)
22. Sibley CP. Treating the dysfunctional placenta. *The Journal of Endocrinology*. 2017;234(2):R81-R97.
23. Repina M.A. *Preeclampsia and maternal mortality. [Preehklampsiya i material'naya smernost']*. St. Petersburg; Izd. dom SPbMAPO; 2005. (in Russian)
24. Naumenko V.G., Mityaeva N.A. *Histological and cytological methods of investigation in forensic medicine. [Gistologicheskii i tsitologicheskii metody issledovaniya v sudebnoy meditsine]*. Moscow: Meditsina; 1980. (in Russian)
25. Romanenko A.M., ed. *Clinical morphology in urology and nephrology*. Kyiv: Zdorov'ya; 1990. (in Russian)

#### Сведения об авторах:

**Кудина Олеся Викторовна**, канд. фарм. наук, доцент каф. фармакологии Национального фармацевтического университета, e-mail: olesiakudina@gmail.com;

**Асадуллаева Надежда Яковлевна**, канд. фарм. наук, ассистент каф. фармакологии Национального фармацевтического университета, e-mail: Pavlenkony@gmail.com;

**Зайченко Анна Владимировна**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. фармакологии Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Дерюгина А.В.<sup>1</sup>, Иващенко М.Н.<sup>2</sup>, Игнатьев П.С.<sup>3</sup>, Самоделкин А.Г.<sup>2</sup>,  
Золотова М.В.<sup>1</sup>, Шабалин М.А.<sup>1</sup>, Грачева Е.А.<sup>1</sup>

## Диагностические возможности исследования электрофоретической подвижности эритроцитов и клеток буккального эпителия при стрессе

<sup>1</sup>Институт биологии и медицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», кафедра физиологии и анатомии, 603950, г. Нижний Новгород, Россия, пр. Гагарина, д. 23;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Минсельхоза РФ, 603107, г. Нижний Новгород, Россия, пр. Гагарина, д. 97;

<sup>3</sup>АО «Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова», 620100, г. Екатеринбург, Россия, ул. Восточная, д. 33Б

Диагностика стресс-реактивности по анализу гормонального состояния организма, является сложной, экономически затратной и трудоемкой процедурой исследования. В связи с этим актуален поиск информационных технологий, которые достаточно легко реализуются в любой медицинской лаборатории и позволяют оценить стресс-реакцию организма. **Цель** работы – оценка диагностических возможностей электрофоретической подвижности эритроцитов и клеток буккального эпителия в процессе развития стрессовой реакции. **Методика.** Для моделирования стресса использовали внутрибрюшинное введение крысам раствора адреналина-гидрохлорида (0,1 мг/кг) однократно или ежедневно в течение 3 сут эксперимента соответственно. Контролем служили крысы, получавшие физиологический раствор (в/б) в том же объеме. Буккальный эпителий исследовали на 7-е сут после введения адреналина. Мазки клеток эпителия окрашивали по Романовскому-Гимза, на препаратах подсчитывали количество клеток с микроядрами на 1000 клеток. Электрофоретическую подвижность эритроцитов оценивали методом микроэлектрофореза. **Результаты.** Наблюдалась качественно однотипная динамика показателя электрофоретической подвижности эритроцитов, количественно зависящая от силы воздействия. При слабых стимулах скорость изменений электрофоретической подвижности эритроцитов незначительна и сочетается с развитием адаптивных процессов, связанных с репарацией генетических повреждений. Увеличение степени стрессового воздействия путем трехкратного введения адреналина приводит к резкому изменению электрофоретической подвижности эритроцитов и росту числа эпителиоцитов с различными патологическими изменениями. **Заключение.** Показана возможность использования данного метода в качестве маркерной характеристики интенсивности стрессовой реакции с выявлением ее генотоксичности.

**Ключевые слова:** электрофоретическая подвижность эритроцитов, буккальный эпителий, стресс.

**Для цитирования:** Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С., Самоделкин А.Г., Золотова М.В., Шабалин М.А., Грачева Е.А. Диагностические возможности электрофоретической подвижности эритроцитов и клеток буккального эпителия при стрессе. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 106-111.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.106-111

**Для корреспонденции:** Иващенко Марина Николаевна, e-mail: mi11207@rambler.ru

**Финансирование.** «Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00195».

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

**Поступила** 13.11.2017

**Deryugina A.V.<sup>1</sup>, Ivashchenko M.N.<sup>2</sup>, Ignatyev P.S.<sup>3</sup>, Samodelkin A.G.<sup>2</sup>, Zolotova M.V.<sup>1</sup>, Shabalin M.A.<sup>1</sup>, Gracheva E. A.<sup>1</sup>**

## DIAGNOSTIC CAPABILITIES OF THE ELECTROPHORETIC MOBILITY OF RED BLOOD CELLS AND BUCCAL CELLS IN STRESS

<sup>1</sup>Department of Physiology and Anatomy, Institute of Biology and Medicine Lobachevsky State University of Nizhniy Novgorod, Prospekt Gagarina 23, Nizhniy Novgorod 603950, Russian Federation;

<sup>2</sup>State Agricultural Academy of Nizhniy Novgorod, Prospekt Gagarina 97, Nizhniy Novgorod 603107, Russian Federation;

<sup>3</sup>Joint-Stock Company Production Association E.S. Yamalov Ural Optical and Mechanical Plant, Vostochnayay Str. 33B, Ekaterinburg, Russian Federation

Diagnostics of stress reaction using an analysis of hormonal state is a difficult, costly, and labor-consuming research. Therefore, searching for information technologies, which could be easily used in any medical laboratory and would allow evaluating the stress reaction is relevant. We studied the electrophoretic mobility of red blood cells (RBC) and buccal epithelial cells of rats exposed to stress induced by a single

or repeated intraperitoneal epinephrine injection. This study showed that these methods could be used as the marker characteristics of stress reaction intensity and genotoxicity. Qualitative changes in the electrophoretic mobility of RBC were similar but quantitative characteristics depended on the acting force. Under a weak stimulus, changes in the electrophoretic mobility of RBC were slight and associated with development of adaptive processes related with repair of genetic damage. A further increase in the acting force led to a sharp change in the electrophoretic mobility of RBC and an increase in the number of epithelial cells with pathological alterations.

**Keywords:** RBC electrophoretic mobility, buccal cells, stress.

**For citation:** Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatyev P.S., Samodelkin A.G., Zolotova M.V., Shabalin M.A., Gracheva E.A. Diagnostic capabilities of the electrophoretic mobility of red blood cells and buccal cells in stress. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1): 106-111. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.106-111

**For correspondence:** Marina N. Ivashchenko, e-mail: mi11207@rambler.ru

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

**Funding.** The study was performed with financial support RFBR, research project № 18-016-00195.

**Received** 13.11.2017

## Введение

Жизнедеятельность человека в современных условиях часто, а нередко систематически сопровождается перенапряжением функций организма, при этом действие экстремальных факторов вызывает развитие стрессовой реакции. Стресс может рассматриваться как предвестник болезни, необходимое, но недостаточное ее условие, которое реализуется (или не реализуется) в болезнь по исчерпанию резервов, защитных ресурсов организма. Стресс обусловлен выбросом в кровь гормонов стресса – катехоламинов и кортикостероидов [1]. Активация симпатoadреналовой системы связана с увеличением содержания в крови адреналина и норадреналина, и отмечается уже с первых минут действия стрессора [2]. Активация гипофизарно-гипоталамо-надпочечниковой системы может приводить к развитию адаптивных реакций, направленных на восстановление нарушенного гомеостаза, при недостаточности ресурсов которой может происходить срыв адаптационных процессов, приводящий к развитию патологии.

Диагностика состояния гипофизарно-гипоталамо-надпочечниковой системы систем по анализу гормонального профиля организма, является сложной, экономически затратной и трудоемкой процедурой исследования. Поэтому актуальным является поиск информационных технологий, которые достаточно легко реализуются в любой медицинской лаборатории. Ранее нами показано, что эффективным критерием выраженности стресс-реакции организма на экстремальные воздействия является электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) [3, 4].

Интенсивные стрессовые воздействия угнетают выработку лимфоцитами интерлейкинов, гамма-интерферона [5], вызывают апоптоз активированных Т- и В-клеток. С одной стороны, это приводит к ограни-

чению чрезмерной активации иммунной системы, с другой – может переходить в патологическую иммунодепрессию [6]. Ослабление иммунной системы клеток сопровождается появлением цитогенетически aberrантных клеток [7]. Представляется важным в диагностике стресса не только оценка степени вовлеченности стресс-реализующих систем, но и оценка генотоксичности, обусловленной эффектами данных систем.

На сегодняшний день неинвазивным, обладающим простотой и доступностью методом оценки повреждения ДНК может служить микроядерный тест (МЯТ) [7]. Показано, что МЯТ по чувствительности не уступает тесту по изучению хромосомных aberrаций в клетках костного мозга животных, при этом являясь одновременно гораздо менее трудоемким. Цитоморфологическое исследование буккального эпителия позволяет оценить интенсивность процессов пролиферации и дифференцировки эпителия, выраженность воспалительных процессов, а также охарактеризовать явления клеточной атипии и ядерного полиморфизма, цитогенетические изменения [8].

**Цель работы** – оценка диагностических возможностей электрофоретической подвижности эритроцитов и клеток буккального эпителия в процессе развития стрессовой реакции.

## Методика

Исследования осуществляли в соответствии с правилами Европейской конвенции по использованию животных для экспериментов или в иных научных целях и Приказом МЗ России «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Исследование проведено на 60 нелинейных белых половозрелых крысах массой 180–200 г. Животных содержали в виварии, в условиях согласно требованиям

«Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» № 1045-73. В ходе исследования были сформированы 4 группы животных с одинаковым количеством особей в каждой. Для моделирования стресса животным 1-й опытной группы однократно внутривентриально вводили раствор адреналина-гидрохлорида (0,1 мг/кг), во 2-й опытной группе раствор адреналина-гидрохлорида (0,1 мг/кг) вводили внутривентриально ежедневно в течение 3 сут эксперимента. Контролем служили крысы, получавшие физиологический раствор (в/б) в том же объеме. Кровь для анализа брали из подъязычной вены через 1 ч, 1 и 7 сут после введения адреналина. Анализ буккального эпителия проводили на 7-е сут после введения адреналина, что обусловлено временем выхода базальных клеток (в которых образуются микроядра) в поверхностный слой, используемый при анализе [9]. Все оперативные вмешательства проводили под золетил-ксилазиновым наркозом («Zoletil 50» в дозе 0,5 мг/кг в/м + 5 мг/кг ксилазина внутримышечно). Наркоз верифицировали по исчезновению реакции на болевые раздражители (укол лапы) и угнетению роговичного рефлекса [10]. Поскольку используемые манипуляции с животными относятся к типу А: манипуляции, не причиняющие боли, либо причиняющие минимальную боль и дискомфорт [11] золетил использовали в минимальной дозе 0,5 мг/кг массы тела крыс, что обеспечивает адекватную анестезию при одновременном сокращении времени выхода крысы из наркоза и отсутствие послеоперационных осложнений<sup>1</sup>.

Измерение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) проводили методом микроэлектрофореза [12]. Для определения ЭФПЭ готовили взвесь отмытых эритроцитов. Взвесь отмытых эритроцитов получали путем центрифугирования консервированной крови и максимального удаления плазмы и лейкотромбослоя, с последующим 3-х-кратным центрифугированием с изотоническим 0,9% раствором натрия хлорида при температуре +4°С и удалением надосадочной жидкости [13]. При данном способе достигается фактически полное отделение эритроцитов от плазмы, лейкоцитов и тромбоцитов [14].

Суспензию клеток разводили 10 мМ трис - HCl буфером (рН 7,4) и измеряли ЭФПЭ микроэлектрофорезом. Принцип микрометода заключается в том, что в микрокамере с помощью секундомера и окулярной сет-

ки измеряется под микроскопом скорость перемещения эритроцитов в электрическом поле [15]. Установка для определения ЭФПЭ состоит из горизонтальной микрокамеры, микроскопа, источника постоянного тока. Используют электроды системы Ag/AgCl. Для измерения подвижности фиксируют перемещение клеток при силе тока в 12 мА. В каждом опыте фиксируют время перемещения 10 клеток в двух направлениях, изменяя знак заряда на электродах полярным переключателем. Величину ЭФПЭ определяют по формуле:

$$U = S / T \cdot H,$$

где:

S – расстояние, на которое перемещались клетки;

T – время перемещения клеток на расстояние S;

H – градиент потенциала.

Величину градиента потенциала определяют по формуле:

$$H = I / g \cdot \chi,$$

где:

I – сила тока;

g – поперечное сечение камеры;

χ – удельная электропроводимость среды.

Соскобы со слизистой щек брали с помощью шпателя, мазки клеток эпителия окрашивали красителем по Романовскому-Гимза. Анализ препаратов осуществляли под микроскопом AXIOSTAR PLUS (Karl Zeiss, Германия) при увеличениях 16×40 и 16×100. На препарате подсчитывали число клеток с микроядрами, просматривая не менее 1000 клеток. Анализировали хорошо расправленные неповрежденные, отдельно лежащие эпителиальные клетки без наложений в монослое, при этом исключались клетки, на поверхности которых имелись многочисленные микроорганизмы. Микроядра идентифицировали как округлые хроматиновые тельца с непрерывным гладким краем, лежащие в цитоплазме отдельно от ядра в одной плоскости с ним и имеющие окраску той же интенсивности. Кроме того, учитывали двуядерные клетки, клетки с аномальным ядром, кариопикнозом, кариорексисом, кариолизисом [16].

Для статистической обработки полученных результатов использовали табличный редактор Microsoft Excel 2007 и программу Statistica 6.0. После доказательства принадлежности экспериментальных данных к нормальному распределению с использованием критерия Шапиро-Уилка определяли значения средних арифметических и стандартных отклонений.

## Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что адреналин уменьшал ЭФПЭ как при однократном, так и при многократном его внутривентриальном введении крысам (табл. 1). При этом однократное введение адреналина приводило к непродолжительному действию, при ко-

<sup>1</sup> Сонова М.М., Бургова Е.В., Гулиев М.Т., Адамян Л.В., Арсланян К.Н., Сереженков В.А., Зайратьянц О.В., Максимова Ю.В. Способ применения наркоза при многоэтапном эксперименте при моделировании эндометриоза. Патент РФ 2466753. 2012. 4 с.

тором значимые изменения ЭФПЭ регистрировались в течение суток. Многократное введение адреналина определило снижение ЭФПЭ на протяжении всего эксперимента с максимальным изменением показателя к 1 сут на 50% относительно значений контроля.

Анализ ЭФПЭ совпадает с ранее полученными нами результатами при исследовании различных видов стрессов [17] и данными литературы, свидетельствующими о снижении ЭФПЭ крови у больных при различных видах патологии.

Учитывая, что стресс вызывает увеличение количества эритроцитов с хромосомными aberrациями [18], было проведено исследование клеток буккального эпителия. При анализе цитогамм было обнаружено статистически значимое уменьшение количества нормальных клеток и существенное увеличение числа клеток с признаками цитоморфологических и цитогенетических изменений по сравнению с контролем (табл. 2).

При цитоморфологических исследованиях буккального эпителия животных опытной группы, получивших однократную дозу адреналина, у большинства животных были выявлены клетки буккального эпителия с одним и несколькими микроядрами. Микроядра представляли собой округлые или овальные, с гладким краем, образования сиреневого или фиолетового цвета. Полученные значения статистически значимо превышали показатель контрольной группы на 15%. Определялись единичные клетки без четкой пространственной ориентации с фрагментированными ядрами, неправильными контурами.

Довольно часто в цитогаммах определялись клетки с ранней стадией деструкции ядра, клетки с конденсацией хроматина (сморщенное ядро с уплотненным хроматином) и клетки с перенуклеарной вакуолью. Клетки с конденсацией хроматина встречались в биоматериале опытной группы на 10% чаще, клетки с перенуклеарной вакуолью на 43% чаще, чем у животных контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

Выявленные формы некроза клеток свидетельствуют о деструктивных изменениях мембраны ядра и нарушении ее барьерной и транспортной функций. Результатом некротического процесса клеточной деструкции является кариолизис, которому предшествуют появления перенуклеарной вакуоли или вакуолизация ядра [9, 16]. Не было выявлено статистически значимых отличий в частоте клеток с признаками кариолизиса у животных контрольной и опытной группы. Однако статистически значимое повышение доли клеток с начальными признаками некротического пути деструкции у животных опытной группы, косвенно подтверждает развитие стресса.

Естественной формой апоптоза клеток буккального эпителия считается кариопикноз. Обнаруженная разница частоты встречаемости клеток с кариопикнозом у животных опытной и контрольной группы незначительна и статистически незначима. Это свидетельствует о сохранении механизмов естественного процесса деструкции клеток буккального эпителия.

При изучении цитогамм животных, получавших адреналин многократно, установлено статистически значимое увеличение (на 25%) числа клеток, содержащих микроядра, по сравнению с животными контрольной группы, что свидетельствует о развитии патологии.

Таблица 1

**Динамика изменения электрофоретической подвижности эритроцитов (мкм-см/В-с) при различных видах воздействия ( $M \pm m$ )**

Вид воздействия	Время после воздействия		
	60 мин	1 сут	1 нед
Адреналин (однократно)	0,72±0,08*	0,83±0,09*	0,94±0,07
Контроль	1,02±0,02	1,07±0,03	1,00±0,03
Адреналин (многократно)	0,67±0,02*	0,52±0,03*	0,76±0,02*
Контроль	1,04±0,02	1,02±0,04	1,00±0,04

Примечание. \* - статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с контрольными животными.

Таблица 2

**Особенности цитоморфологии клеток буккального эпителия при различных видах воздействия (среднее число клеток из 1000 учтенных в поле зрения)**

Цитоморфологические показатели	Адреналин (однократно)	Контроль	Адреналин (многократно)	Контроль
Норма	685,21±70,59*	720,28±68,38	631,42±67,59*	711,82±67,03
Микроядерность	59,42±5,19*	51,67±6,49	65,35±6,39*	52,28±6,39
Клетки с конденсацией хроматина	33,71±4,42*	30,65±4,58	45,68±4,40*	32,55±4,28
Клетки с перенуклеарной вакуолью	17,46±2,25*	12,21±2,28	22,41±2,24*	10,19±2,21
Кариорексис	32,74±4,11	29,72±4,91	47,70±4,70*	32,67±4,91
Кариопикноз	72,25±7,05	73,23±7,11	88,23±7,67*	71,21±8,13
Кариолизис	99,21±6,39	82,24±6,25	99,19±7,01*	89,28±7,05

Примечание. \* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с контрольными животными.

ческих изменений в структуре буккального эпителия и нарушении стабильности генетического материала. У животных опытной группы эпителиоциты были уменьшены в размерах за счет уменьшения объема цитоплазмы, выявлялись эпителиоциты с признаками поздних стадий деструкции ядра (кариопикноз, кариорексис и полный кариолизис).

При объединении всех типов цитологических и ядерных нарушений у животных опытных групп оказалось, что в группе животных, получавших однократную дозу адреналина, преобладают цитогенетические нарушения (клетки с микроядрами, клетки с атипичным ядром) и клетки с ранней стадией деструкции ядра (конденсация хроматина). У животных, получавших адреналин многократно, увеличивается число клеток с показателями завершения деструкции ядра (кариопикноз, кариорексис, полный кариолизис). Учитывая, что генетические нарушения элиминируются посредством иммунной системы [20], можно полагать, что многократное введение адреналина сопровождается понижением эффективности работы иммунной системы, связанной с иммунодепрессивным действием стресса высокой интенсивности, что проявляется в снижении ЭФПЭ в 2 раза. Ослабленная иммунная система не распознает и не элиминирует генетически поврежденные эпителиоциты, что способствует накоплению поврежденных клеток и нарушению стабильности генетической системы организма [7].

### Заключение

Проведенный анализ свидетельствует, что при воздействии извне вводимого в организм адреналина наблюдается уменьшение ЭФПЭ относительно контроля. При однократном введении адреналина скорость нарастания изменений ЭФПЭ выражена незначительно и сочетается с развитием адаптационных процессов и репарацией генетических повреждений. Увеличение степени воздействия при многократном введении адреналина приводит к резкому изменению ЭФПЭ и увеличению числа эпителиоцитов с различными патологическими изменениями.

### Литература

1. Маслова М.Н. Молекулярные механизмы стресса. *Российский физиологический журнал им И.М. Сеченова*. 2005; 91(11): 1320-28.
2. Барабой В. А. *Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы*. Киев: Фитосоциоцентр; 2006.
3. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Плескова С.Н. Электрофоретическая подвижность и морфометрия эритроцитов крыс при стрессовых воздействиях. *Современные медицинские технологии*. 2010; 4: 23-7.
4. Дерюгина А.В., Мартусевич А.А., Веселова Т.А. Молекулярно-клеточные механизмы реализации стресс-реакции организма. *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2015; 3: 58-3.

5. Филаретов А.А. Подвигина Т.Г., Филоретова Л.П. *Адаптация как функция гипофизарно-адреналовой системы*. СПб.; Наука; 1994.
6. Гушин И.С. *Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль*. М.; Фармуспринт; 1998.
7. Левински М.В., Калаев В.Н., Буторина А.К. Анализ встречаемости клеток с микроядрами в буккальном эпителии и уровень сывороточных антител среди детского и взрослого населения, проживающих в различных районах города Кишинева. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2008; 2: 12-7.
8. Вовк Я. Р., Линник М. С., Морозова Е. Н., Морозов В. Н. Особенности строения буккального эпителия студенток из Индии в разные фазы менструального цикла. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2016; 5(3): 13-6.
9. Юрченко В.В. *Микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах человека*. М.; Гениус, 2007.
10. Кадомцев Д.В., Пасечникова Е.А., Голубев В.Г. Золетил-ксилазиновый наркоз в экспериментах у крыс. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 20116; 5: 56-7.
11. Руководство по работе с лабораторными животными для сотрудников ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России, занятых проведением доклинических испытаний. ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. М.; 2015.
12. Козинец Г. И. *Интерпретация анализов крови и мочи и их клиническое значение*. М.; Практическая медицина; 1998.
13. Четкин А.В., Касьянов А.Д., Голованова И.С. Отмытые эритроциты: клиническое использование, оценка качества, методы получения. *Трансфузиология*. 2016; 17 (4): 29-39.
14. Руководство по приготовлению, использованию и гарантии качества компонентов плазмы. Отмытые эритроциты. *Трансфузиология*. 2002; 4: 85-7.
15. Харамоненко С.С., Ракитянская А.А. *Электрофорез клеток крови в норме и при патологии*. Минск, Беларусь; 1974.
16. Калаев В.Н., Нечаева М.С., Калаева Е.А. *Микроядерный тест буккального эпителия ротовой полости человека*. Воронеж: Издательский дом ВГУ; 2016.
17. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Константинова А.И. Электрофоретическая подвижность и активность Na, K-АТФазы эритроцитов у крыс при стрессе. *Российский физиологический журнал им И.М.Сеченова*. 2014; 100(11): 1297-302.
18. Камшилова Т.Б., Микряков В.Р., Микряков Д.В. Влияние аналога кортизола и транспортного стресса на частоту встречаемости микроядер в эритроцитах периферической крови стерляди. *Биология внутренних вод*. 2013; 2: 94-6.
19. Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., Ильинских И.Н. *Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность*. Томск; Томский государственный университет; 1992.

### References

1. Maslova M.N. Molecular mechanisms of stress. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2005; 91(11): 1320-28. (in Russian)
2. Baraboy V.A. *Stress: priroda, biologicheskaya rol', mekhanizmy, iskhod*. Kiev: Fitosotsiotsentr; 2006. (in Russian)

3. Krylov V.N., Deryugina A.V., Pleskova S.N. Electrophoretic mobility and morphometry of the rat erythrocytes under stress conditions. *Sovremennye meditsinskie tekhnologii*. 2010; 4: 23-7. (in Russian)
4. Deryugina A.V., Martusevich A.A., Veselova T.A. Izvestiya Molecular and cellular mechanisms of realization of the stress reaction of the organism. *Izvestiya ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2015; 3: 58-3. (in Russian)
5. Filaretov A.A., Podvigina T.G., Filoretova L.P. *Adaptation as a function of the pituitary-adrenal system [Adaptatsiya kak funktsiya gipofizarno-adrenalovoy sistemy]*. St. Petersburg, Nauka; 1994. (in Russian)
6. Gushhin I.S. *Allergic inflammation and its pharmacological control [Allergicheskoe vospaleniye I ego farmakologicheskiiy kontrol]*. Moscow; Farmrusprint; 1998. (in Russian)
7. Levinski M.V., Kalaev V.N., Butorina A.K. Analysis of frequency of cells with micronuclei in bukkalno epithelium and the levels of serum antibodies among children and adults living in different parts of the city of Chisinau. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik „Chelovek i ego zdorov’e”*. 2008; 2: 12-7. (in Russian)
8. Vovk YA. R., Linnik M. S., Morozova E. N., Morozov V. N. The structural features of the buccal epithelium of the female students from India in different phases of the menstrual cycle. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2016; 5(3): 13-6. (in Russian)
9. Yurchenko V.V. *Micronucleus test boccalini the epithelial cells of man [Mikroyadernyy test na bukkalnykh epiteliotsitakh cheloveka]*. Moscow; Genius, 2007. (in Russian)
10. Kadomtsev D.V., Pasechnikova E.A., Golubev V.G. Zoletil-xylazine anesthesia in experiments in rats. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 20116; 5: 56-7. (in Russian)
11. *Guidelines for working with laboratory animals for the staff of the MEDICAL faculty sbei HPE rnsmu. N. And. Pirogov dedicated to conducting preclinical trials [Rukovodstvo po rabote s laboratornymi zhivotnymi dlya sotrudnikov GBOU VPO RNIMU im. N.I. Pirogova Minzdrava Rossii, zanyatykh provedeniem doklinicheskikh ispytaniy]*. GBOU VPO RNIMU im. N.I. Pirogova Minzdrava Rossii. Moscow; 2015. (in Russian)
12. Kozinets G. I. *Blood tests and urine tests. Clinical significance. [Interpretatsiya analizov krovi i mochi i ikh klinicheskoe znachenie]*. Moscow; Prakticheskaya meditsina; 2008. (in Russian)
13. Chechetkin A.V., Kas'yanov A.D., Golovanova I.S. Washed red blood cells: clinical use, quality assessment, methods of obtaining. *Transfuziologiya*. 2016; 17 (4): 29-39. (in Russian)
14. Guidance on preparation, use and quality assurance of plasma components. Washed red blood cells. *Transfuziologiya*. 2002; 4: 85-7. (in Russian)
15. Haramonenko S.S., Rakityanskaya A.A. *Electrophoresis of blood cells in normal and pathological conditions [Elektroforez kletok krovi v norme i pri patologii]*. Minsk, Belarus'; Minsk: Belarus'; 1974. (in Russian)
16. Kalaev V.N., Nechaeva M.S., Kalaeva E.A. *Micronucleus test of buccal epithelium of the human oral cavity [Mikroyadernyy test bukkal'nogo epiteliya rotovoy polosti cheloveka]*. Voronezh; Izdatel'skiy dom VGU; 2016. (in Russian)
17. Krylov V.N., Deryugina A.V., Konstantinova A.I. Electrophoretic mobility and activity of Na, K-ATPase of red blood cells in rats under stress. *Rossiyskiy fiziologicheskiiy zhurnal im I.M. Sechenova*. 2014; 100 (11): 1297-302. (in Russian)
18. Kamshilova T.B., Mikryakov V.R., Mikryakov D.V. Effect of analog of cortisol and the stress of traffic in the incidence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes of starlet. *Biologiya vnutrennikh vod*. 2013; 2: 94-6. (in Russian)
19. Il'inskikh N.N., Novitskiy V.V., Vanchugova N.N., Il'inskikh I.N. *The micronuclear analysis and cytogenetic instability [Mikroyadernyy analiz i tsitogeneticheskaya nestabil'nost']*. Tomsk; Tomskiy gosudarstvennyy universitet; 1992. (in Russian)

#### Сведения об авторах:

**Дерюгина Анна Вячеславовна**, доктор биол. наук, доцент, зав. каф. физиологии и анатомии «Института биологии и медицины» ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;

**Иващенко Марина Николаевна**, канд. биол. наук, доцент каф. физиологии и биохимии животных ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Минсельхоза России, e-mail: mi11207@ Rambler.ru;

**Игнатьев Павел Сергеевич**, канд. физ.-мат. наук, начальник отдела медицинских изделий и микроскопии ЗАО «Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова»;

**Самоделькин Александр Геннадьевич**, доктор биол. наук, проф., зав. каф. физиологии и биохимии животных ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Минсельхоза России;

**Золотова Марина Вианоровна**, канд. филологич. наук, доцент каф. английского языка для гуманитарных специальностей ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;

**Шабалин Михаил Александрович**, ассистент каф. физиологии и анатомии Института биологии и медицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;

**Грачева Елена Александровна**, аспирант каф. физиологии и анатомии Института биологии и медицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

**Караогланова Т.Э., Падалко В.В.**

# Методика проблемного обучения как способ обучения в медицинском ВУЗе

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»  
Минздрава России (Сеченовский Университет),  
119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8

Формирование клинического мышления и умения на основе полученных знаний проводить дифференциальную диагностику при оценке состояния пациента является основным вопросом преподавания любого предмета в медицинском ВУЗе. Одной из самых эффективных современных технологий обучения, способствующей развитию и становлению современной компетентной личности, способной к творческому поиску, принятию самостоятельного решения и инициативной деятельности, является проблемное обучение. Данная методика должна заложить у студентов основу получения профессиональных навыков решения поставленных задач на основе системы получения знаний: лекция – учебник – семинарское занятие. Технология проблемного обучения предусматривает активную роль преподавателя, который должен обозначить проблему и руководить поиском ее решения, и одновременно, активной роли студентов, поскольку на основе имеющейся информации они должны понять и принять учебную проблему и продемонстрировать умение использовать полученные знания в ее разрешении. Методика преподавания с использованием технологии проблемного обучения представлена на примере семинарского занятия на тему: «Типовые формы патологии системы эритроцитов, значение для дифференциальной диагностики типовых патологических процессов».

**Ключевые слова:** метод проблемного обучения; роль преподавателя в семинарском занятии; становление компетентной личности; анемии; эритроцитоз.

**Для цитирования:** Караогланова Т. Э., Падалко В. В. Методика проблемного обучения как способ обучения в медицинском ВУЗе. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 112-117.

**DOI: 10.25557/0031-2991.2019.01.112-117**

**Для корреспонденции:** *Караогланова Татьяна Эдуардовна*, канд. мед. наук, доцент  
каф. патофизиологии лечебного факультета, e-mail: t.e.kar@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

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

**Поступила** 16.04.2018

**Karaoglanova T.E., Padalko V.V.**

## THE TECHNIQUE OF PROBLEM-BASED LEARNING AS A WAY OF TEACHING IN A MEDICAL UNIVERSITY

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),  
Trubetskaya Str. 8, 119991, Moscow, Russian Federation

Formation of clinical thinking and the ability to make a knowledge-based differential diagnosis by evaluating a patient is the main goal of teaching any subject in a medical school. The problem-based teaching is one of the most effective modern teaching approaches, which provides development and formation of a modern, competent person capable of creative search, independent decision making, and proactive actions. This methodology should build a foundation for students to obtain professional skills for solving assigned tasks based on the knowledge acquisition system: lecture-tutorial-seminars. The problem-based teaching assumes an active role of the teacher who should identify the problem and lead the search for a solution. At the same time, the role of students is active as well, since, on the basis of available information, they should understand and accept the training problem and demonstrate the ability to use the acquired knowledge for its solution. Teaching methods using the technique of problem-based teaching are exemplified by a seminar class on "Pathological types of the erythrocyte system and their significance for differential diagnosis of typical pathological processes".

**Keywords:** method of problem-based learning; the role of the teacher in the seminar; formation of competent personality, anemia, erythrocytosis.

**For citations:** Karaoglanova T. E., Padalko V.V. The technique of problem-based learning as a way of teaching in the medical university. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy; Russian Journal).* 2019; 63(1): 112-117. (in Russian).

**DOI: 10.25557/0031-2991.2019.01.112-117**



**For correspondence:** *Tatiana E. Karaoglanova*, MD, Associate Professor at the Department of Pathophysiology of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Moscow 119991, Russian Federation, e-mail: t.e.kar@mail.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Karaoglanova T.E., <https://orcid.org/0000-0002-6547-1394>

Padalko V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4473-9790>

**Received** 16.04.2018

*Знания — дети удивления и любопытства.*

Луи де Бройль

Основным вопросом преподавания любого предмета в медицинском ВУЗе является формирование клинического мышления и умения на основе полученных знаний проводить дифференциальную диагностику при оценке состояния пациента. Существует целый ряд педагогических приемов формирования знаний и умений, среди которых, одной из самых эффективных современных технологий обучения, способствующей развитию и становлению современной компетентной личности, способной к творческому поиску, принятию самостоятельного решения и инициативной деятельности, является проблемное обучение [1].

Данная методика известна начиная с работ американского философа, психолога и педагога Дж. Дьюи (1859-1952). Метод основан на его теоретических положениях, получил распространение в советской и зарубежной педагогике в 20-30-х годах XX века [2]. Технология проблемного обучения была предназначена для формирования познавательного интереса учащихся. Данная методика должна заложить у студентов основы получения профессиональных навыков решения поставленных задач на основе системы получения знаний: лекция — учебник — семинарское занятие.

Центральные понятия проблемного обучения — проблема, гипотеза, проблемная ситуация, проблемный вопрос, проблемная задача, творческая задача, самостоятельная работа.

Технология проблемного обучения предусматривает активную роль преподавателя, который должен обозначить проблему, руководить поиском ее решения, и активировать участие студентов, поскольку на основе имеющейся информации студенты должны понять, принять учебную проблему и продемонстрировать умение использовать полученные знания в ее решении.

Учебная проблема — это противоречие между известными студенту знаниями, умениями и навыками, и новыми или даже ранее неизвестными ему фактами или явлениями, для понимания и объяснения которых прежних знаний недостаточно. Разрешение учебной проблемы студент должен получить либо под руководством преподавателя, либо самостоятельно. Данное вза-

имодействие преподаватель — студент, в силу сложности поставленных задач, должно идти по нарастающей, с постановкой промежуточных проблемных вопросов.

Для проблемного обучения характерно выполнение следующих действий студентов: выявление проблемы, формулирование задачи и средств ее решения, поиск решения, собственно решение, то есть самостоятельное воспроизведение теоретически известных истин или даже вариант трактовки неизвестного явления. Полученные компетенции позволяют специалисту в дальнейшем не столько обладать готовыми знаниями, сколько быть готовым к поиску и осмысливанию новых знаний [3].

Технология проблемного обучения относится к развивающим педагогическим технологиям и имеет следующую структуру:

1. Создание проблемной ситуации педагогом и принятие проблемной ситуации студентом.
2. Выявление проблемы исследования
3. Управление поисковой деятельностью обучаемых
4. Самостоятельный поиск решения студентом
5. Обсуждение выводов [4].

Наиболее наглядно преподавание с использованием технологии проблемного обучения представлено на примере семинарского занятия. Тема: «*Типовые формы патологии системы эритроцитов, значение для дифференциальной диагностики типовых патологических процессов*».

Преподаватель формулирует условия задачи, рассмотрение которой позволит оценить состояние пациента и предложить варианты этиопатогенетической терапии [5, 6].

Известными знаниями для студентов являются материалы лекции и учебной литературы, а также знания, полученные при изучении смежных дисциплин: гистологии, нормальной физиологии, биохимии. При этом студент должен знать следующее:

1. Классификацию нарушений системы эритроцитов
2. Механизмы включения основных факторов эритропоэза
3. Материалы основных модулей общей патофизиологии (типичные механизмы повреждения клеток, гипоксия, нарушения КОС, нарушения тканевого роста и т.п.)

Анализ гемограммы начинается с оценки количественных показателей системы красной крови: гемоглобина, эритроцитов, ретикулоцитов и т.д. Перед студентом встает проблема: проанализировать имеющиеся показатели и установить их взаимосвязь.

А. При обнаружении снижения количества гемоглобина ниже гендерного уровня, вне зависимости от значений остальных показателей красной крови, студент должен установить наличие *анемии* и в дальнейшем рассмотреть возможный патогенез ее развития. При этом привлекаются знания, как нормальной физиологии, так и патофизиологии.

Студент должен доказательно, поэтапно проанализировать состояние каждого показателя гемограммы, отражающего состояние системы красной крови:

1. Определить *тип эритропоэза*: возможные варианты
  - нормобластический
  - мегалобластический

Для этого студенту необходимо рассчитать цветовой показатель, оценить характеристики эритроцитов (размер, средний диаметр эритроцитов, их форму, наличие включений).

2. При анализе любого типа анемии прогностически важно оценить *регенераторные способности костного мозга*. По количеству ретикулоцитов в циркулирующей крови возможны варианты:

- арегенераторная (0%)
- гипорегенераторная (<2%) или отсутствие роста числа ретикулоцитов на фоне нарастающей тяжести анемии;
- регенераторная (>2%)
- гиперрегенераторная (>10%)

3. Важную информацию несет оценка размеров и формы эритроцитов. По этому критерию анемии делятся на:

- нормоцитарные
- микроцитарные
- макроцитарные

За каждым из этих типов стоит состояние эритропоэза в костном мозге или конкретные формы патологии этого процесса, обусловленные определенной, в том числе и наследственной этиологией. В последнем случае обычно изменение размеров эритроцитов сочетается с изменением их формы (пойкилоцитоз). Более того, конкретное изменение формы эритроцитов (овалоцитоз, сфероцитоз, эхиноцитоз, стоматоцитоз и др.) во многом определяются характером генетических дефектов, которые по проявлениям делятся на три группы: дефекты структуры мембраны эритроцита (мембранопатии); дефекты ферментных систем - чаще ферментов энергообеспечения или ферментов Na/K помп (ферментопатии); дефекты структуры гемоглобина

-SHb, BHb, MtHb (гемоглобинопатии). Понимание этого значительно уточняет направление поиска этиологии и причины развития конкретной анемии.

4. Проанализировать или, при необходимости, уметь перепроверить расчет цветового показателя, который отражает усредненное количество гемоглобина в эритроците.

В соответствии с полученным результатом, анемии делятся на:

- нормохромные (0,9-1,05, что соответствует 30 - 35 пг)
- гипохромные (<0,85)
- гиперхромные (>1,1)

Это во многом характеризует структуру гемоглобинопоза в костном мозге. К тому же все гиперхромные анемии в соответствии с законами физиологии автоматически являются макроцитарными, но не все макроцитарные анемии - гиперхромными.

В некоторых случаях, для понимания сути анемии, необходима оценка показателя гематокрита, который отражает соотношение объемов форменных элементов и плазмы крови. В соответствии с этим анемии могут быть:

- истинные (с нормальным гематокритом)
- ложные (с низким гематокритом за счет гемодилуции)
- скрытые (с высоким гематокритом за счет гемоконцентрации).

Полученные и правильно оцененные в процессе поэтапного анализа гемограммы показатели системы красной крови, должны позволить студенту самостоятельно составить гематологический «портрет» конкретной анемии. *Это является отправной точкой выяснения патогенеза данной анемии.*

Дело в том, что анемии схожи не только в своем главном гематологическом признаке - снижении уровня гемоглобина, но и в своем клиническом содержании - все они являются вторичными (симптоматическими), то есть возникают как одно из проявлений в рамках довольно большого круга разных по этиологии и патогенезу болезней. Поэтому правильное распознавание типа анемии является важным компонентом в диагностике и терапии основного заболевания, которое привело к развитию данной анемии.

Следовательно, студент в дальнейшем должен:

5. Определить характер анемии по механизму развития: возможные варианты:

- *дизэритропоэтический*
- *постгеморрагический*
- *гемолитический*

Для этого студенту необходимо, исходя из показателя насыщения эритроцитов гемоглобином и его струк-

туры, их размера, определить механизм развития анемии. Можно предположить, как *дисэритропоэтический* (дефицит В12, фолиевой кислоты, железа), так и *постгеморрагический* патогенез. При этом тип эритропоэза уточняется исходя из совокупности изучаемых показателей.

Студент должен предположить, на основании имеющихся знаний, причины дефицита каждого из указанных факторов эритропоэза, а также обозначить другие их проявления.

- При развитии *гипо-и апластических анемий* студент должен дифференцировать варианты патогенеза:

- тотальный, протекающий с редукцией одновременно красного и белого ростков кроветворения

- парциальный с избирательным угнетением красного ростка кроветворения.

- При анализе *анемий, связанных с нарушенным кровообразованием*, студент привлекает знания по общей этиологии патологических процессов:

- *анемии при хронических заболеваниях* инфекционно-воспалительного характера, системных заболеваниях соединительной ткани из-за нарушения метаболизма железа, недостаточной продукции эритропоэтина, угнетения эритропоэза, укорочения продолжительности жизни эритроцитов

- *анемии при злокачественных новообразованиях* из-за метастатического поражения костного мозга, миелофиброза, а также из-за цитокин опосредованного угнетения эритропоэза;

- *анемии при эндокринных заболеваниях* из-за угнетения пролиферативной активности эритроидных прекурсоров высокими концентрациями таких гормонов как тироксин, кортизол, тестостерон;

- *анемии при заболеваниях печени* из-за прямого токсического влияния на клетки-предшественницы гемопоэза и непосредственно на внутриклеточный метаболизм эритроцитов, что снижает их способность к деформации, а также в результате кровотечения из расширенных вен желудочно-кишечного тракта и снижения свертываемости крови;

- *анемии при заболеваниях почек* из-за снижения синтеза эритропоэтина и сокращения срока жизни эритроцитов при действии токсических продуктов азотистого обмена;

- *Анемии, развивающиеся в результате повышенного гемолиза эритроцитов*, студенты должны, основываясь на знаниях нормальной физиологии, предположить виды гемолиза:

- *внутриклеточный* – разрушение «маркированных» IgG эритроцитов в РЭС при наследственной патологии мембраны эритроцитов, нарушениях активности ферментов, синтеза гемоглобина, при несовместимости по эритроцитарным антигенам между матерью и плодом и

при гемотрансфузиях и сопровождающееся спленомегалией;

- *внутрисосудистый* – комплементзависимый лизис «маркированных» IgM (реже IgG) эритроцитов непосредственно в кровотоке при действии внешних факторов, вызывающих прямое или опосредованное повреждение клеток, сопровождающееся гемоглобинурией;

- *аутоиммунные гемолитические анемии*, сопровождающиеся внутриклеточным или внутрисосудистым гемолизом, возникающим в результате образования аутоантител к поверхностным антигенам эритроцитов при изменении антигенной структуры их мембраны, или при нарушениях в самой ИКС больного.

Исходя из возможности развития гемолитического варианта анемии, перед студентом ставится задача дополнить имеющиеся данные гемограммы необходимыми показателями, указывающими на гемолиз эритроцитов:

- *гемоглобинемия* - при превышении гемоглобин связывающей емкости гаптоглобина плазмы крови,

- *гемосидеринурия* - при реабсорбции гемоглобина с дальнейшим окислением в эпителии канальцев до гемосидерина,

- *гемоглобинурия* - при недостаточности его реабсорбции в почечных канальцах,

- наличие *антиэритроцитарных антител, гипербилирубинемия*.

Завершая анализ анемии студент должен не только выяснить ее происхождение и этапы патогенеза, но и оценить ее тяжесть, поскольку любая анемия приводит к развитию гипоксии гемического типа.

Ее клиническая тяжесть и последствия определяются степенью снижения уровня гемоглобина в крови и поэтому выделяют:

- анемии легкой степени - снижение Нв до 100 г/л; это обычно компенсированная форма гипоксии, которая в покое может и не проявляться;

- анемия средней тяжести - снижение Нв до 60 г/л; эта гипоксия некомпенсированная и по мере нарастания осложняется вторично-тканевой формой (по типу порочных кругов), и может привести к структурным повреждениям (гипоксическая дистрофия) некоторых паренхиматозных органов (печень, сердце, почки);

- анемия тяжелой степени - снижение Нв ниже красной черты - 60 г/л. Длительное течение такой анемии угрожает развитием системной гипоксической дистрофии всех паренхиматозных органов;

Эта оценка важна тем, что в последних двух вариантах анемия из симптоматической трансформируется в опасный патогенетический фактор, получивший название «анемический синдром», который в дальнейшем может определять течение и исход основного заболевания.

Б. При увеличении показателей числа эритроцитов и уровня гемоглобина развивается другая форма патологии-эритроцитоз.

На основании имеющихся знаний студент должен предположить причины активации эритропоэза, а также обозначить их виды и возможные клинические проявления.

Возможны 2 варианта эритроцитозов:

- *первичные абсолютные, при нормальной или даже сниженной продукции эритропоэтина.* Данная форма эритроцитоза, по сути, является проявлением некоторых заболеваний, первично поражающих эритроидный росток или всю миелоидную ткань и часто имеет наследственную или онкогенную природу.

Имеются семейные варианты эритроцитозов, как с повышенной, так и с нормальной продукцией эритропоэтина. Особое место занимает болезнь Ваккеза - эритроцитоз вследствие нарушения регуляции пролиферации на уровне КОЕ эритроидного и миелоидного ростков. Поэтому гематологически это проявляется совокупным увеличением в крови и эритроцитов, и всех гранулоцитов, и тромбоцитов.

- вторичные абсолютные эритроцитозы - обусловленные увеличением гемопоэтической функции костного мозга *на фоне повышенной продукции эритропоэтина.*

В зависимости от их диагностической значимости, они подразделяются на:

- компенсаторные (например, при хронической сердечной, дыхательной недостаточности),

- симптоматические (за счет продукции эритропоэтина опухолевыми клетками почек, карциноме печени, раке желудка);

- эндокринные (за счет прямого или опосредованного усиления его продукции юкстагломерулярным аппаратом при тиреотоксикозе, синдроме Иценко-Кушинга, гиперальдостеронизме, гиперандрогемии);

Общим патогенетическим механизмом этих эритроцитозов является стимулируемая гипоксией гиперпродукция эритропоэтина.

- вторичные *относительные* эритроцитозы, обусловленные гемоконцентрацией при гипогидратации или стресс-реакцией за счет выброса эритроцитов из органов-депо. В данном случае важной подсказкой в решении задачи является показатель гематокрита.

Завершая анализ данного фрагмента гемограммы, необходимо установить наличие и возможную взаимосвязь между изменениями в системе красной (эритроциты) и белой (лейкоциты) компонентов данного анализа.

Анализ задач по данному алгоритму повторяется в течение семинарского занятия несколько раз, что по-

зволяет закрепить полученные навыки анализа и дифференциальной диагностики данной патологии, а также продемонстрировать разнообразие клинических ситуаций, встречающихся при разных формах патологии.

### Литература

1. Вазеевская Н.Е., Прейгерман Л.М. Проблемное обучение как одна из современных технологий обучения. *V Общероссийская конференция с международным участием «Медицинское образование—2014»*, Сборник тезисов (г. Москва, 2–3 апреля 2014 года). М.; Издательство Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. 2014; 80–4.
2. Селевко Г.К. *Современные образовательные технологии DOC. Учебное пособие.* М.; Народное образование. 1998.
3. Артюхина А.И., Гетман Н.А., Голубчикова М.Г., Лопанова Е.В., ред., Рабочих Т.Б., Рыбакова Н.Н. *Компетентностно-ориентированное обучение в медицинском вузе: Учебно-методическое пособие.* Омск: ООО «Полиграфический центр КАН». 2012.
4. Психолого-педагогические основы профессиональной деятельности преподавателя медицинского вуза. *Методические рекомендации для преподавателей медицинских вузов.* Ред. Вазеевская Н.Е. М.; Изд-во Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. 2012.
5. Литвицкий П.Ф. Типовые формы патологии системы крови. В кн.: *Патофизиология*, учебник в 2-х томах, т 2, 5-е издание, Москва, ГЭОТАР-МЕДИА. 2012; 29-50.
6. Гольдберг Е.Д., Новицкий В.В., Уразова О.И. Патофизиология системы крови. В кн.: *Патофизиология*, учебник в 2-х томах, т 2, 4-е издание, Москва, ГЭОТАР-МЕДИА. 2010; 19-62.

### References

1. Vazheevskaya N.E., Preygerman L.M. Problem training as one of the modern teaching technologies. In: *V All-Russian conference with international participation "Medical Education-2014", Proceedings Collection (Moscow, April 2-3, 2014).* Problemnoye obucheniye kak odna iz sovremennykh tekhnologiy obucheniya. *V Obshcherossiyskaya konferentsiya s mezhdunarodnym uchastiyem «Meditsinskoye obrazovaniye—2014»*, Sbornik tezisov (Moskva, 2–3 aprelya 2014 goda). Moscow: Publishing House of the First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov. Izdatel'stvo Pervogo Moskovskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta imeni I.M. Sechenova.
2. Selevko G.K. *Modern educational technologies DOC. Sovremennyye obrazovatel'nyye tekhnologii DOC. Uchebnoye posobiye.* Narodnoye obrazovaniye. Moscow; Public Education, 1998. (in Russian)
3. Artyukhina A.I., Getman N.A., M.G. Golubchikova M.G., Lopanova E.V., ed., Rabochikh T.B., Rybakova N.N.; Competent-oriented training in a medical college: *Teaching-methodical benefits.* [Kompetentnostno-orientirovannoye obucheniye v meditsinskom vuze: *Uchebno-metodicheskoye posobiye*]. Omsk: LLC "Polygraphic Center KAN". 2012. (in Russian)
4. Psycho-pedagogical foundations of professional activity of the teacher of medical institutions of higher education. *Guidelines for teachers of medical universities.* Ed. Vazheevskaya N. E., Moscow, Publishing House of the First MSM named after I.M. Sechenov. 2012; 172. (in Russian)
5. Psikhologo-pedagogicheskiye osnovy professional'noy deyatel'nosti prepodavatelya meditsinskogo vuza. *Metodicheskiye rekomendatsii dlya prepodavatelya meditsinskikh vuzov.* Red. Vazheevskaya N.Ye. M.: Izd-vo Pervogo MGUMU im. I.M. Sechenova. 2012; 172.

6. Litvitskiy P.F. Typical forms of the pathology of the blood system. In: *Pathophysiology*, textbook in 2 volumes, t 2, 5th edition, Moscow, GEOTAR-MEDIA. 2012; 29-50. (in Russian)
7. Litvitskiy P.F. Tipovyye formy patologii sistemy krovi. V kn.: *Patofiziologiya*, uchebnik v 2-kh tomakh, t 2, 5-ye izdaniye, Moscow, GEOTAR-MEDIA. 2012; 29-50.
8. Gol'dberg E.D., Novitskiy V.V., Urazova O.I. Pathophysiology of the blood system. In: *Pathophysiology*, textbook in 2 volumes, t 2, 4th edition, Moscow, GEOTAR-MEDIA. 2010; 19-62. (in Russian)

**Сведения об авторах:**

**Караогланова Татьяна Эдуардовна**, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии ФГАОУ ОВ «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет);

**Падалко Владимир Васильевич**, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии ФГАОУ ОВ «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет).

**Мальцева Л.Д., Горбачёв Н.А., Морозова О.Л.**

# Новейшая история кафедры патофизиологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета): на рубеже XX-XXI веков (к 170-летию кафедры)

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»  
Минздрава России (Сеченовский Университет),  
119992, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8

Представлены этапы формирования и развития кафедры патологической физиологии (общей патологии) в период XX-XXI веков в хронологии деятельности заведующих кафедрой. Сведения об основателе кафедры — профессоре А.И. Полунине и создателе экспериментальной базы, а также клинико-экспериментальной направленности ее научной и педагогической деятельности - профессоре А.Б. Фохте представлены в отдельных публикациях. Профессор Г.П. Сахаров (1914—1929) разрабатывал сложные методологические проблемы теоретической медицины; ввел в курс преподавания общей патологии ряд новых разделов (нозология, иммунопатология, эндокринная патология); предложил проводить демонстрационные эксперименты на занятиях со студентами; организовал вначале семинарские, а затем и практические занятия со студентами по проблемам воспаления, аллергии, патологии пищеварения. Профессор С.С. Халатов (1929—1947) рассматривал патофизиологию как основную теоретическую дисциплину, формирующую естественно-научную базу для понимания клинической патологии и практической деятельности врача. Профессор С.М. Павленко (1947—1976) способствовал подготовке в медицинских вузах нового поколения научных кадров, в том числе через студенческое научное творчество. Под его руководством решались также крупные методологические научные проблемы. В период заведования кафедрой профессором Н.И. Лосевым (1976—1991) большое внимание уделялось оптимизации содержания и методов преподавания в медицинских вузах. Под руководством чл.-корр. РАН, профессора П.Ф. Литвицкого (с 1991 года по настоящее время) главными направлениями деятельности коллектива кафедры стали интеграция результатов современных клинических и экспериментальных научных исследований социально значимых болезней человека; обучение студентов основам патофизиологии путем решения реальных — профессиональных врачебных задач с использованием патофизиологического анализа данных о пациенте; синтез патофизиологического и клинического подходов к анализу состояния больного человека.

**Ключевые слова:** история патофизиологии; научная школа; кафедра патофизиологии; Сеченовский Университет.

**Для цитирования:** Мальцева Л.Д., Горбачёв Н.А., Морозова О.Л. Новейшая история кафедры патофизиологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета): на рубеже XX-XXI веков (к 170-летию кафедры). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(1): 118-124.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.118-124

**Для корреспонденции:** Мальцева Лариса Дмитриевна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии, e-mail: lamapost@mail.ru

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи нигде ранее не публиковались.

**Поступила** 15.05.2018

**Maltseva L.D., Gorbachev N.A., Morozova O.L.**

## The newest history of department of pathophysiology of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University): at the turn of the 20th and 21st centuries (in honor 170th anniversary of department)

FSAEI of HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University  
of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University),  
8, Trubetskaya str., 119992, Moscow, Russia

It is characterized stages of formation and development of substantive department of pathological physiology (general pathology) in chronology of activity of heads of department in the period of XX-XXI centuries. Information about the founder of department — professor A.I. Polunin and about the creator of experimental base and also clinical-experimental approach of its scientific and pedagogical activity — professor A.B. Fokht is presented in individual publications. Professor G.P. Sakharov (1914—1929) developed methodological problems of theoretical medicine; he introduced in course of teaching of general pathology a number of new sections (nosology, immunopathology, endocrinopathology); he offered to conduct demonstrative experiments in lessons with students; he

organized seminars and later practical lessons about inflammation, allergy and pathology of digestion with students. Professor S.S. Khalatov (1929—1947) considered pathophysiology like main theoretical subject forming natural science base for understanding clinical pathology and practice of doctors. Professor S.M. Pavlenko (1947—1976) contributed the preparation of the new generation of scientific personnel in medical high schools including student scientific society. It was decided major methodological scientific problems under his direction. It was given a great attention of optimization of content and methods of teaching in medical high schools in the period of chairing of professor N.I. Losev (1976—1991). The main directions of employees of the department under chairing of corresponding member of RAS, professor P.F. Litvitskiy (1991-present) are integration of the results of modern scientific studies of socially significant diseases; teaching of students by solving of real medical tasks with using pathophysiological analysis of patient data; synthesis of pathophysiological and clinical approaches to the analysis of the patient's condition.

**Keywords:** history of pathophysiology; scientific school; pathophysiology department; Sechenov University.

**For citation:** Maltseva L.D., Gorbachev N.A., Morozova O.L. The newest history of department of pathophysiology of I.M. Sechenov First moscow state medical university (Sechenov University): at the turn of the 20<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> centuries (in honor 170<sup>th</sup> anniversary of department). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1):118-124. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.118-124

**For correspondence:** Larisa D. Maltseva, PhD, Associate Professor of the Department of Pathophysiology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8 Trubetskaya str., Moscow 119992, Russian Federation, e-mail: lamapost@mail.ru

**Conflict of interest.** The authors state that there is no conflict of interest.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Maltseva L.D., <http://orcid.org/0000-0002-4380-4522>

Morozova O.L., <http://orcid.org/0000-0003-2453-1319>

**Received** 15.05.2018

В 2018 году Сеченовский Университет отмечает свое 260-летие, а кафедра патофизиологии — 170-летие со дня рождения профессора А.Б. Фохта — основоположника базиса патофизиологии как клинко-ориентированной дисциплины и научной специальности.

Направления деятельности старейшей кафедры патофизиологии России — кафедры Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета), определенные основателями патофизиологии, реализовались их учениками и преемниками в XX и XXI веке. Начало XX века стало периодом расцвета патофизиологии благодаря усилиям профессоров А.М. Филомафитского, А.И. Полунина, А.Б. Фохта и др. Кафедра патофизиологии с этого времени становится экспериментально-клинко-ориентированной дисциплиной.

#### **Кафедра патологической физиологии в период руководства профессором Г.П. Сахаровым (1914-1929).**

В 1914 году заведующим кафедрой был назначен ученик А.Б. Фохта — Гавриил Петрович Сахаров. Профессор Г.П. Сахаров и коллектив кафедры интенсивно развивали новое направление в науке — иммунопатологию. В свое время, проходя стажировку в лаборатории известного французского патолога Мориса Артюса, Гавриил Петрович выявил и описал вместе с ним «феномен сывороточной анафилактической реакции», развивающейся в ответ на воздействие чуже-

родного белка. Этот феномен впоследствии был назван их именами: Артюса-Сахарова. Кроме того на кафедре изучались этиология и патогенез инфекционных болезней, эндокринопатий, новообразований. Профессор Г.П. Сахаров являлся одним из основоположников отечественной эндокринологии: в 1929 году он возглавил Московский институт экспериментальной эндокринологии; под его редакцией (совместно с профессором В.Д. Шервинским) было издано первое в СССР фундаментальное руководство «Основы эндокринологии» [1]. Научную школу профессора Г.П. Сахарова прошли многие известные патофизиологи и клиницисты, ставшие впоследствии профессорами и руководителями различных коллективов. К их числу относятся профессора С.И. Чечулин, Н.И. Розанов, Б.Н. Могильницкий, Ф.Ф. Венулет, С.Я. Капланский, Т.И. Беслекоева. В середине 1920-х годов при кафедре была открыта аспирантура.

Профессор Г.П. Сахаров разрабатывал методологические проблемы теоретической медицины. В 1910 году он издал труд «О целесообразности в патологии», в 1924 году — монографию «Происхождение пола и смысл полового размножения», в 1934 и 1935 году увидели свет 2 издания его книги «Методология патологии» [1, 2].

Гавриил Петрович Сахаров был блестящим лектором и методистом. Он ввел в преподавание патологии ряд новых разделов (нозологию, иммунопатологию, эндокринопатологию); разработал демонстрационные экспери-

менты для занятий; организовал вначале семинарские, а затем и практические занятия со студентами по проблемам воспаления, аллергии, патологии пищеварения.

В 1934 году Гавриил Петрович организовал и возглавил секцию патофизиологов Всесоюзного общества патологов, а в 1946 году — Московское научное общество патофизиологов. Он был инициатором и одним из создателей Российского эндокринологического общества [1, 2].

#### **Кафедра патологической физиологии период руководства профессором С.С. Халатовым (1929—1947)**

В 1929 году кафедру возглавил профессор Семен Сергеевич Халатов, развивший основанное профессором А.Б. Фохтом клинико-экспериментальное направление в патофизиологии и общей патологии. С этой целью С.С. Халатов организовал для аспирантов специализированный курс клинической практики на базе стационара кафедры факультетской терапии. Одновременно на кафедре совершенствовались содержание и методическое обеспечение лекционного курса и практических занятий по патофизиологии экспериментально-физиологической и клинико-экспериментальной направленности. Семен Сергеевич рассматривал патофизиологию как основную теоретическую дисциплину, формирующую естественно-научную базу клинической патологии и практической деятельности врача. Профессор С.С. Халатов придавал большое значение содержанию учебного курса патофизиологии [1, 3]. Основываясь на богатом педагогическом опыте, широком кругозоре, глубоком понимании задач патофизиологии, Семен Сергеевич, профессор Н.Т. Шутова и их коллеги в 1933—1945 гг. выпустили 3 издания учебника по патологической физиологии для студентов медицинских вузов страны [1, 3].

Осознавая необходимость дальнейшего развития экспериментальной базы клинических исследований, профессор С.С. Халатов, заручившись поддержкой известных ученых страны, возглавлявших клинические кафедры — профессоров Н.Н. Бурденко и М.П. Кончаловского, направил свою энергию на организацию при кафедре Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ). В 1933 году ЦНИЛ начала работу под руководством ученика профессора С.С. Халатова и академика И.П. Павлова — профессора кафедры Сергея Ионовича Чечулина. Во время войны на базе ЦНИЛ проводились исследования по созданию и испытанию новых лечебных средств и методов реабилитации раненых бойцов.

С 1943 года на кафедре разрабатывал методы оживления организма В.А. Неговский (работа была начата

им еще в Институте нейрохирургии Наркомздрава СССР под руководством профессора Н.Н. Бурденко). В течение короткого срока В.А. Неговским и его сотрудниками был предложен и разработан метод внутриартериального переливания крови, спасший жизни сотням тяжело раненных красноармейцев в госпиталях прифронтовых районов. Позднее профессором В.А. Неговским был организован первый в стране Институт реаниматологии, ставший главным в разработке методов восстановления жизнедеятельности организма.

Главной научной проблемой коллектива кафедры, возглавляемой профессором С.С. Халатовым, было изучение механизмов нарушений холестеринового обмена, им была разработана холестериновая модель атеросклероза. Сотрудниками кафедры и ЦНИЛ изучалась роль эндогенного и экзогенного холестерина в развитии атеросклероза. Над изучением этой «проблемы века» работали П.Д. Горизонтов, Н.Т. Шутова, О.В. Лебедева, В.И. Глод-Вершук, О.В. Попов, Г.В. Савастенко, И.А. Черешнев, Б.М. Курцер, С.А. Мухин, П.И. Щеголев. По результатам работы П.Д. Горизонтовым, В.И. Глод-Вершук и Н.Т. Шутовой в 1940 году были опубликованы 3 монографии. В 1946 году профессор С.С. Халатов обобщил результаты научных исследований в книге «Хolestериновая болезнь в ее патофизиологическом и клиническом значении» [1, 2].

Профессор С.С. Халатов активно укреплял позиции патофизиологии, как научной специальности, так и учебной дисциплины. Он участвовал в организации секции патофизиологии Всесоюзного общества патологов (1934) и Московского научного общества патофизиологов (1946). Ранее (1911) он был одним из организаторов Санкт-Петербургского научного общества патологов и его ученым секретарем. Профессор С.С. Халатов активно работал в составе ученого совета Минздрава СССР и ВАКа страны [1, 2].

#### **Кафедра патологической физиологии в период руководства профессором С.М. Павленко (1947—1976)**

С 1947 по 1976 г. кафедру возглавлял ученик профессора Г.П. Сахарова, заслуженный деятель науки РСФСР, профессор Стефан Макарович Павленко. Под его руководством сотрудниками кафедры и ЦНИЛ разрабатывался ряд крупных научных проблем. Одна из них — патогенез постгемотрансфузионного шока. Были установлены фундаментальные факты о важной роли нервной афферентации, а также системных расстройств гемодинамики в патогенезе шока.

Обобщение результатов работ по проблеме реактивности позволило профессору С.М. Павленко сфор-



мулировать теоретические основы концепций о сано-генезе и предболезни. По результатам разработки этих проблем было издано 8 сборников научных трудов. В исследовании принимали участие сотрудники кафедры и ЦНИЛ А.Н. Медеяновский, В.С. Добрянский, Х.М. Марков, Н.Н. Парцхаладзе, И.А. Николаевич, В.С. Гигаури, Е.А. Демуров, А.А. Абиндер, В.Г. Филимонов, Ю.И. Вихляев, Б.Б. Вознесенский, Н.К. Хитров, В.А. Фролов, Н.И. Лосев, Г.А. Дроздова, А.Х. Коган, В.А. Войнов, М.А. Шишло, Т.А. Казанская, А.Н. Овсянников, И.И. Пулин, В.Е. Миклашевский, А.С. Чечулин, В.В. Сучков, А.С. Сизых, В.В. Падалко, Т.Э. Радзевич, П.Ф. Литвицкий и др.

В середине 50-х гг. А.Х. Коганом начались исследования в области экспериментальной онкологии. Им впервые была доказана канцерогенная активность химически инертных пластмасс, описаны возможные механизмы «пластмассового» канцерогенеза. В дальнейшем проблемы онкологии разрабатывались в рамках кандидатских диссертаций учениками профессора А.Х. Когана: М.Р. Личиницером, В.И. Кулицкой, А.С. Сизых, П.Ф. Литвицкий.

Профессором С.М. Павленко уделялось большое внимание совершенствованию методики и методологии преподавания патофизиологии: под его руководством были подготовлены 4 издания методических пособий к практическим занятиям со студентами (1957-1974 гг.), созданы современные учебные программы по патофизиологии для медицинских вузов страны. Профессор С.М. Павленко стал с 1948 года преемником своего учителя – проф. Г.П. Сахарова на посту руководителя Московского научного общества патофизиологов. По инициативе С.М. Павленко в 1950 году было организовано Всесоюзное общество патофизиологов, правление которого он возглавил. В 1974 году им было создано Всесоюзное объединение студенческих научных обществ (ВОСНО) медицинских и фармацевтических вузов. Председателем его был избран профессор С.М. Павленко, а ученым секретарем – С.В. Грачев. Это объединение в течение многих лет координировало развитие студенческого научного творчества в медицинских вузах страны. Оно способствовало подготовке в медицинских вузах нового поколения научных кадров [1, 2].

**Кафедра патофизиологии в период руководства профессором Н.И. Лосевым (1976—1991)**

С 1976 по 1991 г. кафедру возглавлял профессор Николай Иванович Лосев — ученик С.М. Павленко.

Основным научным направлением кафедры в этот период была разработка проблемы гипоксии, являю-

щейся инициальным и/или главным фактором в патогенезе многих заболеваний человека, включая экстремальные и терминальные состояния. Исследования, проводимые сотрудниками кафедры (профессорами Н.И. Лосевым, А.Х. Коганом, доцентами Н.К. Хитровым, В.А. Войновым, В.В. Падалко, Т.Э. Радзевич, П.Ф. Литвицкий, А.И. Ивановым, ассистентами Н.Б. Ромдановой, А.В. Толокновым и др.), выявили характерные закономерности регуляции систем дыхания и кровообращения при нарастающей по тяжести общей и местной гипоксии (дыхательной, тканевой и др.). На основании результатов экспериментов, профессором Н.И. Лосевым была обоснована концепция о регуляторной изоляции нервных центров (дыхательного, сердечно-сосудистого) и сердца от афферентных сигналов при тяжелой общей гипоксии; описаны нейрохимические механизмы и адаптивное значение «феномена изоляции» (Н.К. Хитров); сформулированы представления об адаптивном и патогенном эффектах локальной ишемии и последующей реперфузии сердца (П.Ф. Литвицкий). В серии работ выявлен ранее неизвестный феномен усиления перекисного окисления липидов как при ишемии, так и, особенно, при реперфузии сердца (П.Ф. Литвицкий) и почек (А.Х. Коган); открыто новое явление генерации активных форм кислорода лейкоцитами, сформулирована и аргументирована основная концепция развития гастродуоденальной язвы, включающей как важное звено образование местными тканевыми факторами и лейкоцитами избытка активных форм кислорода (А.Х. Коган). Рядом сотрудников кафедры были выявлены и описаны механизмы повышения резистентности отдельных органов и организма в целом к общей и местной гипоксии, разработаны методы стимуляции процесса адаптации организма к гипоксии.

Большое внимание кафедрой уделялось оптимизации содержания и методов преподавания в медицинских вузах: были изданы учебные программы по патофизиологии (1984, 1990), общей патологии для фармацевтических вузов (1987) и медико-технических отделений вузов (1984), опубликовано «Руководство к практическим занятиям по патологической физиологии» (1985) [1, 2].

**С 1991 года по настоящее время работой коллектива кафедры патофизиологии руководит член-корреспондент РАН профессор П.Ф. Литвицкий**

С 1991 года кафедрой заведует ученик профессоров С.М. Павленко и А.Х. Когана профессор Петр Францевич Литвицкий [4]. Он был первым в истории кафедры заведующим, избранным по конкурсу на аль-

тернативной основе — в конкурсе принимали участие также профессора Н.К. Хитров и В.А. Войнов.

Профессор П.Ф. Литвицкий — автор приоритетных исследований, посвященных изучению патофизиологии реперфузионного кардиального синдрома. Он сформулировал представление о коронарной недостаточности как совокупности двух синдромов: ишемического и реперфузионного, а не только ишемического, как считалось ранее. П.Ф. Литвицким обоснована концепция о роли и механизмах повреждения и адаптации сердца при ишемии и последующей реперфузии, разработаны принципы и методы лечения и профилактики транзиторной коронарной недостаточности. Петром Францевичем был описан ряд феноменов и раскрыты механизмы потенцирования канцерогенеза при почечной артериальной гипертензии и торможения ее развития в условиях роста злокачественной опухоли. Были выявлены закономерности и обоснована ключевая роль активных форм кислорода в атерогенезе, совместно с профессором А.Х. Коганом и ассистентом Н.В. Светловой предложены методы его фармакологической коррекции. Областью научных интересов П.Ф. Литвицкого и сотрудников его кафедры в настоящее время являются патофизиология системы кровообращения, иммунопатологические процессы, закономерности опухолевого роста. Большое внимание коллективом уделяется психолого-педагогическим аспектам преподавания патофизиологии и патологии [1, 4].

Под руководством профессора П.Ф. Литвицкого с 1991 года одним из главных направлений деятельности коллектива кафедры стала также интеграция научных знаний, методики и содержания обучения студентов и синтез патофизиологического и клинического подходов к персонализированной оценке состояния больного человека [1, 3]. В 1991—1992 учебном году на кафедре начата реализация программы оптимизации преподавания патофизиологии как клинко-ориентированной учебной дисциплины в медицинских вузах. В рамках этой программы разработана система целей, определена структура организации учебного процесса, сформирован систематизированный банк контрольно-обучающих ситуационных клинических, клинко-лабораторных и модельных задач по всем темам курса патофизиологии. Было выделено 3 ключевых направления работы кафедр патофизиологии медицинских вузов по оптимизации преподавания:

- «коррекция целей обучения» (в качестве главной, конечной цели подготовки студентов на кафедре стало формирование патофизиологической основы клинического мышления будущего врача);

- «модификация системы (технологии) обучения будущего врача» (направленность его на отработку уме-

ния проводить патофизиологический анализ различных типовых форм патологии и болезней человека, что можно достичь на основе решения студентами профессиональных клинических ситуационных задач);

- «совершенствование системы контроля умений и знаний студентов» (направленность на оптимизацию методов выявления уровня усвоения и коррекцию знаний и умений») [4].

В 1994 году, по поручению Минздрава России сотрудниками кафедры была разработана «Программа по клинической патофизиологии для студентов высших медицинских учебных заведений» с целью укрепления связи патофизиологии с клиническими дисциплинами.

С 1995 года на кафедре патофизиологии внедрена и совершенствуется система многоуровневого преподавания патофизиологии: на базисном уровне для студентов 2 и 3 курса обучения — типовые патологические процессы и типовые формы патологии органов и систем; для старших и выпускных курсов на цикле «Клиническая патофизиология» — синдромы недостаточности органов и их систем; для клинических ординаторов и аспирантов, а также для врачей на цикле «Клиническая патофизиология» — наиболее клинически значимые патологические синдромы и нозологии [1, 4]. Эта система была принята и внедрена на большинстве кафедр патофизиологии российских вузов, а также кафедр ряда зарубежных университетов.

Таким образом, главной целью учебного курса патофизиологии стало формирование на научной основе клинического мышления будущего врача: умения проводить интеллектуальное моделирование при решении реальных врачебных задач по построению схем диагностического поиска, формулирования и обоснования принципов и реализации методов эффективного лечения и профилактики болезней человека. Благодаря работе коллектива кафедры патофизиологии, сама дисциплина приобрела в Сеченовском Университете статус интегративной клинко-ориентированной дисциплины, ставшей одной из основ как теоретической, так и клинической подготовки будущих врачей и играющей ведущую роль в формировании у студентов клинического мышления [4].

Патофизиология на современном этапе развития научной медицины не может ограничиваться лишь экспериментами на животных, культуре тканей и клеток. Патофизиология стала клинко-ориентированной научной специальностью. В соответствии с этим, коллектив кафедры разрабатывает научную проблему «Механизмы развития, принципы профилактики и патогенетической терапии социально значимых болезней человека». В рамках этой проблемы исследуются во-

просы этиологии, патогенеза, принципов диагностики, лечения и профилактики таких социально значимых болезней и форм патологии человека как ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность, атеросклероз, иммунопатологические состояния, ишемический инсульт, патология почек и системы гемостаза (тромбоцитопатии и тромбоцитопении), наркомания, алкоголизм и другие формы зависимости.

Под руководством профессора П.Ф. Литвицкого доцентом кафедры, к.м.н. Л.Д. Мальцевой проводится работа по изучению истории кафедры патофизиологии Сеченовского Университета и формированию знаний о механизмах развития различных заболеваний на примере трудов древних врачей-исследователей Александрийской медицинской школы.

Профессором кафедры д.м.н. О.Л. Морозовой ведутся исследования по поиску молекулярных предикторов обратимого и необратимого повреждения почек у детей. Показана высокая диагностическая значимость своевременного выявления признаков воспаления мочевыводящих путей по динамике уровня и соотношения различных цитокинов в крови и моче пациентов. Даже при отсутствии стандартных клинико-лабораторных признаков воспаления в почках и мочевыводящей системе удается выявить характерные изменения маркеров воспаления – про- и противовоспалительных цитокинов. Изменения концентрации MCP-1, TGF- $\beta$ 1 и VEGF в моче позволяют диагностировать начальные этапы фиброза почек. Разработка новых высокоэффективных, малоинвазивных и доступных методов ранней диагностики, прогнозирования, лечения и профилактики хронических заболеваний почек позволят существенно замедлить прогрессирование нефропатии, снизить риск развития осложнений и уменьшить затраты на лечение.

В рамках научного направления доцента Т.Н. Жевак «Закономерности развития системных метаболических и функциональных расстройств при хроническом лимфолейкозе и патогенетическое обоснование новых диагностических критериев стадийности развития заболевания» изучается роль оксидативного стресса, отдельных цитокинов (IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF- $\alpha$ ), маркеров эндотелиальной дисфункции (молекул межклеточной адгезии селектина E, sICAM-1 и sPECAM-1), метаболита оксида азота (нитрита азота), протеина C, эндотелина-1, ангиотензина II, а также ростстимулирующих и ростиингирующих факторов (VEGF, PDGF, p53, p73, pRb) в сыворотке крови у больных с B-клеточным хроническим лимфолейкозом. Результаты исследований позволили сделать заключение о возможности достижения ремиссии при указанной форме гемобластоза.

Исследования доцента кафедры И.А. Будника «Механизмы нарушения гемостатического потенциала крови при геморрагических состояниях» позволили сформулировать и апробировать эффективные методы патогенетической терапии кровотечений на основе тонких молекулярно-клеточных механизмов нарушения гемостатического потенциала крови при геморрагических состояниях. Результаты исследования существенно расширили современные представления о механизмах нарушения формирования кровяного сгустка при геморрагических состояниях, связанных с патологией тромбоцитарного, коагуляционного и фибринолитического звеньев системы гемостаза, позволили экспериментально обосновать новые методы патогенетической терапии при указанных состояниях.

В настоящее время основными стратегическими задачами кафедры патофизиологии являются: 1 – модернизация методического обеспечения образовательного процесса (что легло в основу подготовленного сотрудниками кафедры Сеченовского Университета 6-го издания учебно-методического комплекса «Клиническая патофизиология», в том числе – курса лекций, тестов и ситуационных задач на английском языке) и 2 – проведение сотрудниками кафедры научных исследований по актуальным направлениям современной медицины.

Сотрудники кафедры патофизиологии стали руководителями коллективов других кафедр: профессор Н.К. Хитров – кафедры общей патологии ММА им. И.М. Сеченова; профессор В.А. Фролов – кафедры общей патологии и патофизиологии РУДН им. П. Лумумбы. В настоящее время руководят кафедрами патофизиологии питомцы нашего коллектива: академик РАН профессор С.В. Грачев, профессор С.Б. Болевич (Сеченовский Университет), доктор медицинских наук Х.М. Батаев – Университет г. Грозного.

## Заключение

Патофизиология – одна из старейших учебных дисциплин и научных специальностей в Сеченовском Университете – приемнике медицинского факультета Императорского московского университета. Российские патофизиологи уже с момента формирования этой дисциплины, учитывая также и опыт своих зарубежных коллег, определили ее цели и задачи. Конец XIX начало XX века стали периодом расцвета патофизиологии благодаря усилиям профессоров А.М. Филомафитского, А.И. Полунина, А.Б. Фохта и др. Основным методом патофизиологии стало экспериментальное моделирование. Этот метод появился и интенсивно развивался на разных кафедрах медицинского факультета Императорского Московского университета про-

фессором А.М. Филомафитским, а затем профессором А.Б. Фохтом. Идеи, рожденные отцами-основателями патофизиологии, реализовались их учениками и преемниками. Эти идеи и в настоящее время развиваются и модернизируются в Сеченовском Университете при разработке современных актуальных фундаментальных и прикладных проблем патологии и клинической медицины.

### Литература

1. Литвицкий П.Ф., Шилинис Ю.А., Батаев Х.М. *Кафедра патофизиологии Императорского Московского университета I МГУ — I ММИ — ММА им. И.М. Сеченова (История становления и развития)*. М.; Издательский дом «Русский врач»; 2004.
2. Литвицкий П.Ф. Становление и развитие патофизиологии в Императорском Московском университете, в I ММИ — ММА им. И.М. Сеченова (к 150-летию кафедры патофизиологии Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1999; 1 29-32.
3. *Центральный исторический архив Москвы (ЦИАМ)*. Фонд 418. Опись 18. 1849 год. Единица хранения 24.

4. Редакционная. Пётр Францевич Литвицкий. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2017;72(5):403-4.

### References

1. Litvitsky P.F., Shilinis Yu.A., Bataev Kh.M. Department of Pathophysiology of the Imperial Moscow University I of Moscow State University - I MMI - IM Sechenov Moscow Medical Academy (History of formation and development). [*Kafedra patofiziologii Imperatorskogo Moskovskogo universiteta I MGU — I MMI — MMA imeni I.M. Sechenova (Istoriya stanovleniya i razvitiya)*]. Moscow; The Russian Physician Publishing House; 2004. (in Russian)
2. Litvitsky P.F. Formation and development of pathophysiology in the Imperial Moscow University, in the IMI - MMA. THEM. Sechenov (to the 150th anniversary of the Department of Pathophysiology of the Moscow Sechenov Medical Academy). *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 1999; (1): 29-32. (in Russian)
3. *Central historical archive of Moscow (CHAM)*. Fund 418. Register 18. 1849. Storage unit 24. [*Tsentrал'nyy istoricheskiy arkhiv Moskvy (TsIAM)*]. Fond 418. Opis' 18. 1849 god. Edinitsa khraneniya 24. (in Russian)
4. Editorial. Pyotr Frantsevich Litvitsky. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2017; 72(5): 403-4. (in Russian)

### Сведения об авторах:

**Мальцева Лариса Дмитриевна**, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: lamapost@mail.ru;

**Горбачёв Никита Алексеевич**, студент 5-го курса лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: nikit.gorbacheff@yandex.ru;

**Морозова Ольга Леонидовна**, доктор мед. наук, доцент, проф. каф. патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: morozova\_ol@list.ru