

**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.

**2-летний ИФ РИНЦ 2017 0,52**

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 17.05.2019  
Подписано в печать 27.05.2019

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и exper. тер.  
2019. Том 63. № 2. 1—158

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, № 2, 2019

апрель–июнь

## 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. № 2. 1-158



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, № 2, 2019**  
april–june

**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

**Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Карганов М.Ю.** Три варианта переноса жирных кислот в форме триглицеридов у плотоядных, травоядных до синтеза инсулина и при действии гормона инсулина . . . 4

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Фролова Г.А.** Оценка корректирующего влияния сульпирида на поведенческие нарушения алкоголизированных самцов белых крыс с разным уровнем депрессивности . . . . . 19
- Карпова М.Н., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Кукушкин М.Л.** Влияние ипидакрина на острую боль и развитие невропатического болевого синдрома у крыс линии Вистар . . . . . 29
- Будникова О.В., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С., Ворожцова И.Н., Ахмедов Ш.Д., Шипулин В.М.** Взаимосвязь уровня гликированного гемоглобина с ритмоинотропной реакцией миокарда больных с ишемической болезнью сердца, ассоциированной с сахарным диабетом 2 типа . . . . . 34
- Гильяно Н.Я., Носкин Л.А., Журишкина Е.В., Степанов С.И., Ибатуллин Ф.М., Торшин В.И., Якунина Е.Б., Алчинова И.Б.** Комбинация низких доз глюкозамина и 2-DG усиливает цитотоксический эффект в опухолевых клетках человека в культуре . . . . . 41
- Васина Е.Ю., Чёфу С.Г., Петрищев Н.Н.** Влияние Нотромбела на развитие FeCl<sub>3</sub>-индуцированного тромбоза сонной артерии крыс . . . . . 50
- Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М.** Сравнительный анализ гемопоэтической активности суммарной РНК костного мозга и лимфоидных клеток селезенки при хронической бензолной анемии у крыс . . . . . 56
- Порядин Г.В., Власов А.П., Власова Т.И., Болотских В.А., Мышкина Н.А., Шейранов Н.С., Васильев В.В.** Роль модификаций липидов тканей печени в патогенезе хирургического эндотоксикоза . . . . . 65
- Осиков М.В., Симонян Е.В., Башарова О.Т.** Влияние трансдермальной пленки с эритропоэтином на гибель лимфоцитов и процессы свободнорадикального окисления в крови при экспериментальной термической травме у крыс . . . . . 72
- Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Миронов А.В., Кривкина Е.О., Барбараш О.Л.** Сравнение токсического действия сферических и игольчатых кальций-фосфатных бионов на поврежденную интиму брюшной аорты крыс . . . . . 80
- Филимонова М.В., Южаков В.В., Филимонов А.С., Макачук В.М., Бандурко Л.Н., Корнеева Т.С., Самсонова А.С., Цыганова М.Г., Шевченко Л.И., Севанькаева Л.Е., Фомина Н.К., Ингель И.Э., Яковлева Н.Д.** Сравнительное исследование влияния ингибитора NOS T1023 и бевацизумаба на рост и морфологию карциномы легких Льюис . . . . . 90
- Оразов М. Р., Радзинский В.Е., Локишин В.Н., Хамошина М.Б., Гаспаров А.С., Дубинская Е.Д., Костин И.Н., Демьяшкін Г.А., Токтар Л.Р., Лебедева М.Г., Токаева Э.С., Читанова Ю.С., Минаева А.В.** Роль рецепторов к окситоцину и вазопрессину в патогенезе тазовой боли, обусловленной аденомиозом . . . . . 99
- Перетяtko О.В., Пуликов А.С.** Реакция децидуальных клеток плаценты при коррекции хламидиоза у женщин во время беременности . . . . . 108
- Демьяшкін Г.А., Цибулевский А.Ю., Балька М.А., Иванов А.Н., Маммаев Р.У.** К вопросу о механизме патогенеза пелиоза печени . . . . . 116

### ОБЗОРЫ

**Пальцын А.А.** Старость без болезней . . . . . 123

### МЕТОДИКА

- Хасанов Р.Р., Гумеров А. А., Шефер К.Х., Вессель Л.М., Гумеров Р.А.** Способ выращивания культуры клеток нервной системы кишечника, пригодной для тканевой инженерии кишечника . . . . . 132
- Гельцер Б.И., Слабенко Э.В., Заяц Ю.В., Котельников В.Н.** Методы моделирования острой ишемии головного мозга: патофизиологическое обоснование выбора и значение для клинической практики . . . . . 142
- Плюхин Д. В., Асташина Н. Б., Соснин Д. Ю., Мудрова О. А.** Экспериментальная модель перимплантита . . . . . 153

## CONTENTS

**Titov V.N., Amelyushkina V.A., Karganov M.Yu.** Three options for fatty acid transfer in the form of triglycerides in carnivores and herbivores before insulin synthesis and under the action of insulin 4

### ORIGINAL ARTICLE

- Frolova G.A. Frolova G.A.** Assessing the corrective effects of sulphiride on behavioral disorders alcoholic males of white rats with different levels of depression 19
- Karpova M.N., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Kukushkin M.L.** Effect of ipidacrine on acute pain and development of neuropathic pain syndrome in Wistar rats 29
- Budnikova O.V., Afanasyev S.A., Kondratieva D.S., Vorozhtsova I.N., Akhmedov S.D., Shipulin V.M.** Relationship of glycated hemoglobin with the rhythm-inotropic myocardial response in patients with ischemic heart disease associated with type 2 diabetes mellitus 34
- Giliano N.Y., Noskin L.A., Zhurishkina E.V., Stepanov S.I., Ibatullin F.M.** The combination of low doses of glucosamine D and 2-DG enhances the cytotoxic effect in human tumor cells in culture 41
- Vasina E.Y., Chefu S.G., Petrishchev N.N.** The effect of Notrombel on the FeCl<sub>3</sub>-induced carotid artery thrombosis in rats 50
- Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M.** Comparative Analysis of Hematopoietic Activity of Total RNA Bone Marrow Cells and Spleenocytes in Chronic Benzene Anemia in Rats 56
- Poryadin G.V., Vlasov A.P., Vlasova T.I., Bolotских V.A., Myshkina N.A., Sheyranov N.S., Vasilyev V.V.** The role of liver lipid modifications in the pathogenesis of surgical endogenous intoxication 65
- Osikov M.V., Simonyan E.V., Basharova O.T.** Effect of transdermal film with erythropoietin on the death of lymphocytes and the processes of free radical oxidation in the blood in experimental thermal injury in rats 72
- Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Mironov A.V., Krivkina E.O., Barbarash O.L.** Toxicity of spherical and needle-shaped calcium phosphate bions for injured intima of abdominal aorta 80
- Filimonova M.V., Yuzhakov V.V., Filimonov A.S., Makarchuk V.M., Bandurko L.N., Korneeva T.S., Samsonova A.S., Tsyganova M.G., Shevchenko L.I., Sevankaeva L.E., Fomina N.K., Ingel I.E., Yakovleva N.D.** Comparative study of the effects of inhibitor NOS T1023 and bevacizumabum on growth and morphology of Lewis lung carcinoma 90
- Orazov M.R., Radzinskiy V.Y., Lokshin V.N., Khamoshina M.B., Gasparov A.S., Dubinskaya E.D., Kostin I.N., Demyashkin G.A., Toktar L.R., Lebedeva M.G., Tokaeva E.S., Chitanava Y.S., Minaeva A.V.** Oxytocin and vasopressin in the pathogenesis of chronic pelvic pain induced by adenomyosis 99
- Peretyat'ko O.V., Pulikov A.S.** The response of placental decidual cells to treatment of chlamydiosis in pregnant women 108
- Demyashkin G.A., Tsubulevskiy A.Yu., Balyka M.A., Ivanov A.N., Mamaev R.U.** About the pathogenesis of peliosis hepatis 116
- 
- ### REVIEWS
- Paltsyn A.A.** Ageing without diseases 123
- 
- ### METHODS
- Khasanov R. R., Gumerov A. A., Schaefer, K.H., Wessel L.M.** A method for culturing of enteric nervous system cells suitable for tissue engineering of the intestine 132
- Geltser B.I., Slabenko E.V., Zayats Yu.V., Kotelnikov V.N.** Methods for simulation of acute brain ischemia: pathophysiological substantiation of selection and importance for clinical 142
- Pliukhin D.V., Astashina N.B., Sosnin D.Yu., Mudrova O.A.** Experimental model of perimplantite 153

Титов В.Н.<sup>1</sup>, Амелюшкина В.А.<sup>1</sup>, Карганов М.Ю.<sup>2</sup>

## Три варианта переноса жирных кислот в форме триглицеридов у плотоядных и у травоядных до синтеза инсулина и при действии гормона инсулина

<sup>1</sup>ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, 121552, г. Москва, Россия, ул. 3-я Черепковская, д.15-а;

<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Является ли человек всеядным? Биологически это невозможно; Homo sapiens - травояден. В филогенезе же предки человека при жизни в океане, были плотоядными, рыбающими. Предполагается, что в филогенезе последовательно с интервалами в миллионы лет сформировались 3 системы переноса к клеткам жирных кислот в форме неполярных триглицеридов в составе апоВ липопротеинов. 1. У плотоядных (Carnivore) в океане и на суше: энтероциты, апоЕ/В-48 хиломикроны → гепатоциты → апоВ-100 ЛПОНП → ЛПНП → апоВ-100 эндоцитоз. 2. У травоядных (Herbivore), до синтеза инсулина перенос химически инертной пальмитиновой насыщенных жирных кислот осуществлялся по пути: гепатоциты → пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП → апоВ-100 поглощение клетками. 3. У травоядных (Herbivore) при действии инсулина перенос химически активной олеиновой мононенасыщенной жирной кислоты представлял наиболее короткий путь: гепатоциты → олеиновые ЛПОНП → апоЕ/В-100 эндоцитоз инсулинзависимыми клетками. На ступенях филогенеза; 1. у плотоядных, 2. у травоядных до синтеза инсулина и 3. у травоядных при действии инсулина:

1. хиломикроны → пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП → апоВ-100 эндоцитоз;
2. пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП → апоВ-100 эндоцитоз и
3. олеиновые ЛПОНП → апоЕ/В-100 эндоцитоз,

видно, почему олеиновые ЛПОНП не могут переносить пальмитиновые ЛПОНП с иными физико-химическими свойствами. В инсулинзависимой системе переноса олеиновой мононенасыщенной жирной кислоты, триглицериды задействованы только ЛПОНП и нет ЛПНП. При избытке плотоядной (мясной) пищи и пальмитиновой насыщенной жирной кислоты НЖК клетки не поглощают безлигандные пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП путем апоЕ/В-100 эндоцитоза. Формирование у пациента переноса насыщенных жирных кислот до действия инсулина объективизируется по уровню гиперлиппротеинемии (ГЛП) типа IIb. При избыточном потреблении мясной пищи и формировании переноса насыщенных жирных кислот, что характерно для плотоядных, у пациентов методом электрофореза выявляется гиперлиппротеинемия типа V. Атеросклероз и атероматоз, хотя и имеют общие звенья патогенеза, являются биологически разными, последовательными процессами, отражающими нарушение биологической функции трофологии и функции эндоэкологии.

**Ключевые слова:** жирные кислоты, липопротеины, атеросклероз, атероматоз, плотоядные, травоядные, филогенез.

**Для цитирования:** Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Карганов М.Ю. Три варианта переноса жирных кислот в форме триглицеридов у плотоядных и травоядных до синтеза инсулина и при действии гормона инсулина. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(2):4-18.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.4-18

**Для корреспонденции:** Титов Владимир Николаевич, доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. клинической биохимии липопротеинов Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, e-mail: vn\_titov@mail.ru

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

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

**Поступила** 09.02.2018

Titov V.N.<sup>1</sup>, Amelyushkina V.A.<sup>1</sup>, Karganov M.Yu.<sup>2</sup>

## THREE OPTIONS FOR FATTY ACID TRANSFER IN THE FORM OF TRIGLYCERIDES IN CARNIVORES AND HERBIVORES BEFORE INSULIN SYNTHESIS AND UNDER THE ACTION OF INSULIN

<sup>1</sup>Russian Cardiology Research-and-Production Center, 3<sup>rd</sup> Cherepkovskaya Str. 15A, Moscow 121552, Russia

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

Is the human being an omnivore? Biologically, this is impossible. Homo sapiens is the herbivore. However phylogenetically, ocean-living ancestors of people were fish-eating carnivores. We suggest that three systems of fatty acid (FA) transport to cells have

formed successively, at several million-year intervals, in the form of nonpolar triglycerides (TG) as constituents of apoB lipoproteins (LP): i) in the carnivores, both in the ocean and on land: enterocytes → apoB-100 VLDL → LDL → apoB-100 endocytosis; ii) in herbivores prior to insulin production: transport of chemically inert palmitic FA along the hepatocytes → palmitic VLDL → LDL → apoB-100 cellular uptake pathway; iii) in herbivores under the action of insulin, the transport pathway for chemically active oleic FA is the shortest: hepatocytes → oleic VLDL → apoE/B-100 endocytosis by insulin-dependent cells. Thus, oleic VLDL cannot transport palmitic TG that have different physico-chemical parameters. In the insulin-dependent transport of oleic FA, TG are associated only with VLDL but not with LDL. When the diet is rich in meat and palmitic saturated FA cells do not internalize nonligand palmitic VLDL → LDL via apoE/B-100 endocytosis; physiologically, this endocytosis does not exist. In type IIb hyperlipoproteinemia, saturated FA are transported before the effect of insulin. If a patient eats excessive meat, transport of saturated FA follows the pathway typical of carnivore animals, which results in type V hyperproteinemia as detected by LP electrophoresis. Although atherosclerosis and atheromatosis share some pathogenetic features they are biologically different processes associated with impaired biological functions of trophology and endoecology.

**Key words:** fatty acids, lipoproteins, atherosclerosis, atheromatosis, carnivores, herbivores.

**For citation:** Titov V.N., Amelyushkina V.A., Karganov M.Yu. THREE OPTIONS FOR FATTY ACID TRANSFER IN THE FORM OF TRIGLYCERIDES IN CARNIVORES AND HERBIVORES BEFORE INSULIN SYNTHESIS AND UNDER THE ACTION OF INSULIN. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 4-18. (in Russian)

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.4-18

**Information about authors:**

Titov V.N., <https://orcid.org/0000-0003-2426-4468>

Karganov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5862-8090>

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

**Funding.** The study had no sponsor ship.

**Received** 09.02.2018

Детальное рассмотрение структуры и функции липопротеинов (ЛП), проводимое нами более тридцати лет [1], позволило установить, что сходное физико-химическое строение имеют: а) ранние в филогенезе апоА-I ЛП высокой плотности (ЛПВП); б) на миллионы лет более поздние пальмитиновые апоВ-100 ЛП очень низкой (ЛПОНП); в) ЛП низкой плотности (ЛПНП) и, наконец, г) последние на ступенях филогенеза зависимые от инсулина, олеиновые апоЕ/В-100 ЛПОНП. Характерное для этих классов ЛП сходство представляет собой бислой белок: липид, в котором липидов несравненно больше, чем белка. Модели же ЛП, которые десятилетиями формируют биофизики при использовании ультразвука, при сонификации (озвучивании) смеси из неполярных (полярных) липидов и стационарных аполипопротеинов (апо) которые можно видеть в публикациях, реально оценивать не более как физико-химические, экспериментальные модели. Они имеют мало общего с строением ЛП, которые формируют клетки *in vivo* без генератора ультразвука.

Аполипопротеины - семейство специфичных белков; синтезируют апо энтероциты тонкого кишечника, гепатоциты, некоторые иные клетки. В водной, гидрофильной среде в ассоциации с гидрофобными липидами, апо принимают форму диска; одна сторона его становится гидрофобной и сформирована  $\alpha$ -спиральными структурами апо; вторая — гидрофиль-

ной; ее формируют  $\beta$ -складчатые цепи аминокислот. На гидрофобной стороне диска  $\alpha$ -цепи физико-химически связывают большое количество гидрофобных липидов, главным образом триглицеридов (ТГ); количество связанных ТГ во много раз превышает количество самого апо. На гидрофильной стороне апо в составе ЛП локализованы домены-лиганды; их специфично связывают одноименные рецепторы на плазматической мембране филогенетически функционально различающихся клеток.

*Единая структура ЛП — бислой белок:липид.* ЛП, липидпереносящие макромолекулы белка формируют векторный перенос экзогенных жирных кислот (ЖК) пищи и ЖК, которые эндогенно синтезируют гепатоцитами *in situ de novo*. Субстратом для синтеза гепатоцитами эндогенной, пальмитиновой, насыщенной ЖК (НЖК) и олеиновой, инсулинзависимой, мононенасыщенной ЖК (МЖК) с одной двойной связью (ДС) в цепи атомов углерода, является экзогенная глюкоза. Вместе С16:0 пальмитиновая НЖК + С18:1 олеиновая МЖК оставляют более 70% всех ЖК *in vivo*; физиологично *in vivo* всегда доминирует олеиновая МЖК.

Апобелки подразделяются на стационарные и динамичные; стационарные апо, связывая полярные (неполярные) липиды, формируют липидпереносящие молекулы (макромолекулы) белка- ЛП. Все клетки *in vivo* активно, рецепторно поглощают ЖК и ТГ и апо в составе тех ЛП, которые они образовали. Стационар-

ными апо, в порядке становления их функции на ступенях филогенеза, являются апоА-I, апоВ-48 и апоВ-100. Мол. масса апоВ-100 составляет 450 кДа: мол. масса апоВ-48 - 48% от массы апоВ-100. Динамичные апо – малые полипептиды; функциональную активность они проявляют в межклеточной среде и кровотоке, перемещаясь между разными классами ЛП. Это семейство апоА, апоС и апоЕ; большинство из них являются кофакторами гидролаз (липаз) и эстераз неполярных липидов, биохимические превращения которых происходят при переносе в крови и активном, рецепторном поглощении их клетками.

Фенотипы апоЕ выступают как динамичные апо при формировании: а) кооперативных (апоЕ/В-48, апоЕ/А-Iи апоЕ/В-100) лигандов и одноименных рецепторов на плазматической мембране. Происходит это при переносе в крови и поглощении клетками: а) ХМ при взаимодействии апоЕ/В-48 лиганд+рецептор; б) при поглощении ЛПВП клетками у плотоядных животных – апоЕ/А-I лиганд ↔ рецептор и в) апоЕ/В-100 при специфичном связывании лиганд+рецептор при поглощении клетками травоядных животных инсулинзависимых олеиновых ЛПОИП [2].

*Формирование гепатоцитами пальмитиновых, олеиновых, линолевыхТГ и ЛПОИП.* С учетом того, что каждый из ТГ, в зависимости от того, какие три ЖК этерифицированы с трехатомным спиртом глицерином в гидрофильной среде принимает стерическую (пространственную) форму, апоВ-100 структурирует в одном ЛПОИП преимущественно сходные по форме молекулы. В зависимости от того, какая ЖК этерифицирована во второй (sn-2), средней позиции трехатомного глицерина, ТГ подразделяются на пальмитиновые, олеиновые, линолевые и линоленовые. Панкреатическая липаза поджелудочной железы не гидролизует эфирную связь ЖК с вторичной спиртовой группой sn-2 глицерина в молекулах ТГ. В гепатоцитах, с такой же мерой специфичности, апоВ-100 избирательно структурирует (связывает) одноименные ТГ с образованием пальмитиновых, олеиновых, линолевых и линоленовых ЛПОИП. Они обладают разными физико-химическими свойствами; гидролиз олеиновых ТГ в ЛПОИП при действии постгепариновой липопротеинлипазы (ЛПЛ) происходит во много раз быстрее, чем гидролиз пальмитиновых ТГ в одноименных ЛПОИП.

Мол. масса раннего в филогенезе апоА-I(филогенез – единый анамнез всего живого) составляет 28 кДа; α-цепей мало и связывающая способность апо невелика; в апоА-I ЛПВП меньше липидов, чем во всех остальных ЛП. В апоА-IЛПВП ассоциированы динамичные апоА-II, апоА-III и апоА-IV и апоА-V. В ЛПВП

разные по мере гидрофобности полярные фосфолипиды (ФЛ) имеются на обеих сторонах диска; более гидрофобные ФЛ (фосфатидилхолины) располагаются на одной стороне, апоА-I; менее гидрофобные, отрицательно заряженные аминифосфолипиды – на другой. АпоА-I формирует ЛПВП только из полярных липидов, включая ди- и моноглицерины; неполярных ТГ в ЛПВП не бывает.

Четыре вида динамичных апо (апоА-II– апо-V) являются кофакторами функционально разных эстераз и гидролаз [3]; в ЛПВП они участвуют, в частности, в синтезе моноеновых эфиров холестерина (моно-ЭХС) –эндогенного холестерололеата; функционально - это неполярная форма ХС. Задействованы динамичные апоА и в синтезе в ЛПВП полиеновых эфиров холестерина (поли-ЭХС); функционально - это неполярная форма полиеновых ЖК (ПНЖК). Определено это тем, что в течение миллионов лет в филогенезе ЛПВП были в межклеточной среде единственными и исполняли все функции, свойственные ЛП. Миллионы лет в филогенезе ЛПВП переносили к клеткам НЖК и МЖК в форме полярных диглицеридов. Перенос ЖК в ЛПВП ограничен низкой способностью апоА-I связывать даже полярные липиды. Когда нарабатываемой митохондриями энергии в форме макроэргического аденозинтрифосфата (АТФ) стало недостаточно, клетки начали формировать иные классы ЛП, которые могли бы переносить к клеткам большее количество субстратов для наработки энергии. Сделать это возможно при переносе НЖК и МЖК в ЛП, но не в виде полярных диглицеридов, а в форме неполярных ТГ и иных по структуре апо.

Первым апо, который начал связывать неполярные, гидрофобные ТГ у плотоядных (рыбоядных) в океане стал апоВ-48 [4]. До функции *in vivo* позднего в филогенезе инсулина было еще далеко. Синтезировать апоВ-48 начали энтероциты тонкого кишечника; апо стал образовывать ранние в филогенезе хиломикроны (ХМ) [5]. В канальцах эндоплазматического ретикулума в формировании ХМ задействован микросомальный белок, переносящий ТГ (МБПТ) [6]. В канальцах ретикулума тонкого кишечника МБПТ связывает разные по форме пальмитиновые, олеиновые, линолевые ТГ в составе ХМ. Структура образуемых при этом ХМ получается рыхлая; в кровотоке ХМ являются самыми большими белок: липидными комплексами. В них апоВ-48 связывает много неполярных пальмитиновых, олеиновых и линолевых ТГ; в гидрофильной среде они имеют разную пространственную форму.

Гидратированная плотность ХМ является самой низкой; физико-химические параметры ХМ после приема пищи могут быть существенно разными. Состав

ЖК в ТГ, входящих в состав ХМ, в полной мере определен количеством ЖК и ТГ потребляемой пищи [7]. В лимфо- и кровотоке в ХМ при избытке мясной пищи всегда велико содержание экзогенных С16:0 пальмитиновой НЖК и мало  $\omega$ -9 С18:1 олеиновой МЖК, много  $\omega$ -6 С18:2 линолевой и малые количества,  $\omega$ -3 С18:3  $\alpha$ -линоленовой и  $\omega$ -6 С18:3-линоленовой ненасыщенных ЖК (ННЖК) в форме одноименных ТГ. После того как лимфа изливается в кровотоки, все ХМ из крови поглощаются только гепатоцитами путем апоЕ/В-48 эндоцитоза. АпоВ-48 - ранний в филогенезе апо, по сути, половина более поздно формируемого апоВ-100. В структуре апоВ-48 нет домена-лиганда; его в ХМ на кооперативных началах формирует апоЕ (фенотип Е3/Е3), апоЕ/В-48 лиганд. Одновременно гепатоциты, выставляя на плазматическую мембрану апоЕ/В-48 рецепторы, активно поглощают все разные ХМ.

После поглощения ХМ лизосомы гепатоцитов осуществляют полный протеолиз апоЕ, апоВ-48, а также гидролиз всех ТГ с образованием спирта глицерина и трех неэтерифицированных ЖК. Гепатоциты далее оптимизируют ЖК, окисляя в органеллах (в пероксисомах) афизиологичные ЖК пищи. Разновидностями ЖК, окисляемых пероксисомами, являются: 1) ЖК с нечетным числом атомов углерода; 2) ЖК с разветвленными цепями атомов углерода; 3) дикарбоновые ЖК; 4) ЖК с 5-6-членными кольцами в цепи; 5) очень длинноцепочечные ЖК С24 и более; 6) тио-ЖК с атомами серы (S) в цепи. Далее гепатоциты ресинтезируют оптимизированные ЖК с глицерином в состав пальмитиновых, олеиновых и линолевых ТГ. После этого апоВ-100 структурирует оптимизированные ТГ, секретировав пальмитиновые, олеиновые, линолевые и линоленовые ЛПОНП; происходит это пропорционально содержанию их в пище. Каждый ЛПОНП содержит около 3 тыс. молекул ТГ и около 9 тыс. этерифицированных ЖК. Все ЛПОНП гепатоциты секретируют в кровотоки.

Гидратированная плотность и размеры секретированных гепатоцитами в кровотоки ЛПОНП различны, что определяется: а) длиной ЖК, которые этерифицированы в ТГ и содержат ЛПОНП; б) температурой плавления ТГ, которые структурированы в ЛПОНП; в) конфигурацией и плотностью упаковки ЖК в пальмитиновых, олеиновых и линолевых ЛПОНП и г) количеством ХС в пище и в полярном монослое из ФХ + полярный ХС. В ЛПОНП монослой покрывает массу ТГ, которые в ЛПОНП структурировал апоВ-100.

ЛПОНП, сформированные из одинаковых ТГ, имеют, по сравнению с ХМ, меньшие размеры, большее количество белка (апоВ-100 вместо апоВ-48) и бо-

лее высокую гидратированную плотность. Самые малые размеры и наибольшую плотность имеют пальмитиновые ЛПНП. Это определяется тем, что в них ТГ содержат С16 ЖК и низкое число ДС. Чем меньше ДС ЖК содержится в триглицеридах, тем более плотна их упаковка. Определено это тем, что по каждой ДС цепь ЖК стабильно изогнута; чем больше изгибов, тем менее плотно упакованы ТГ в структуре ЛПОНП. На ступенях филогенеза наиболее ранней ЖК является пальмитиновая НЖК, одноименные ТГ и ЛПОНП. Позднее в филогенезе произошло формирование линолевых и линоленовых ЖК, ТГ, ЛПОНП и ЛПНП. На еще более поздних этапах в составе ЛПОНП стала доминировать олеиновая МЖК, одноименные ТГ и олеиновые ЛПОНП; присутствие олеиновых ЛПНП в крови нефизиологично.

Секретированные гепатоцитами ЛПОНП не имеют активного апоВ-100 лиганда; все они функционально перегружены ТГ и являются прелигандными. В олеиновых и пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП апоВ-100 лиганд окажется на поверхности ЛП после действия постгепариновой ЛПЛ в олеиновых и пальмитиновых ЛПОНП, а в линолевых и линоленовых ЛПОНП – при активности иной липазы – печеночной глицеролгидролазы (ГЛГ). При этом во всех ЛПОНП произойдет: а) гидролиз части ТГ; б) все ЛПОНП→ЛПНП увеличат гидратированную плотность и в) при оптимальной конформации апоВ-100 примут единственно активную конформацию, выставляя на плазматическую мембрану ЛПНП активный апоВ-100 рецептор.

Клетки поглощают все ЛПНП путем апоВ-100 эндоцитоза. В крови, при переносе к клеткам НЖК, МЖК, ННЖК и даже ПНЖК, количество сформированных ЛПНП равно числу секретированных гепатоцитами ЛПОНП [8].

В энтероцитах после всасывания ими ПНЖК и этерификации с глицерином в ФЛ (ФХ и аминоксфолипиды), апоА-I структурирует их в ЛПВП. Клетки из состава ЛПВП могут поглощать ПНЖК в форме ФЛ; происходит это пассивно, путем перэтерификации между ФЛ наружного монослоя клеточной мембраны и ФЛ в ЛПВП. Позже на ступенях филогенеза сформировалось и активное поглощение клетками ПНЖК. Проходило это не в форме полярных эфиров с глицерином, а в неполярных липидах, в полиеновых эфирах холестерина (поли-ЭХС). Для этого в кровотоке в ЛПВП, при действии аминоксфолипидхолестерин ацилтрансферазы происходит перэтерификация ПНЖК из ФЛ, из полярных эфиров с глицерином в неполярные полиеновые эфиры со спиртом ХС (поли-ЭХС).

Далее, белок, переносящий ПНЖК в форме неполярных поли-ЭХС (БППЭХ), формирует в крови

тройственные ассоциаты ЛПВП+БППЭХ+линолевые ЛПОНП. При этом ПНЖК в форме поли-ЭХС по градиенту гидрофобности переходят из ЛПВП физиологично в линолевые ЛПНП; затем все клетки активно поглощают линолевые ЛПНП путем апоВ-100 эндоцитоза. Так у травоядных (Herbivore) сформировалось активное поглощение клетками ПНЖК по пути: энтероциты → ЛПВП → переэтерификация ПНЖК из ФЛ в поли-ЭХС → действие БППЭХ и переход поли-ЭХС из ЛПВП в ЛПНП → апоВ-100 эндоцитоз линолевых ЛПНП. Одновременно плотоядные (Carnivore) сформировали более короткий вариант поглощения клетками ПНЖК; в нем не задействованы: а) БППЭХ; б) нет линолевых ЛПНП и в) апоВ-100 эндоцитоза. Перенос ПНЖК происходит по пути: энтероциты, ЛПВП → переэтерификация ПНЖК из ФЛ в поли-ЭХС → ассоциация апоЕ с ЛПВП и апоЕ/А-1 эндоцитоз ЛПВП. В силу различия переноса и поглощения клетками ПНЖК у плотоядных крыс, в отличие от травоядных кроликов, не удается воспроизвести атеросклероз и атероматоз на модели экзогенной гиперхолестеринемии. Для того чтобы воспроизвести атеросклероз и атероматоз необходимо «выбить» у крыс ген апоЕ и этим блокировать поглощение клетками ПНЖК [9].

*Биологическая роль и диагностическое значение апоС-III.* Остаются реальными и высказанные нами ранее представления, что постгепариновая ЛПЛ и кофактор апоС-II активируют гидролиз только поздних в филогенезе олеиновых, пальмитиновых ТГ в составе одноименных ЛПОНП [10]. В то время как гидролиз более ранних в филогенезе линолевых и линоленовых ТГ в ЛПОНП активирует иной фермент – печеночную ГЛГ и кофактор апоС-III. Гидролаза и апоС-III сформировались на ступенях филогенеза раньше постгепариновой ЛПЛ (липопротеинлипаза) и апоС-II. Когда действие этой ЛПЛ и апоС-II блокировано *in vivo* по причине неоптимального субстрата (пальмитиновых ТГ), формируется ретенционная ГЛП (гиперлипопротеинемия), происходит активация биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации. Экспрессия синтеза печеночной ГЛГ и ее кофактора апоС-III, мы полагаем, компенсаторно возрастает с целью нормализовать гидролиз олеиновых, пальмитиновых ТГ в одноименных ЛПОНП и восстановить нарушенный перенос и поглощение клетками ЛПОНП, ТГ и ЖК.

В то же время многие авторы рассматривают апоС-III чуть ли не как функциональный ингибитор липолиза ТГ в ЛПОНП [11]; полагают, что апоС-III является функциональным блокатором поглощения клетками ЖК в форме ТГ в составе ЛПОНП. Представления о функции физиологичных ингибиторов на путях переноса и поглощения клетками ЖК, мы не

считаем реальными; подобные представления равносильны мнению о функциональной атрезии пищевода. Наиболее малыми, плотными, химически инертными, самым неоптимальным субстратом для гидролиза ТГ при действии постгепариновой ЛПЛ и апоС-II являются пальмитиновые ЛПНП [12].

*Гидролиз позиционных форм ТГ, превращение ЛПОНП→ЛПНП и ХС-ЛПНП.* С наиболее высокой скоростью реакции постгепариновая ЛПЛ гидролизует позиционные формы ТГ как олеил-олеил-олеат глицерол (ООО); менее эффективно осуществим липолиз таких ТГ как пальмитоил-олеил-олеат (ПОО) и с низкой скоростью реакции гидролизу подвержены такие позиционные изоформы ТГ как пальмитоил-олеил-пальмитат глицерол (ПОП). Позиционные формы ТГ такие, как пальмитоил-пальмитоил-пальмитат (ППП), постгепариновая ЛПЛ не гидролизует вообще. Чем больше *in vivo* формируется ТГ (как ПОП), тем медленнее происходит липолиз в пальмитиновых и в олеиновых ЛПОНП, тем дольше они циркулируют в крови, медленнее поглощаются клетками путем апоЕ/В-100 эндоцитоза, более выражена и продолжительна ГЛП после приема пищи. Из пальмитиновых ЛПОНП и олеиновых ЛПОНП, содержащих много ТГ таких, как ПОП, в крови чаще формируются безлигандные ЛПОНП→ЛПНП, которые не могут поглощаться клетками. В крови они-то и являются основой формирования оседлыми макрофагами (в большей мере моноцитами гематогенного происхождения) атероматозной массы в интима артерий. Какие же экзогенные и эндогенные факторы регулируют гидролиз ТГ?

Если расставить все пальмитиновые и олеиновые формы ТГ в порядке возрастания скорости гидролиза как субстратов при действии стандартизованной постгепариновой ЛПЛ, образуется последовательность:

ППП - ППО - ОПП - ОПО - ПОП - ПОО - ООП - ООО.

Если потребляемую пациентом пищу охарактеризовать как «сдвиг вправо», профилактика атеросклероза и атероматоза будет успешной. И чем больше реализация биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии будет соответствовать сдвигу влево, тем выше риск становления атеросклероза и атероматоза, короче время до возникновения симптомов ишемической болезни сердца (ИБС), поражения атероматозом коронарных артерий и инцидентов инфаркта миокарда [13].

Экзогенными факторами ГЛП наиболее часто является пища, богатая пальмитиновой ЖК; наиболее афизиологичной пищей является говядина, в которой содержание пальмитиновой ЖК достигает 60%. Хотя в sn-2 ТГ говядины чаще этерифицирована паль-

митиновая НЖК, в меньшей мере — олеиновая МЖК, в sn-1 и sn-3 наиболее часто этерифицирована пальмитиновая ЖК. То же можно видеть и в коровьем молоке, сливках, сметане и в сырах, в которых, в отличие от говядины, в sn-2 ТГ этерифицирована пальмитиновая ЖК. Однако уже в энтероцитах и окончательно в гепатоцитах при реакции изомеризации пальмитиновую ЖК в sn-2 замещает олеиновая МЖК, а пальмитиновая НЖК перемещается в sn-3, формируя позиционные формы ТГ как ПОП- явно не физиологичный субстрат для липолиза [14].

Вторым фактором формирования ТГ как ПОП является избыток в пище углеводов, которые гепатоциты в целях депонирования в адипоцитах превращают в пальмитиновую ЖК; формально пальмитиновую ЖК мы рассматриваем как «гидрофобную форму» глюкозы, оптимальную для депонирования в жировых клетках. С аутокринного уровня *in vivo* клетки используют глюкозу для синтеза пальмитиновой ЖК в цикле Кноппа-Линена без образования более коротких НЖК. Физиологично *in vivo* клетки не синтезируют ТГ как ППП; температура плавления их столь высока (более 70°С), что при 36,6° *in vivo* в биохимические реакции они не вступают [15].

*Инсулин, метаболизм ЖК, обеспечение клеток энергией, кинетические параметры функции локомоции.* С позиций филогенетической теории общей патологии, биологическая роль позднего в филогенезе инсулина *in vivo*, состоит в регуляции метаболизма *in vivo* ЖК и только опосредованно — метаболизма глюкозы. Инсулин изменяет параметры метаболизма двух ЖК — пальмитиновой НЖК и олеиновой МЖК; содержание их *in vivo* наиболее высоко. Две ЖК — пальмитиновая НЖК и олеиновой МЖК являются основными субстратами для выработки энергии (синтеза АТФ), для реализации биологической функции локомоции, движения за счет сокращения поперечнополосатой скелетной мускулатуры.

Пальмитиновую НЖК характеризует следующее.

1. В пальмитиновой С16:0 НЖК нет ДС; она в малой мере вступает в физико-химические и биохимические реакции и формирует плотную упаковку [16].

2. Митохондрии с трудом переносят пальмитиновую НЖК через внутреннюю мембрану органелл и медленно окисляют ее в матриксе, нарабатывая малые, порой не оптимальные для конкретной ситуации, количества АТФ с низкой производительностью [17, 18].

3. Пальмитиновые ТГ медленно гидролизуются постепариновой ЛПЛ + апоС-II в крови в составе одноименных ЛПОНП В крови при этом образуются безлигандные, пальмитиновые ЛПОНП→ЛПНП (большие эндогенные флогогены), формируется ГЛП, которая

нарушает биологическую функцию эндоэкологии — «замусоривая» межклеточную среду афизиологичными ЛП.

4. Безлигандные пальмитиновые ЛПНП конкурентно блокируют поглощение клетками ПНЖК в физиологичных линолевых ЛПНП, в форме поли-ЭХС (ПНЖК этерифицированных спиртом ХС) путем апоВ-100 эндоцитоза; это формирует дефицит ПНЖК *in vivo* во всех клетках. Почти 30 лет мы рассматриваем атеросклероз как дефицит в клетках ПНЖК и компенсаторный синтез афизиологичных эйкозаноидов первой группы [19]. Происходит это при реализации функции трофологии, реакции экзотрофии, что одновременно формирует и нарушение функции эндоэкологии — «чистоты» межклеточной среды *in vivo*.

5. Депонированные в инсулиннезависимых висцеральных жировых клетках (ВЖК) сальника и в инсулинзависимых подкожных адипоцитах (ИПА) пальмитиновые ТГ с низкой константой скорости реакции гидролизуются и освобождаются в кровоток гормонзависимой липазой. Это не в полной мере удовлетворяет потребности клеток в субстратах энергии в период реализации биологической реакции эндотрофии, вне приема пищи [20].

6. Миллионы лет *in vivo* (до синтеза инсулина) доминировал оптимальный, но потенциально малоэффективный, пальмитиновый вариант метаболизма ЖК и выработки клетками энергии. При этом митохондрии окисляют в матриксе, главным образом, С16:0 пальмитиновую НЖК; поглощают они ее целиком при действии транспортера — карнитинпальмитоил-ацил-трансферазы при переносе через внутреннюю мембрану митохондрий и гидролизуют НЖК в матриксе. Далее митохондрии метаболизируют в цикле Кребса ацетил-КоА, образованный из НЖК и МЖК, но не из ННЖК, тем более ПНЖК.

Миллионы лет, пока клетки не начали реализовать биологическую функцию локомоции, образованного митохондриями количества АТФ при окислении пальмитиновой НЖК, было, как мы полагаем, достаточно. Становление функции локомоции, движения за счет сокращения скелетных, поперечнополосатых миоцитов потребовало больше энергии и нарабатываемой *in vivo* энергии стало явно недостаточно. По этой причине среди регуляторов метаболизма *in vivo* ЖК на первом месте оказался вновь синтезированный, поздний в филогенезе, гуморальный медиатор инсулин. Его постоянно синтезируют β-клетки поджелудочной железы; секретируют же клетки инсулин только при реализации биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии (внешнего питания) во время и после приема пищи.

*Биологическое предназначение инсулина* — обеспечение субстратами для наработки энергии все клетки, которые реализуют биологическую функцию локомоции. Для этого инсулин экспрессировал следующее:

- инициировал образование *in vivo* новых, функционально разных клеток, таких как а) пул поперечнополосатых, скелетных миоцитов; б) синцитий кардиомиоцитов; в) перипортальные гепатоциты; г) ИПА и д) оседлые макрофаги в печени — клетки Купфера. Все они формируют и представляют на плазматической мембране: 1) рецепторы к инсулину; 2) ферментную систему передачи сигнала от рецептора на плазматической мембране к исполнительным органеллам цитоплазмы и 3) инсулинзависимые, более производительные транспортеры глюкозы ГЛЮТ 4. Более ранний в филогенезе, пул ВЖК сальника остался к действию инсулина нечувствительным. ВЖК сальника к активным рецепторам к инсулину не имеют [21].

Прямого отношения к регуляции *in vivo* метаболизма глюкозы, функции гомеостаза, инсулин не имеет. Миллионы лет до инсулина активацию поглощения клетками глюкозы инициировала гипергликемия межклеточной среды. Состояние же гипогликемии купировала секреция глюкагона  $\alpha$ -клетками островков Лангерганса и активация гидролиза гликогена (гликогенолиза) только в гепатоцитах; формирование этих процессов завершилось задолго до синтеза *in vivo* и реализации функции инсулина. При этом освобождение в кровотоке глюкозы в процессе компенсации состояния гипогликемии осуществляют более ранние в филогенезе гепатоциты, за счет накопленного ими гликогена, но не поздние в филогенезе скелетные миоциты и кардиомиоциты.

2. При действии инсулина завершено формирование замкнутой системы кровообращения и проксимального отдела артериального русла, артерий эластического типа. Сформировать функцию локомоции без замкнутой системы кровообращения, без сердца как центрального насоса в проксимальном отделе артериального русла, как и без миллионов артериол мышечного типа (локальных перистальтических насосов) в дистальном отделе артериального русла, невозможно.

3. На ранних ступенях филогенеза, миллионами лет жившие в океане только анаэробы Археи, для обеспечения клеток энергией метаболизировали ацетат, ацетоацетат, кетоновые тела и короткоцепочечные ЖК. В глубинах океана без света солнца гетеротрофы Археи миллионы лет глюкозу не синтезировали. После исторического симбиотического слияния в филогенезе автотрофов и гетеротрофов, образованные симбионты из межклеточной среды не поглощают глюкозу, если возможно поглощать ЖК [22]. Чтобы клетки *in vi-*

*vo* начали поглощать глюкозу, их надо лишить возможности поглощать ЖК в форме НЭЖК. К тому же механизмы поглощения клетками ЖК куда более совершенны, чем поглощение клетками глюкозы, даже при действии поздних в филогенезе, зависимых от инсулина транспортеров ГЛЮТ4.

Инсулин, для того, чтобы активировать поглощение клетками глюкозы из межклеточной среды: а) блокирует липолиз в ИПА; б) понижает секрецию и содержание в крови неэтерифицированных, полярных ЖК (НЭЖК) в ассоциации с альбумином и в) вынуждает клетки нарабатывать необходимой энергии для поглощения глюкозы. И пока содержание в плазме крови НЭЖК не станет физиологично сниженным, клетки не начнут поглощать глюкозу. Это, мы полагаем, и есть этиологический фактор сочетанного поглощения ЖК и глюкозы клетками, отработанный на ранних ступенях филогенеза.

4. Инсулин сформировал иной способ обеспечения скелетных миоцитов и кардиомиоцитов субстратами для наработки энергии. Все инсулиннезависимые клетки поглощают ЖК в форме ТГ в составе ЛП и запасают ТГ в цитоплазме в форме «капель» липидов, гидролизуют ТГ, и окисляют НЭЖК в митохондриях. По сути ранние в филогенезе клетки самостоятельно обеспечивают себя субстратами и энергией. Инсулин же инициировал «централизованное» обеспечение клеток субстратами для наработки энергии для скелетных миоцитов и кардиомиоцитов. Ни скелетные миоциты, ни синцитий кардиомиоцитов не поглощают МЖК+НЖК в форме ТГ в составе ЛП и не депонируют их в форме капель ТГ.

При реализации функции локомоции, при действии инсулина начато централизованное депонирование ЖК в форме ТГ в ИПА. После гидролиза ТГ при активации гормонзависимой липазы всеми липолитическими гормонами и освобождении в кровотоке ЖК в форме полярных НЭЖК, инсулинзависимые миоциты и кардиомиоциты поглощают только НЭЖК. Если же активное поглощение инсулинзависимыми миоцитами пальмитиновой НЖК превышает возможности митохондрий их поглощать, развивается диффузный липоидоз (опалесценция) цитоплазмы миоцитов без физиологичного образования капель липидов. При таком диффузном липоидозе цитоплазмы сократительная способность кардиомиоцитов понижается с развитием одновременно симптомов дилатационной кардиомиопатии [23].

5. На ступенях филогенеза, инсулин инициировал замену *in vivo* пальмитинового варианта метаболизма ЖК, при котором митохондрии медленно поглощали и окисляли, главным образом, пальмитиновую НЖК,

на иной, максимально эффективный олеиновый вариант поглощения и окисления митохондриями олеиновой МЖК. Для этого инсулин экспрессировал новые ферментные системы, при действии которых гепатоциты всю синтезированную ими из экзогенной глюкозы *in situ de novo* пальмитиновую НЖК, тут же превращают в олеиновую МЖК. Экспрессированные инсулином 2 фермента - пальмитоил-КоА-элонгаза и стеарил-КоА-десатураза стали активировать две сопряженные биохимические реакции: эндогенно синтезированная С16:0 пальмитиновая НЖК → С18:0 стеариновая НЖК → ω-9 С18:1 олеиновая МЖК [24].

И если при окислении пальмитиновой НЖК митохондрии не могли потенциально, существенно усилить наработку АТФ, то при метаболизме олеиновой МЖК, как субстрата, количество нарабатываемого митохондриями АТФ определено только уровнем образования (поглощением клетками) олеиновой МЖК. Чем активнее действие инсулина *in vivo*, тем в большей мере количество олеиновой МЖК, этерифицированной в ТГ в ИПА, превышает долю эндогенной пальмитиновой НЖК, тем больше *in vivo* олеиновой ЖК, олеиновых ТГ и одноименных ЛПО НП секретируют гепатоциты. И при олеиновом варианте переноса ЖК в составе ЛПО НП, не образуются олеиновых ЛПНП; поэтому ХС-ЛПНП всегда низкий.

Основной причиной повышения ХС-ЛПНП, является; а) избыточное количество *in vivo* экзогенной (эндогенно синтезированной) пальмитиновой НЖК в форме пальмитиновых ТГ; б) формирование большого числа пальмитиновых ЛПО НП → ЛПНП, которые в крови не формируют апоЕ/В-100 лиганд и их не могут поглотить клетки. В крови происходит накопление безлигандных пальмитиновых ЛПО НП → ЛПНП и увеличение содержания преимущественно спирта ХС в полярном монослое пальмитиновых ЛПО НП-ЛПНП; это и есть ХС-ЛПНП.

б. Одновременно поздний в филогенезе инсулин лишен возможности превратить в гепатоцитах экзогенную пальмитиновую НЖК, которая поступает с пищей, в олеиновую МЖК. Метаболизм экзогенной пальмитиновой НЖК отработан на ступенях филогенеза миллионами лет ранее, чем свою функцию начал инсулин как регулятор метаболизма ЖК. Если поступление пальмитиновой НЖК с пищей велико, длительно, формируются последовательно: а) пальмитиновый вариант метаболизма ЖК; б) клинические симптомы афизиологического процесса – атеросклероза с ГЛП IIб типа и в) компенсаторное начало иного афизиологического процесса – атероматоза. Далее, развивается иной, компенсаторный, патогенетически связанный атероматоз интимы артерий эла-

стического типа. Что первично, атеросклероз ли, функциональная ли резистентность к инсулину или диабет первого типа при нарушении целостности структур, предстоит еще разобраться [25, 26].

Основная проблема пациентов с атеросклерозом, синдромом инсулинорезистентности (ИР) и ГЛП состоит, в первую очередь, не в том, что *in vivo* усилено происходит гликирование (гликозилирование) функционально важных протеинов и нарушение физико-химических свойства, и функциональной активности. Пациенты с синдромом ИР постоянно пребывают в состоянии пальмитинового варианта и дефицита энергии, которая столь необходима для реализации реакций метаболизма. Клетки *in vivo* при синдроме ИР не могут при необходимости, потенциально усилить наработку митохондриями АТФ и обеспечить реализацию биологической функции адаптации, реакции компенсации.

7. У травоядных животных инсулин инициировал: а) синтез биохимически активной олеиновой МЖК из эндогенной пальмитиновой НЖК, из экзогенной глюкозы; б) олеиновый вариант метаболизма ЖК и в) векторный перенос олеиновой НЖК к ИПА для реализации далее функции локомоции. Инсулин у травоядных инициировал новый, специфичный перенос олеиновой МЖК в форме олеиновых ТГ, в составе олеиновых ЛПО НП при поглощении их клетками путем апоЕ/В-100 эндоцитоза. У травоядных инсулин инициировал функционально короткий путь переноса, главным образом, олеиновой МЖК в межклеточной среде по пути: олеиновые, прелигандные ЛПО НП → лигандные ЛПО НП → апоЕ/В-100 эндоцитоз. При действии инсулина у травоядных физиологично образование олеиновых ЛПНП не происходит. Физиологичный уровень ХС-ЛПНП формируют, главным образом, линолевые ЛПНП за счет переноса ими поли-ЭХС, точнее ПНЖК этерифицированных спиртом ХС. В состав линолевых ЛПНП поли-ЭХС перешли из ЛПВП при действии БППЭХ.

Возвращаясь к экспериментам А.И. Игнатовского и позапрошлomu столетию, важно понять: а) если травоядных кормить мясом с высоким содержанием в нем пальмитиновой НЖК, то б) специфичная система, предназначенная для переноса химически активной олеиновой МЖК, является явно не оптимальной для переноса малоактивной НЖК, пальмитиновых ТГ и одноименных ЛПО НП. При низких параметрах гидролиза пальмитиновых ТГ при действии постгепариновой ЛПЛ формируются безлигандные пальмитиновые ЛПО НП → ЛПНП; они не образуют апоЕ/В-100 лиганд и их не поглощают клетки. В крови циркулирует много безлигандных пальмитиновых ЛПО НП → ЛПНП; они формируют ГЛП и вы-

сокий уровень ХС-ЛПНП, в первую очередь, за счет неэтерифицированного спирта ХС в полярном монослое ФХ+ХС пальмитиновых ЛПОНП.

При этом происходит формирование атеросклероза, а именно: а) ГЛП типа Пб; б) блокада поглощения клетками ПНЖК в форме поли-ЭХС в составе физиологических линолевых ЛПНП путем апоВ-100 эндоцитоза и в) нарушен синтез биологически активных эйкозаноидов. Формирование ГЛП, нарушение биологической функции эндоэкологии, «замусоривание» межклеточной среды большими эндогенными флогогенами являются причиной активации другого афизиологичного процесса - атероматоза, удаления из циркуляции, сбора и утилизации пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП в интима артерий эластического и смешанного типов.

*Формирование в филогенезе 3 вариантов переноса к клеткам ЖК в форме ТГ.* В филогенезе, мы полагаем, биологическая роль инсулина состоит в том, что гормон: 1) обеспечил превращение на суше покинувших океан плотоядных (рыбоядных) животных в травоядные [27]; 2) обеспечил всем животным высокие кинетические параметры движения в биологической функции локомоции; 3) осуществил превращение *in vivo* мало эффективного пальмитинового варианта метаболизма ЖК с постоянным дефицитом энергии (АТФ), в потенциально высокоэффективный олеиновый метаболизм ЖК. Инсулин призван обеспечить субстратами для наработки энергии все клетки, которые реализуют биологическую функцию локомоции.

В филогенезе, мы полагаем, последовательно за миллионы лет, произошло формирование трех систем переноса к клеткам ЖК в форме неполярных ТГ в составе апоВ липопротеинов.

1. У плотоядных (Carnivore) в океане и на суше это путь превращений: энтероциты, апоЕ/В-48 ХМ→ гепатоциты→ апоВ-100 ЛПОНП→ ЛПНП→ апоВ-100 эндоцитоз.

2. У травоядных (Herbivore), до становления функции инсулина, это перенос химически мало активной пальмитиновой НЖК по пути: гепатоциты→ пальмитиновые ЛПОНП→ ЛПНП→ апоВ-100 поглощение всеми клетками.

3. У травоядных (Herbivore) при действии инсулина, перенос химически активной олеиновой МЖК является наиболее коротким и происходит по пути: гепатоциты→ олеиновые ЛПОНП→ апоЕ/В-100 эндоцитоз только клетками имеющими рецепторы к инсулину.

Если оценить варианты переноса ЖК на рассмотренных ступенях филогенеза, можно понять, почему система переноса олеиновой НЖК в олеиновые ЛПОНП не может переносить пальмитиновые ЛПОНП

с иными физико-химическими свойствами. В инсулинзависимой системе переноса олеиновой МЖК, ТГ задействованы только ЛПОНП и нет ЛПНП. При избытке мясной (плотоядной) пищи и содержащейся в ней пальмитиновой НЖК, клетки не поглощают безлигандные пальмитиновые ЛПОНП→ЛПНП, путем апоЕ/В-100 эндоцитоза; физиологично их нет. При избытке мясной пищи и пальмитиновой НЖК, перенос в апоВ-100 ЛП избытка ТГ происходит так, как это было миллионы лет до появления в филогенезе и начала действия инсулина [28, 29]. Важно понять, что при формировании в филогенезе травоядных, из переноса к клеткам ЖК в ЛП, вначале были исключены ХМ, а позднее и ЛПНП. У травоядного человека в норме перенос к клеткам эндогенной олеиновой МЖК, олеиновых ТГ осуществляют только олеиновые ЛПОНП.

У травоядных при синтезе гепатоцитами из глюкозы в основном олеиновой МЖК, олеиновых ТГ и олеиновых ЛПОНП, в кровотоке физиологично образуется минимальное количество ЛПНП; все олеиновые, лигандные ЛПОНП поглощаются инсулинзависимыми клетками путем апоЕ/В-100 эндоцитоза. В крови образуются, главным образом, линолевые ЛПНП; переносят они к клеткам ПНЖК в неполярной форме поли-ЭХС и остаточное количество пальмитиновых ЛПНП. Чем больше филогенетически травоядный *Homo sapiens* потребляет мясную пищу, тем выше содержание в крови пальмитиновых ТГ, пальмитиновых, безлигандных, афизиологичных ЛПОНП→ЛПНП; они то и определяют афизиологичные величины ХС-ЛПНП [30].

Безлигандные пальмитиновые ЛПОНП→ЛПНП, которые не могут поглощать клетки путем инсулинзависимого апоЕ/В-100 эндоцитоза, становятся субстратом атероматоза в интима артерий. Именно пальмитиновые ЛПОНП→ЛПНП объединяют 2 афизиологичных процесса - атеросклероза и атероматоза, нарушение биологических функций трофологии и эндоэкологии. При атеросклерозе как афизиологичном процессе, образуются пальмитиновые ЛПОНП→ЛПНП: атероматоз – процесс удаления их из кровотока как безлигандных пальмитиновых ЛП. Происходит это не в полной мере физиологично, точнее совсем афизиологично. Именно пальмитиновые ЛПОНП→ЛПНП индуцируют атероматоз в интима артерий эластического типа. Избыток в пище пальмитиновой НЖК – основная причина липидоза клеток, зависимых от инсулина: скелетных миоцитов, кардиомиоцитов, перипортальных гепатоцитов, макрофагов Купфера и β-клеток островков [31].

*Homo sapiens – в филогенезе вид травоядный.* Согласно всем особенностям анатомических структур и ак-

тивности функциональных систем *in vivo*, вид *Homo sapiens* на ступенях филогенеза, на суше до становления системы инсулина, сформировался как травоядный. В то же время, ранние предки человека были плотоядными, рыбающими. При жизни на суше основную роль в превращении предков человека в травоядный вид обеспечило регуляторное действие инсулина. К. Линней, формируя бинарную номенклатуру видов животных, охарактеризовал *Homo sapiens* еще более узко, как плодоядный вид.

За миллионы лет жизни на суше система инсулина превратила далеких предшественников человека из плотоядных (рыбоядных) в травоядные. Если основным субстратом для выработки энергии у плотоядных являются экзогенные ЖК, преимущественно пальмитиновая НЖК, то у травоядных основным экзогенным субстратом пищи является глюкоза. Однако если ЖК можно окислить в митохондриях, депонировать в цитоплазме клеток в форме ТГ, то с более поздней в филогенезе глюкозой поступить подобным образом возможности нет.

1. У плотоядных началом переноса к клеткам эндогенных ЖК являются энтероциты; перенос ЖК к клеткам в форме пальмитиновых ТГ в составе ЛП многоэтапный и длительный [32]. У травоядных роль энтероцитов стала меньше; лишь незначительное число ХМ является транспортной формой экзогенных ЖК в течение короткой реакции экзотрофии вскоре после приема пищи. В физиологических условиях у человека ХМ в плазме крови натошак нет.

2. У плотоядных основное количество ЖК в гепатоцитах, которые они поглощают в составе ХМ при апоЕ/В-48 эндоцитозе, составляют экзогенные ЖК. Их необходимо оптимизировать, окисляя в пероксиосомах. У травоядных и человека основное количество ЖК *in vivo* составляют эндогенно синтезированные ЖК. Образовали их гепатоциты *in situ de novo* из экзогенной глюкозы.

В биологической реакции экзотрофии у травоядных при выраженной гипергликемии, инициированной энтероцитами, всасывании экзогенной глюкозы, инсулин: а) инициирует выставление на мембрану инсулинзависимых клеток дополнительного числа GLUT4; б) ингибирует липолиз, блокируя активность гормонзависимой липазы в инсулинзависимых подкожных адипоцитах. При гипергликемии и сниженном содержании НЭЖК, клетки быстро поглощают экзогенную глюкозу. Лишь небольшие количества ее гепатоциты депонируют в форме гидрофильного гликогена; основную же массу глюкозы клетки используют в синтезе *in situ de novo* эндогенной пальмитиновой НЖК. Это дало нам основание формально имено-

вать пальмитиновую НЖК *in vivo* как «гидрофобную» форму глюкозы [33].

Пальмитиновую НЖК можно, хотя и не быстро, но: а) окислить в матриксе митохондрий; б) депонировать в клетках в пальмитиновых ТГ. В то же время, в биологической реакции эндотрофии («внутреннего» питания) пальмитиновые ТГ не столь просто гидролизуют и вывести пальмитиновую НЖК в межклеточную среду в форме НЭЖК. Активация инсулином поглощения клетками глюкозы — один из этапов реализации функции локомоции. Инсулин стремится запастись как м

ожно больше МЖК для выработки скелетными миоцитами и кардиомиоцитами оптимального количества макроэргического АТФ.

*Инсулин и формирование типов ГЛП.* Диагностическое значение метода зонального электрофореза ЛП в одной из поддерживающих сред (чаще в геле агарозы) позволяет дифференцировать: а) фенотипы ГЛП — как следствие генетических нарушений метаболизма [34, 35] и б) типы ГЛП [36, 37], которые являются результатом эпигенетических нарушений, в первую очередь, питания, функции трофологии, реакции экзотрофии, внешнего питания. Электрофорез ЛП, мы полагаем, достоверно отражает три сформированные на ступенях филогенеза варианта переноса к клеткам ЖК, в первую очередь, НЖК и МЖК. У плотоядных перенос к клеткам НЖК+МЖК отражает ГЛП типа V, при этом задействованы ХМ, ЛПОНП и ЛПНП. У травоядных до формирования инсулина, перенос к клеткам НЖК+МЖК соответствует ГЛП типа Пб; в нем задействованы ЛПОНП и ЛПНП. У травоядных и человека при активной индукции инсулином олеинового варианта метаболизма ЖК, при нормолипидемии и нормальной электрофореграмме ЛП, МЖК к клеткам переносят только олеиновые ЛПОНП.

Физиологическая система ЛП у травоядного в филогенезе человека при оптимальном питании отражена на **рисунке**. Эта фореграмма ЛП сыворотки крови, в плане диагностики, отражает: а) оптимальную реализацию пациентом функции трофологии (питания); б) высокую регуляторную активность инсулина *in vivo* и в) реализацию *in vivo* олеинового варианта метаболизма ЖК. Такой фореграмме соответствует физиологическое содержание в плазме крови ТГ, спирта ХС, ХС-ЛПНП и полярных НЭЖК в ассоциации с липидпереносящим белком альбумином.

Нарушение филогенетически травоядным пациентом биологической функции трофологии, потребление избытка плотоядной (мясной) пищи - афизиологическая индукция субстратом, инициирует *in vivo* перенос ЖК как это происходило в филогенезе при

отсутствии инсулина; этот перенос отражает ГЛП типа IIb. От физиологического состояния нормы, ГЛП типа IIb на фореграмме отличает только наличие полосы β-ЛП, увеличение содержания ЛПНП в плазме крови. Эта фореграмма ЛП в плане диагностики отражает: а) афизиологичную реализацию функции питания; б) доминирования *in vivo* пальмитинового варианта метаболизма ЖК и в) наличие синдрома ИР. Этот тип ГЛП обычно сопровождается повышенное содержание в крови ТГ, спирта ХС, ХС-ЛПНП, гипергликемия, высокая концентрация в плазме крови НЭЖК и умеренное формирование 2 афизиологичных процессов – атеросклероза и атероматоза.

Если афизиологичное питание травоядного человека приближается к плотоядному, перенос в ЛП избыточного количества пальмитиновой кислоты отражает формирование ГЛП типа V; по сути, у человека формируется ранний в филогенезе перенос МЖК+НЖК в апоВ ЛП, характерный для плотоядных.

Избыточное количество в пище пальмитиновой НЖК и одновременно углеводов характерно для любителей пива. В странах Европы для купирования ГЛП типа V пациентов порой помещают в клинику, именуя ГЛП V типа как «пивной» тип. Формирование ГЛП типа V указывает, что отправной точкой переноса к клет-

кам НЖК+МЖК становятся энтероциты, как это происходит у плотоядных.

От ГЛП типа IIb тип V отличается (помимо высокого уровня β-ЛП) постоянно высоким содержанием в плазме крови ХМ. Формируют ХМ энтероциты тонкого кишечника из экзогенных ЖК; в составе ХМ доминирует пальмитиновая НЖК и пальмитиновые ТГ. Высокому содержанию ГЛП типа V на фореграмме ЛП клинически и лабораторно соответствуют высокая гипертриглицеридемия, гиперперхолестеринемия, высокий ХС-ЛПНП, молочный цвет сыворотки крови, высокая гипергликемия, гиперинсулинемия, повышенный уровень НЭЖК, нарушения функции соматических органов, развитие полиорганных нарушений, активное формирование двух последовательных, разных афизиологичных процессов: атеросклероза и атероматоза.

Можно обоснованно говорить, что классификация ГЛП по Д. Фредриксону включает 3 генетически обусловленных фенотипа (ГЛП фенотип I, фенотип IIa и фенотип III) [38] и 3 эпигенетически обусловленных типа ГЛП (соответствующих состоянию нормы, ГЛП типа IIb и ГЛП типа V) [39]. Важным является уточнение, что при формировании врожденной ГЛП фенотипа I, в плазме крови происходит накопление не апоВ-48 ХМ, а ассоциатов апоВ-100 олеиновых ЛПОНП. При потреблении травоядным человеком явно излишнего количества животной пищи, в плазме крови последовательно можно отметить повышение, в первую очередь, ТГ, спирта ХС, далее ХС-ЛПНП, НЭЖК, формирование гипергликемии и гиперинсулинемии. Повышению концентрации ХС-ЛПНП всегда предшествует гипертриглицеридемия, формирование же гипергликемии опережает повышение в плазме крови НЭЖК+альбумин. Наличие гипертриглицеридемии и повышение ХС-ЛПНП являются предшественниками гипергликемии и гиперинсулинемии. Формирование атеросклероза при поедании травоядными и человеком мясной пищи всегда первично, синдром ИР всегда вторичен. Атеросклероз как дефицит в клетках ПНЖК и формирование пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП всегда первичны по отношению к синдрому ИР и атероматозу [40, 41].

Мы полагаем, что типирование ГЛП методом зонального электрофореза ЛП отражает отработанную в филогенезе готовность функции трофологии *in vivo* воспринять индукцию разными субстратами, используя для этого 3 варианта, сформированные на ступенях филогенеза. Всеядным *Homo sapiens* не является; биологически это невозможно. Однако человек, используя биологическую функцию адаптации, может реализовать ранние в филогенезе системы переноса к клеткам ЖК: а) оптимальную для человека систему травоядных с активной функцией инсулина; б) менее желаемую систе-

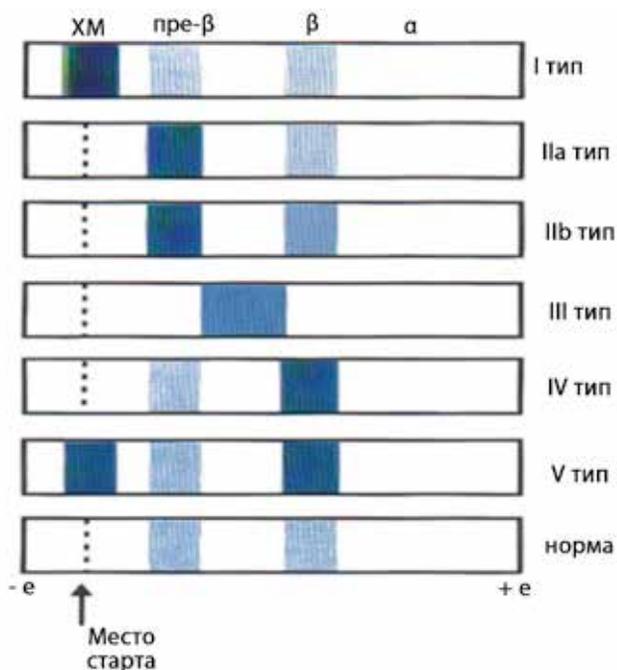


Схема фенотипов (типов) ГЛП согласно Д. Фредриксона на основании электрофореза ЛП в геле агарозы.

му травоядных при блокаде (отсутствии) инсулина и в совсем уж афизиологичную систему переноса ЖК у плотоядных. Это является наглядным примером биологической закономерности Геккеля как единение биологических процессов в онто- и филогенезе, что, правда, не всегда приводит к оптимальному результату [42]. Для профилактики всех 7 метаболических пандемий необходимо соблюдать все ограничения, которые сформировались на ступенях филогенеза. Атеросклероз и атероматоз — 2 разных патологических процесса со своей этиологией и патогенезом, это нарушение разных биологических функций, однако приемы профилактики являются едиными. Атероматоз — логичное, компенсаторное следствие атеросклероза.

*Основы первичной профилактики атеросклероза и атероматоза.* Решающим условием эволюции, превращения плотоядных в травоядные явилось биологическое действие инсулина. И если в филогенезе до инсулина все клетки из ацетил-КоА синтезировали только пальмитиновую НЖК, при действии инсулина синтез ЖК продлен на 2 биохимические реакции; удлинения цепи пальмитиновой НЖК на 2 атома углерода, на один ацетил-КоА: С16:0 пальмитиновая НЖК → С18:0 стеариновая НЖК → ω-9 С18:1 олеиновая МЖК.

Нежелание пациентов потреблять плотоядную (рыбоядную) пищу и морепродукты является афизиологичным [43]. Миллионами лет при жизни в океанах прародители человека были рыбоядными. В наследство от этого времени виду *Homo sapiens* досталось то, что: а) все животные клетки из ацетил-КоА синтезируют пальмитиновую НЖК; б) биологические функции и реакции *in vivo* постоянно регулируют гуморальные медиаторы — эйкозаноиды. Все клетки синтезируют их из экзогенных ПНЖК, из рыбьего жира [44]. К тому же, травоядные вскармливают новорожденных плотоядной пищей, материнским молоком — пальмитиновым, насыщенным животным жиром.

Жиры молока это пальмитиновый, насыщенный, животный жир; сливочным маслом мы называем его вне всех оснований. Врачи рекомендуют в пищу животный, пальмитиновый жир и не одобряют потребление растительного, олеинового, пальмового масла. С позиций биологии, профилактики атеросклероза и атероматоза, растительное масло для взрослых лучше любого животного жира. Отказ от потребления рыбы, алиментарный дефицит в пище эйкозапентаеновой и докозагексаеновой ПНЖК неотвратимо способствует формированию атеросклероза [45]. Можно обоснованно полгать, что атеросклероз формируется *in vivo* зависимо от дефицита в клетках ω-3 ПНЖК. Атероматоз же в интима артерий активирован параллельно избытку в пище травоядных животных мяса с высоким

содержанием пальмитиновой НЖК, спирта ХС в пальмитиновых ЛПОНП → ЛПНП (ХС-ЛПНП). ХС-ЛПНП — тест перегрузки физиологичной системы олеиновых ЛПОНП пальмитиновой НЖК. Считать же вегетарианскую пищу физиологичной нет оснований; пища, в которой нет ω-3 и ω-6 ПНЖК — явно афизиологична.

Экзогенная гиперхолестеринемия в экспериментах С.С. Халатова и Н.Н. Аничкова — частный случай биологической закономерности: травоядное животное — кролик, плотоядная пища — спирт ХС. Воспроизвести же на модели экзогенной гиперхолестеринемии атеросклероз и атероматоз аорты у плотоядных крыс не получается. Травоядному в филогенезе человеку можно сверять свое питание с данными, которые приведены в Библии, в притче о Святом Петре. При каждом злоупотреблении травоядным человеком плотоядной пищей и С16:0 пальмитиновой НЖК, на уровне инсулинзависимых, поздних в филогенезе ЛПОНП формируется специфичный *locus minoris resistentia* на уровне формирования пальмитиновых ЛПОНП → ЛПНП.

Поскольку утилизацию пальмитиновых ЛПОНП → ЛПНП в интима артерий осуществляют не полифункциональные оседлые макрофаги интимы, а в большой мере функционально ограниченные моноциты гематогенного происхождения, при реализации ими биологической функции эндоекологии, биологической реакции воспаления, формируется атероматоз интимы в проксимальном отделе артериального русла. В проспективных клинических протоколах показано, что сумма НЖК, в первую очередь пальмитиновая НЖК, но не ННЖК и не количество углеводов, определяют риск ИБС. Олеиновая МЖК предотвращает действие избытка пальмитиновой НЖК, нарушение функции митохондрий при формировании синдрома ИР.

Атеросклероз — перенос в крови травоядных, в поздних в филогенезе ЛПОНП не синтезированной из глюкозы олеиновой МЖК, а экзогенной пальмитиновой НЖК, что характерно для плотоядных, для мясоедов. Этиологическими факторами атеросклероза являются: а) избыточное, афизиологичное потребление травоядным видом *Homo sapiens* плотоядной (животной) пищи и б) низкие параметры участия пальмитиновой НЖК в биохимических реакциях *in vivo*, по сравнению с высокими параметрами, которыми обладает олеиновая МЖК.

Атероматоз — катаболизм (утилизация) тех пальмитиновых ЛПОНП → ЛПНП, которые не смогли поглотить клетки со всеми переносимыми ими ПНЖК а форме поли-ЭХС. Сбор и утилизация ПНЖК проходит в интима артерий; только частичный катаболизм поли-ЭХС при действии моноцитов гематогенного происхождения формирует атероматозные отложения липидов (бляшки), стенозирование артерий эластиче-

ского типа, с клинической картиной ИБС и ишемии мозга. Если в пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП повышено содержание ТГ, в интиме происходит формирование атероматоза и атеротромбоза; это образование «мягких» бляшек, которые содержат много ТГ и подвержены разрыву наиболее часто.

В филогенезе (единый анамнез всего живого) низкая химическая активность пальмитиновой НЖК и высокие параметры химической активности олеиновой НЖК - основной этиологический фактор 2 афизиологических процессов – атеросклероза и атероматоза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда [2]. Согласно филогенетической теории общей патологии, нарушение физиологического действия инсулина (синдром ИР) важно в патогенезе атеросклероза при нарушении функций трофологии (питания), реакции экзотрофии, функций гомеостаза, адаптации и эндоэкологии. И в этих неблагоприятных для метаболизма ситуациях, соблюдение оптимальной диеты является единственным эффективным способом предотвратить осложнения атеросклероза и атероматоза артерий эластического типа. Иного в филогенезе нам не дано; важно помнить – Homo sapiens в филогенезе, по натуре, травоядный [46]. Этому и надо настоятельно следовать.

### Литература

1. Титов В.Н. Структура апоА-1 липопротеинов высокой плотности. *Биохимия*. 1997; 62(1): 3 – 19.
2. Титов В.Н. *Клиническая биохимия. Курс лекций*. М.; ИНФРА-М. 2017.
3. Wang J., Ban M.R., Kennedy B.A., Anand S., Yusuf S., Huff M.W., Pollex R.L., Hegele R.A. APOA5 genetic variants are markers for classic hyperlipoproteinemia phenotypes and hypertriglyceridemia. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2008; 5(11): 730 – 7.
4. Nakajima K., Nagamine T., Fujita M.Q., Ai M., Tanaka A., Schaefer E. Apolipoprotein B-48: a unique marker of chylomicron metabolism. *Adv. Clin. Chem.* 2014; 64: 117 – 77.
5. Julve J., Martín-Campos J.M., Escolà-Gil J.C., Blanco-Vaca F. Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clin Chim Acta*. 2016; 455: 134 – 8.
6. Magri M.C., Prata T.V., Manchiero C., Dantas B.P., Mazza C.C., Tengan F.M.. Genetic variation in the microsomal triglyceride transfer protein (-493G/T) is associated with hepatic steatosis in patients infected with hepatitis C virus. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17(1): 235 – 41.
7. Okazaki M., Yamashita S. Recent advances in analytical methods on lipoprotein subclasses: calculation of particle numbers from lipid levels by gel permeation HPLC using “Spherical Particle Model”. *J. Oleo. Sci.* 2016; 65(4): 265 – 82.
8. Parhofer K.G., Barret R. Thematic review series: patient-oriented research. What we have learned about VLDL and LDL metabolism from human kinetics studies. *J Lipid Res.* 2006; 47(8): 1620 – 30.
9. Huang Y., Ji Z.S., Brecht W.J., Rall S.C., Taylor J.M., Mahley R.W. Overexpression of apolipoprotein E3 in transgenic rabbits causes combined hyperlipidemia by stimulating hepatic VLDL production and impairing VLDL lipolysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19(12): 2952 – 9.
10. Рожкова Т.А., Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Каба С.И., Кухарчук В.В. Липолиз в филогенетически ранних липопротеинах низкой плотности и более поздних липопротеинах очень низкой плотности; функция и диагностическое значение апоЕ и апоС-III. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(12): 4 – 14.
11. Kohan A.B. Apolipoprotein C-III: a potent modulator of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015; 22(2): 119 – 25.
12. Титов В.Н., Дыгай А.М., Котловский М.Ю., Курдюк Е.В., Якименко А.В., Якимович И.Ю., Аксютин Н.В., Котловский Ю.В. Пальмитиновая, олеиновая кислоты и их роль в патогенезе атеросклероза. *Бюллетень сибирской медицины*. 2014; 13(5): 149 – 59.
13. Титов В.Н., Якименко А.В., Котловский М.Ю., Ариповский А.В., Смирнов Г.П., Малышев П.П. Позиционные изомеры пальмитиновых и олеиновых триглицеридов, липолиз, конформация апоВ-100, формирования апоЕ/В-100 лиганда и поглощение инсулинзависимыми клетками липопротеинов очень низкой плотности при действии статинов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(1): 736 – 43.
14. Toth P.P. Triglyceride-rich lipoproteins as a causal factor for cardiovascular disease. *Vasc. Health. Risk. Manag.* 2016; 12: 171 – 83.
15. Nakajima K., Nakano T., Tokita Y., Nagamine T., Inazu A., Kobayashi J., Mabuchi H. Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clin. Chim. Acta*. 2011; 412(15-16): 1306 – 18.
16. Ghaffar S., Afridi S.K., Aftab M.F., Murtaza M., Hafizur R.M., Sara S., Begum S., Waraich R.S. Clove and its active compound attenuate free fatty acid-mediated insulin resistance in skeletal muscle cells and in mice. *J. Med. Food.* 2017; 20(4): 335 – 44.
17. Синев В.В., Карагодин В.П., Собенин И.А., Постнов А.Ю., Сафонова М.А., Орехов А.Н. Мутационная нагрузка митохондриального генома в различных органах и тканях человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(1): 114 – 22.
18. Kelly D.E., He J., Menshikova E.V., Ritov V.B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002; 51(10): 2944 – 50.
19. Титов В.Н. Внутриклеточный дефицит полиеновых жирных кислот в патогенезе атеросклероза. *Кардиология*. 1998; 1: 43 – 9.
20. Frayn K., Bernard S., Spalding K, Arner P. Adipocyte triglyceride turnover is independently associated with atherogenic dyslipidemia. *J. Am. Heart. Assoc.* 2012; 1(6): e003467.
21. Peyot M.L., Guay C., Latour M.G., Lamontagne J., Lussier R., Pineda M., Ruderman N.B., Haemmerle G. Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(25): 16848 – 59.
22. Ragheb R., Shanab G.M., Medhat A.M., Seoudi D.M., Adeli K., Fantus I.G. Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: evidence for PKC activation and oxidative stress-activated signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 389(2): 211 – 6.
23. Lim S., Meigs J.B. Ectopic fat and cardiometabolic and vascular risk. *Int. J. Cardiol.* 2013; 169(3): 166 – 76.
24. Zhao L., Ni Y., Yu H., Zhang P., Zhao A., Bao Y., Liu J., Chen T. Serum stearic acid/palmitic acid ratio as a potential predictor of diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass in obesity. *FASEB J.* 2017; 31(4): 1449 – 60.
25. Кузьменко Д.И., Удинцев С.Н., Климентьева Т.К., Серебров В.Ю. Окислительный стресс жировой ткани как первичное звено патогенеза резистентности к инсулину. *Биомедицинская химия*. 2016; 62(1): 14 – 21.
26. Tomkin G.H., Owens D. Dyslipidaemia of diabetes and the intestine. *World. J. Diabetes.* 2015; 6(7): 970 – 7.
27. Титов В.Н., Эммануэль В.Л. Патогенез атеросклероза активирован, когда филогенетически травоядные животные начинают в избытке поедать мясную (плотоядную) пищу. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(9): 553.
28. Hancock C.R., Han D.H., Chen M., Terada S., Yasuda T., Wright D.C., Holloszy J.O. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(22): 7815 – 20.

29. Nakano T., Tokita Y., Nagamine T., Tanaka A., Okazaki M., Yatsuzuka S., Tamei N. Measurement of serum remnant-like lipoprotein particle-triglyceride (RLP-TG) and RLP-TG/total TG ratio using highly sensitive triglyceride assay reagent. *Clin. Chim. Acta.* 2011; 412(1-2): 71 – 8.
30. Morandi A., Fornari E., Opri F., Corradi M., Tommasi M., Bonadonna R., Maffei C. High-fat meal, systemic inflammation and glucose homeostasis in obese children and adolescents. *Int. J. Obes. (Lond).* 2017; 41(6): 986 – 9.
31. Arai H. Essence of the Japan atherosclerosis society (JAS) guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan-2012 version and treatment guide for dyslipidemia 2013-Current Strategy for the Lipid Assessment. *Rinsho. Byori.* 2014; 62(9): 878 – 83.
32. D'Aguiña T., Hung Y.H., Carreiro A., Buhman K.K. Recent discoveries on absorption of dietary fat: presence, synthesis, and metabolism of cytoplasmic lipid droplets within enterocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1861(8 Pt A): 730 – 47.
33. Титов В.Н. Избыток пальмитиновой жирной кислоты в пище – основная причина липоидоза инсулинзависимых клеток. Скелетных миоцитов, кардиомиоцитов, перипортальных гепатоцитов, макрофагов Купфера и  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(2): 68 – 77.
34. Смирнова А.В., Сухоруков В.Н., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Эпигенетические факторы в атерогенезе: микроРНК. *Биомедицинская химия.* 2016; 62(2): 134 – 40.
35. Teramoto T., Sasaki J., Ishibashi S., Birou S., Daida H., Dohi S., Egusa G., Hiro T. Other types of primary hyperlipoproteinemia (hyperlipidemia). Executive summary of the Japan Atherosclerosis Society (JAS) guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan—2012 version. *J. Atheroscler. Thromb.* 2014; 21(2): 82 – 5.
36. Титов В.Н. Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов. М., Тверь; ООО Издательство «Триада», 2008.
37. Albuquerque E.M., de Faria E.C., Oliveira H.C., Magro D.O., Castilho L.N. High frequency of Fredrickson's phenotypes IV and IIb in Brazilians infected by human immunodeficiency virus. *BMC Infect. Dis.* 2005; 5: 47 – 57.
38. Young A.J., Marriott B.P., Champagne C.M., Hawes M.R., Montain S.J. Blood fatty acid changes in healthy young Americans in response to a 10-week diet that increased n-3 and reduced n-6 fatty acid consumption: a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* 2017; 23: 1 – 13.
39. Cansu G.B., Yilmaz N., Altunbaş H., Balci M.K., Sari R. Subcutaneous NPH insulin for severe hypertriglyceridemia in a pregnant patient with type V hyperlipoproteinemia: a case report. *Balkan. Med. J.* 2012; 29(2): 222 – 4.
40. Knouff C., Briand O., Lestavel S., Clavey V., Altenburg M., Maeda N. Defective VLDL metabolism and severe atherosclerosis in mice expressing human apolipoprotein E isoforms but lacking the LDL receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1684(1-3): 8 – 17.
41. Hegele R.A., Pollex R.L. Hypertriglyceridemia: phenomics and genomics. *Mol. Cell. Biochem.* 2009; 326(1-2): 35 – 43.
42. Nesto R.W. Beyond low-density lipoprotein: addressing the atherogenic lipid triad in type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 2005; 5(6): 379 – 87.
43. Teramoto T., Sasaki J., Ueshima H., Egusa G., Kinoshita M., Shimamoto K., Daida H. Risk factors of atherosclerotic diseases. Executive summary of Japan Atherosclerosis Society (JAS) guideline for diagnosis and prevention of atherosclerosis cardiovascular diseases for Japanese. *J. Atheroscler. Thromb.* 2007; 14(6): 267 – 77.
44. Kuda C., Brezina M., Rombaldova M., Slavikova B., Posta M., Beier P., Janovska P. Docosahexaenoic acid-derived fatty acid esters of hydroxy fatty acids (FAHFAs) with anti-inflammatory properties. *Diabetes.* 2016; 65(9): 2580 – 90.
45. Sioen I., van Lieshout L., Eilander A., Fleith M., Lohner S., Sommer A., Petisca C., Eussen S. Systematic review on N-3 and N-6 polyunsaturated fatty acid intake in european countries in light of the current recommendations - focus on specific population groups. *Ann. Nutr. Metab.* 2017; 70(1): 39 – 50.
46. Titov V.N. Common etiology, different pathogenesis and basics of atherosclerosis and atheromatosis prevention. Marked differences in lipoprotein-mediated fatty acids transport in blood of herbivores and carnivores. *Intern. Heart. Vasc. Dis.* 2016; 4(12): 22 – 35.

## References

1. Titov V.N. Structure of apoA-I high-density lipoproteins. *Biokhimiya.* 1997; 62(1): 3 – 19. (in Russian)
2. Titov V.N. *Clinical biochemistry. Lecture course. [Klinicheskaya biokhimiya. Kurs lektsiy].* Moscow; INFRA. 2017. (in Russian)
3. Wang J., Ban M.R., Kennedy B.A., Anand S., Yusuf S., Huff M.W., Pollex R.L., Hegele R.A. APOA5 genetic variants are markers for classic hyperlipoproteinemia phenotypes and hypertriglyceridemia. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2008; 5(11): 730 – 7.
4. Nakajima K., Nagamine T., Fujita M.Q., Ai M., Tanaka A., Schaefer E. Apolipoprotein B-48: a unique marker of chylomicron metabolism. *Adv. Clin. Chem.* 2014; 64: 117 – 77.
5. Julve J., Martín-Campos J.M., Escolà-Gil J.C., Blanco-Vaca F. Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clin Chim Acta.* 2016; 455: 134 – 48.
6. Magri M.C., Prata T.V., Manchiero C., Dantas B.P., Mazza C.C., Tengan F.M.. Genetic variation in the microsomal triglyceride transfer protein (-493G/T) is associated with hepatic steatosis in patients infected with hepatitis C virus. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17(1): 235 – 41.
7. Okazaki M., Yamashita S. Recent advances in analytical methods on lipoprotein subclasses: calculation of particle numbers from lipid levels by gel permeation HPLC using “Spherical Particle Model”. *J. Oleo. Sci.* 2016; 65(4): 265 – 82.
8. Parhofer K.G., Barret R. Thematic review series: patient-oriented research. What we have learned about VLDL and LDL metabolism from human kinetics studies. *J Lipid Res.* 2006; 47(8): 1620 – 30.
9. Huang Y., Ji Z.S., Brecht W.J., Rall S.C., Taylor J.M., Mahley R.W. Overexpression of apolipoprotein E3 in transgenic rabbits causes combined hyperlipidemia by stimulating hepatic VLDL production and impairing VLDL lipolysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19(12): 2952 – 9.
10. Rozhkova T.A., Titov V.N., Amelushkina V.A., Kaba S.I., Kukhar-chuk V.V. Lipolysis in phylogenetically early low-density lipoproteins and later very low density lipoproteins; Function and diagnostic value of apoE and apo-III. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2015; 60(12): 4 – 14. (in Russian)
11. Kohan A.B. Apolipoprotein C-III: a potent modulator of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015; 22(2): 119 – 25.
12. Titov V.N., Dygai A.M., Kotlovskiy M.Yu., Kurdoyak E.V., Yakimenko A.V., Yakimovich I.Yu., Aksutina N.V., Kotlovskiy Yu.V. Palmitic, oleic acids and their role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Bulleten' sibirskoy meditsyny.* 2014; 13(5): 149 – 59. (in Russian)
13. Titov V.N., Yakimenko A.V., Kotlovskiy M.Y., Aripovskiy A.V., Smirnov G.P., Malyshev P.P. Positional isomers palmitic and oleic triglyceride lipolysis conformation of apoB-100, forming apoE/ligand-100 cells and insulin-dependent uptake of very low density lipoproteins in the action of statins. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 61(11): 736 – 43. (in Russian)
14. Toth P.P. Triglyceride-rich lipoproteins as a causal factor for cardiovascular disease. *Vasc. Health. Risk. Manag.* 2016; 12: 171 – 83.
15. Nakajima K., Nakano T., Tokita Y., Nagamine T., Inazu A., Kobayashi J., Mabuchi H. Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clin. Chim. Acta.* 2011; 412(15-16): 1306 – 18.
16. Ghaffar S., Afridi S.K., Aftab M.F., Murtaza M., Hafizur R.M., Sara S., Begum S., Waraich R.S. Clove and its active compound attenuate free fatty acid-mediated insulin resistance in skeletal muscle cells and in mice. *J. Med. Food.* 2017; 20(4): 335 – 44.

17. Sinev V.V., Karagodin V.P., Sobenin I.A., Postnov A.Yu., Sazonova M.A., Orekhov A.N. Mutational load of the mitochondrial genome in various organs and tissues of a person. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(1): 114 – 22. (in Russian)
18. Kelly D.E., He J., Menshikova E.V., Ritov V.B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002; 51(10): 2944 – 50.
19. Titov V.N. Intracellular deficiency of polyene fatty acids in the pathogenesis of atherosclerosis. *Kardiologiya*. 1998; 1: 43 – 9. (in Russian)
20. Frayn K., Bernard S., Spalding K., Arner P. Adipocyte triglyceride turnover is independently associated with atherogenic dyslipidemia. *J. Am. Heart Assoc.* 2012; 1(6): e003467.
21. Peyot M.L., Guay C., Latour M.G., Lamontagne J., Lussier R., Pineda M., Ruderman N.B., Haemmerle G. Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(25): 16848 – 59.
22. Ragheb R., Shanab G.M., Medhat A.M., Seoudi D.M., Adeli K., Fantus I.G. Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: evidence for PKC activation and oxidative stress-activated signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 389(2): 211 – 6.
23. Lim S., Meigs J.B. Ectopic fat and cardiometabolic and vascular risk. *Int. J. Cardiol.* 2013; 169(3): 166 – 76.
24. Zhao L., Ni Y., Yu H., Zhang P., Zhao A., Bao Y., Liu J., Chen T. Serum stearic acid/palmitic acid ratio as a potential predictor of diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass in obesity. *FASEB J.* 2017; 31(4): 1449 – 60.
25. Kuz'menko D.I., Udinzhev S.N., Kliment'eva T., Serebrov V.Yu. Oxidative stress of adipose tissue as the primary link in the pathogenesis of insulin resistance. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2016; 62(1): 14 – 21. (in Russian)
26. Tomkin G.H., Owens D. Dyslipidaemia of diabetes and the intestine. *World. J. Diabetes*. 2015; 6(7): 970 – 7.
27. Titov V.N., Emmanuel' V.L. The pathogenesis of atherosclerosis is activated when phylogenetically herbivores start to eat meat in excess (carnivorous) food. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(9): 553. (in Russian)
28. Hancock C.R., Han D.H., Chen M., Terada S., Yasuda T., Wright D.C., Holloszy J.O. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105(22): 7815 – 20.
29. Nakano T., Tokita Y., Nagamine T., Tanaka A., Okazaki M., Yatsuzuka S., Tamei N. Measurement of serum remnant-like lipoprotein particle-triglyceride (RLP-TG) and RLP-TG/total TG ratio using highly sensitive triglyceride assay reagent. *Clin. Chim. Acta*. 2011; 412(1-2): 71 – 8.
30. Morandi A., Fornari E., Opri F., Corradi M., Tommasi M., Bonadonna R., Maffei C. High-fat meal, systemic inflammation and glucose homeostasis in obese children and adolescents. *Int. J. Obes. (Lond)*. 2017; 41(6): 986 – 9.
31. Arai H. Essence of the Japan atherosclerosis society (JAS) guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan-2012 version and treatment guide for dyslipidemia 2013-Current Strategy for the Lipid Assessment. *Rinsho. Byori*. 2014; 62(9): 878 – 83.
32. D'Aguiila T., Hung Y.H., Carreiro A., Buhman K.K. Recent discoveries on absorption of dietary fat: presence, synthesis, and metabolism of cytoplasmic lipid droplets within enterocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016; 1861(8 Pt A): 730 – 47.
33. Titov V.N. Excess palmitic fatty acid in food is the main cause of lipoidosis of insulin-dependent cells. Skeletal myocytes, cardiomyocytes, periportal hepatocytes, macrophages of Kupffer and  $\beta$ -cells of the pancreas. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(2): 68 – 77. (in Russian)
34. Smirnova A.V., Suchorukov V.N., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Epigenetic factors in atherogenesis: microRNAs. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2016; 62(2): 134 – 40. (In Russian)
35. Teramoto T., Sasaki J., Ishibashi S., Birou S., Daida H., Dohi S., Egusa G., Hiro T. Other types of primary hyperlipoproteinemia (hyperlipidemia). Executive summary of the Japan Atherosclerosis Society (JAS) guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan—2012 version. *J. Atheroscler. Thromb.* 2014; 21(2): 82 – 5.
36. Titov V.N. *Clinical biochemistry of fatty acids, lipids and lipoproteins. [Klinicheskaya biokhimiya zhirnykh kislot, lipidov i lipoproteinov]*. Moscow, Tver'. OOO Izdatel'stvo «Triada». 2008. (in Russian)
37. Albuquerque E.M., de Faria E.C., Oliveira H.C., Magro D.O., Castilho L.N. High frequency of Fredrickson's phenotypes IV and IIb in Brazilians infected by human immunodeficiency virus. *BMC Infect. Dis.* 2005; 5: 47 – 57.
38. Young A.J., Marriott B.P., Champagne C.M., Hawes M.R., Montain S.J. Blood fatty acid changes in healthy young Americans in response to a 10-week diet that increased n-3 and reduced n-6 fatty acid consumption: a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* 2017; 23: 1 – 13.
39. Cansu G.B., Yilmaz N., Altunbaş H., Balcı M.K., Sari R. Subcutaneous NPH insulin for severe hypertriglyceridemia in a pregnant patient with type V hyperlipoproteinemia: a case report. *Balkan. Med. J.* 2012; 29(2): 222 – 4.
40. Knouff C., Briand O., Lestavel S., Clavey V., Altenburg M., Maeda N. Defective VLDL metabolism and severe atherosclerosis in mice expressing human apolipoprotein E isoforms but lacking the LDL receptor. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004; 1684(1-3): 8 – 17.
41. Hegele R.A., Pollex R.L. Hypertriglyceridemia: phenomics and genomics. *Mol. Cell. Biochem.* 2009; 326(1-2): 35 – 43.
42. Nesto R.W. Beyond low-density lipoprotein: addressing the atherogenic lipid triad in type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. 2005; 5(6): 379 – 87.
43. Teramoto T., Sasaki J., Ueshima H., Egusa G., Kinoshita M., Shimamoto K., Daida H. Risk factors of atherosclerotic diseases. Executive summary of Japan Atherosclerosis Society (JAS) guideline for diagnosis and prevention of atherosclerosis cardiovascular diseases for Japanese. *J. Atheroscler. Thromb.* 2007; 14(6): 267 – 77.
44. Kuda C., Brezinova M., Rombaldova M., Slavikova B., Posta M., Beier P., Janovska P. Docosaehaenoic acid-derived fatty acid esters of hydroxy fatty acids (FAHFAs) with anti-inflammatory properties. *Diabetes*. 2016; 65(9): 2580 – 90.
45. Sioen I., van Lieshout L., Eilander A., Fleith M., Lohner S., Szommer A., Petisca C., Eussen S. Systematic review on N-3 and N-6 polyunsaturated fatty acid intake in European countries in light of the current recommendations – focus on specific population groups. *Ann. Nutr. Metab.* 2017; 70(1): 39 – 50.
46. Titov V.N. Common etiology, different pathogenesis and basics of atherosclerosis and atheromatosis prevention. Marked differences in lipoprotein-mediated fatty acids transport in blood of herbivores and carnivores. *Intern. Heart. Vasc. Dis.* 2016; 4(12): 22 – 35.

**Сведения об авторах:**

**Титов Владимир Николаевич**, доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. клинической биохимии липопротеинов Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, e-mail: vn\_titov@mail.ru;

**Амелюшкина Вера Алексеевна**, врач клинической лабораторной диагностики Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, e-mail: vera\_aleks@mail.ru;

**Карганов Михаил Юрьевич**, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП.

© Фролова Г.А., 2019

УДК 591.5:612.821.4:615.214.2

Фролова Г.А.

# Оценка корректирующего влияния сульпирида на поведенческие нарушения алкоголизированных самцов белых крыс с разным уровнем депрессивности

ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»,  
83050, г. Донецк, ул. Щорса, д. 46

**Целью исследования** является оценка коррекции поведенческих нарушений, вызванных двухнедельной алкоголизацией у самцов белых крыс, путем блокирования сульпиридом ауторецепторов дофамина с учетом индивидуально-типологических особенностей животных.

**Методика.** Эксперимент был выполнен на 40 половозрелых крысах-самцах массой 180—220 г. Уровень тревожности крыс определяли в приподнятом крестообразном лабиринте по общему времени пребывания животного на открытом пространстве лабиринта за 5 мин тестирования и числу повторных выходов на него. Двигательную и исследовательскую активность, а также число актов груминга животных оценивали в тесте открытого поля в течение 5 мин. Уровень депрессивности животных устанавливали с помощью теста Порсолта с подсчетом количества и общей продолжительности периодов полной иммобильности (неподвижности) животного. По количеству фекальных болюсов судили об эмоциональности животных. После исходного (контрольного) тестирования в батарее вышеуказанных тестов животные были разделены на три подгруппы согласно выраженности депрессивности в тесте Порсолта. Алкоголизацию проводили в течение 14 сут путем внутрибрюшинного введения раствора этанола в виде 10% раствора из расчета 2 г/кг веса животного, после чего животные проходили повторное тестирование в поведенческих тестах. Сульпирид («Eglonyl», Sanofi Winthrop Industrie, France) вводили в течение 14 сут в дозе 10 мг/кг, внутрибрюшинно, после чего животные снова проходили тестирование.

**Результаты.** Двухнедельная алкоголизация приводит к увеличению тревожности и депрессивности самцов с исходно низким и средним уровнем депрессивности, на что указывает сокращение пребывания животных данных подгрупп на открытом пространстве приподнятого крестообразного лабиринта ( $p < 0,01$ ), уменьшение числа повторных выходов на него ( $p < 0,05$ ) и значительное увеличение общего времени неподвижности в тесте Порсолта ( $p < 0,01$ ). Последующее введение сульпирида корректирует анксиогенный и депрессогенный эффекты алкоголизации у самцов этих подгрупп. Исходно высокодепрессивные животные не проявили чувствительности к 14-дневному введению этанола и последующему блокированию D2/D3-рецепторов дофамина в приподнятом крестообразном лабиринте и тесте Порсолта. Введение этанола в течение 14 дней угнетает исследовательскую активность ( $p < 0,01$ ) самцов в открытом поле независимо от исходного уровня их депрессивности и двигательную ( $p < 0,01$ ) у низкодепрессивных животных. Последующее введение сульпирида не привело к компенсации эффекта алкоголизации на показатели поведенческой активности в открытом поле. У низкодепрессивных самцов на фоне двухнедельной алкоголизации развивается депрессивноподобное состояние, характеризующееся выраженным поведенческим дефицитом в открытом поле. Двухнедельная алкоголизация приводит к значительному (в 2—3,5 раз,  $p < 0,01$ ) росту эмоциональности независимо от исходного уровня депрессивности крыс, что полностью корректируется последующим введением сульпирида у высокодепрессивных самцов, и к частичному снижению проявлений эмоциональности у низко- и среднедепрессивных животных.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о возможности коррекции тревожных и депрессивных нарушений, возникших на фоне двухнедельной алкоголизации, сульпиридом с учетом индивидуально-типологических особенностей организма.

**Ключевые слова:** тревожность; депрессивность; поведенческая активность; алкоголизация; дофамин.

**Для цитирования:** Фролова Г.А. Оценка корректирующего влияния сульпирида на поведенческие нарушения алкоголизированных самцов белых крыс с разным уровнем депрессивности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 19–28.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.19–28

**Для корреспонденции:** Фролова Галина Александровна, канд. биол. наук, доцент каф. физиологии человека и животных Донецкого национального университета (г. Донецк), e-mail: gljukkk@ukr.net

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

**Поступила.** 20.02.2018

Frolova G.A.

## THE SULPIRIDE CORRECTION OF BEHAVIORAL DISORDERS IN ALCOHOLIZED WHITE MALE RATS WITH DIFFERENT DEGREES OF DEPRESSION

Department of Human and Animal Physiology, Donetsk National University,  
Shchorsa Str. 46, Donetsk 83050

**The aim** of the study was to evaluate correction of behavioral disorders with sulpiride, a dopamine autoreceptor inhibitor, in alcoholized rats taking into account individual typological features of the animals.

**Methods.** Experiments were performed on sexually mature male rats weighing 180-220 g. The level of anxiety was determined in the elevated plus-maze by the total time of stay in and number of exits from the open space of the maze during 5 minutes of testing. Locomotor and exploratory activity and grooming behavior were assessed in the open field for 5 minutes. The severity of animal depression was determined using the standard Porsolt test by the number and total duration of immobility periods. The emotional state of animals was evaluated by the number of fecal boluses. After the initial (control) tests, the rats were divided into three subgroups based on the severity of depression as determined in the Porsolt test. Alcoholism was modeled by intraperitoneal injections of 10% ethanol (2 g/kg body weight) for 14 days. Then the animal behavior was re-tested. Sulpiride (Eglonyl, Sanofi Winthrop Industrie, France) was administered for 14 days at a dose of 10 mg/kg, intraperitoneally; then the animals were tested again.

**Results.** Two-week alcoholization resulted in increased anxiety and depression of rats with low and medium depression degree at baseline. These disorders were evident from shortened stay of these animals in the open space of elevated plus-maze, reduced number of repeated exits from the open space, and a significant increase in the total time of immobility in the Porsolt test. The subsequent sulpiride treatment corrected the anxiogenic and depressogenic effects of alcoholism in male rats of these subgroups. Originally high-depressive animals did not show a sensitivity to the 14 day-administration of ethanol and subsequent inhibition of D2/D3-dopamine receptors in the elevated plus-maze and Porsolt test. Administration of ethanol for 14 days suppressed both the exploratory activity of rats in the open field regardless of their baseline degree of depression, and the locomotor activity of low-depressive animals. The subsequent sulpiride treatment did not abolish the effect of alcohol on the behavioral activity in the open field. Low-depressive alcoholized males developed a depression-like condition characterized by a marked behavioral deficit in the open field. The two-week alcoholization resulted in a significant (2-3.5 times) increase in the emotionality irrespective of the baseline degree of depression. This disorder was fully corrected by the sulpiride treatment in high-depressive rats and partially reduced the signs of emotionality in low- and medium-depressive animals.

**Conclusion.** The study showed a possibility for correction of anxiety and depressive disorders induced by two weeks of modeled alcohol abuse with sulpiride depending on individual typological features of animals.

**Keywords:** anxiety; depression; behavioral activity; alcoholism; dopamine.

**For citation: Frolova G.A.** The sulpiride correction of behavioral disorders in alcoholized white male rats with different degrees of depression. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 19–28. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.19–28

**For correspondence: Galina A. Frolova**, Candidate of Biological Sciences, Docent of the Department of Physiology of Human and Animals of State Educational Institution of Higher Education «Donetsk national university», Shchorsa St., 46, Donetsk, 83050, e-mail: gljukkk@ukr.net

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

**Information about authors:** Frolova G.A., [http:// orcid.org/0000-0002-7736-0245](http://orcid.org/0000-0002-7736-0245)

**Received** 20.02.2018

### Введение

Одним из заболеваний, характеризующихся наличием патологической зависимости, является алкоголизм, возникающий при длительном приеме этанолсодержащих веществ. Патофизиологические механизмы развития этого заболевания сложны и остаются до конца не выясненными, что отражается в сложностях при выборе способа терапии.

В настоящее время известно, что действие всех психоактивных веществ направлено на стимуляцию системы подкрепления, центральную роль в которой

отводят опиоидной и дофаминергической системам мозга [1]. Исследователями подтвержден тот факт, что характер воздействия этанола на дофаминергическую систему зависит от дозы и методов его введения. Так, введение малых доз животным приводит к снижению тревожности и некоторому увеличению уровня двигательной активности, что связано с ингибированием тормозных систем [2], а введение больших доз или хроническая алкоголизация приводят, напротив, к угнетению ЦНС [3]. Злоупотребление алкоголем суще-

ственным образом изменяет не только процессы синтеза, освобождения и метаболизма нейромедиаторов, но и процесс их рецепции [4]. Данный факт объясняется мембранотропным эффектом этанола: встраиваясь в липидный матрикс клеточной мембраны, он неспецифически изменяет нейротрансмиссию за счет изменения активности ферментов, транспортных носителей и рецепторов нейромедиаторов [5].

Кроме указанных выше влияний этанола на функциональные характеристики дофаминергических нейронов, следует отметить и морфологические перестройки структур мозга, содержащих дофаминергические нейроны, где было показано уменьшение объема и удельной плотности нейронов, и их проекции, где плотность нейронов также снижалась, а объем жизнеспособных нейронов несколько увеличился из-за увеличения объема их рецепторной поверхности [4].

Вместе с тем, колоссальное влияние на психоэмоциональное состояние и реализацию функций центральной нервной системы оказывает и продукт метаболизма этанола – ацетальдегид. Накопление ацетальдегида в мозге может вызвать значительные сдвиги в состоянии нейротрансмиттерных систем: продукты конденсации ацетальдегида с биогенными аминами способны связываться с дофаминовыми и опиоидными рецепторами мозга крыс [1].

На имеющуюся связь между дофаминергической системой и эффектами этанола указывает и то, что к алкогольспецифическим генам относят гены, участвующие в работе нейрональных путей систем подкрепления, поведенческого контроля и стрессовой устойчивости – т.е. мезолимбической дофаминергической системы [6].

Таким образом, одной из ключевых нейрохимических систем в механизме развития алкоголизма и связанных с ним психоэмоциональных нарушений является дофаминергическая система мозга. Однако в литературе крайне редко встречаются данные, касающиеся индивидуально-типологических особенностей восприимчивости как к длительной алкоголизации, так и к эффективным способам коррекции нарушений, вызванных приемом этанолсодержащих веществ. В качестве рабочей гипотезы было принято предположение о наличии зависимости между индивидуально-типологическими особенностями организма и возможностью коррекции блокатором D2/D3-рецепторов дофамина нарушений психоэмоционального состояния, вызванных двухнедельной алкоголизацией у самцов белых крыс. В качестве блокатора пресинаптических рецепторов дофамина был выбран сульпирид, поскольку данный препарат обладает умеренным антипсихотическим и антидепрессив-

ным эффектом и вместе с тем практически не способен вызывать экстрапирамидные нарушения. В связи с этим, **целью** являлась оценка коррекции поведенческих нарушений, вызванных двухнедельной алкоголизацией у самцов белых крыс, путем блокирования сульпиридом ауторецепторов дофамина с учетом индивидуально-типологических особенностей животных.

## Методика

Эксперимент выполнен на 40 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 180-220г, содержащихся в стандартных клетках в условиях естественного светового режима при свободном доступе к питью на стандартном гранулированном корме. Все исследования были выполнены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья № 85-23, США) и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [7]. Поведенческие эксперименты проводились в первой половине дня. Для оценки ряда психоэмоциональных показателей (тревожности, депрессивности и двигательной активности) был использован комплекс методов, традиционно применяемый в нейропсихофармакологии.

### 1. Оценка тревожности животных

Уровень тревожности крыс определяли в приподнятом крестообразном лабиринте [8] по общему времени пребывания животного на открытом пространстве лабиринта за 5 минут тестирования и числу повторных выходов на него.

Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) представляет собой приподнятый над уровнем пола лабиринт, два из четырех рукавов которого по периметру имеют стенки (закрытые рукава), а остальные – нет (открытые рукава). Лабиринт сконструирован из пластика, окрашенного в черный цвет. Ширина рукавов составляет 10 см при длине 45 см, высота стенок в закрытых рукавах составляет 10 см. В месте пересечения рукавов располагается центральная площадка 10'10 см. Лабиринт располагается на высоте 80 см над уровнем пола на центральной опоре-ножке.

При тестировании крыс плавно опускали в центр лабиринта, где визуально регистрировали их поведение. После каждого животного камеру протирали изнутри мокрыми и сухими салфетками, а также дезодорировали раствором этилового спирта.

### 2. Оценка поведенческой активности животных

В открытом поле оценивали двигательную активность по количеству пересеченных квадратов и исследо-

вательскую активность по суммарному количеству вертикальных стоек и заглядываний в отверстия-норки за 5 минут тестирования [9], а так же число актов груминга.

Открытое поле (ОП) представляет собой открытый пластиковый ящик с линейными размерами 60×60×40 см., пол которого – квадрат из пластика, выкрашенный изнутри зелено-голубой краской и приподнятый над дном ящика на высоту 3 см. Пол разделен тонкими белыми линиями на 9 равных квадратов (20×20 см); по периметру квадратов просверлены отверстия «норки» диаметром 3 см.

При тестировании крыс плавно опускали в центр ОП, где визуально в течение 5 минут регистрировали их поведение. После каждого животного камеру протирали изнутри мокрыми и сухими салфетками, а также дезодорировали раствором этилового спирта.

### 3. Оценка уровня депрессивности животных

Уровень депрессивности животных устанавливали в тесте Порсолта [7]. При тестировании крыс опускали в стеклянный цилиндр емкостью 20 литров и высотой 30 см, наполненный водой ( $t=27-28^{\circ}\text{C}$ ). Длительность теста составляла 6 минут, в течение которых фиксировали количество и продолжительность периодов полной иммобильности (неподвижности) животного, а также количество фекальных болюсов. Степень выраженности признаков поведенческой депрессии определяли с помощью подсчета суммарного времени иммобильности (ВрИм). По количеству фекальных болюсов судили об эмоциональности животных.

### 4. Разделение животных на подгруппы, отличающиеся по уровню депрессивности

Поведенческое фенотипирование – процедура комплексной оценки поведенческих характеристик лабораторных животных – разработана в целях стандартизации сбора и интерпретации поведенческих данных для выявления индивидуально-типологических отличий, начиная с элементарных моторно-двигательных реакций и заканчивая особенностями эмоционально-психической сферы [10, 11]. Предварительное поведенческое фенотипирование представляет собой интерес с той точки зрения, что позволяет установить индивидуальные особенности реагирования лабораторных животных на те или иные воздействия.

Как установлено исследователями [10, 12, 13], в основе нейрофизиологических и нейрохимических механизмов, определяющих индивидуально-типологические различия поведения, лежат биохимические особенности организации различных отделов головного мозга. Данный факт позволяет осуществлять более эффективную коррекцию различного рода аффективных

расстройств, возникающих на фоне воздействий разного генеза.

После исходного (контрольного) тестирования в батарее вышеуказанных тестов животные были разделены на три подгруппы согласно выраженности депрессивности в тесте Порсолта.

### 5. Фармакологические воздействия на животных

Алкоголизация проводилась в течение 14 дней путем внутрибрюшинного введения раствора этанола в виде 10% раствора из расчета 2 г/кг веса животного [14], после чего животные проходили повторное тестирование в поведенческих тестах.

Сульпирид («Eglonyl», Sanofi Winthrop Industrie, France) вводили в течение 14 дней в дозе 10 мг/кг, внутрибрюшинно [15], после чего животные снова проходили тестирование. Таким образом, каждое животное было протестировано трижды: в начальных условиях, после хронического введения этанола и после введения сульпирида.

### 6. Статистическая обработка результатов

Разделение исследуемой группы животных на подгруппы с различными индивидуально-типологическими особенностями проводилось согласно сигмальному отклонению ( $\pm 0,67\delta$ ) [12].

Обработка данных осуществлялась с использованием пакета программ Statistica 6.0. Учитывая, что по результатам предварительной проверки гипотезы о нормальном распределении данных по тесту Колмогорова-Смирнова нормальность не подтвердилась, в дальнейшем в работе использовали непараметрические методы математической статистики (U-критерий Манна-Уитни для независимых переменных). Принятый уровень значимости составлял 0,05.

## Результаты и обсуждение

### *Оценка исходного поведенческого профиля животных с разным уровнем депрессивности*

Результаты контрольного (исходного) тестирования животных в условиях батареи поведенческих тестов представлены в **табл. 1**. Из данных таблицы очевидно, что крысам с исходно высоким уровнем депрессивности свойственны минимальные значения времени пребывания на открытом пространстве ПКЛ и количества повторных выходов на него, что свидетельствует о высоком уровне тревожности у самцов этой подгруппы. По исследовательской и груминговой активности в открытом поле крысы с разным уровнем депрессивности не отличаются. Максимальная двигательная активность

установлена у самцов со средним уровнем депрессивности. При этом низкодепрессивные животные отличаются минимальным количеством замираний в тесте Порсолта и низкой эмоциональностью.

По мнению ряда авторов [11, 12, 16, 17], такие различия внутри однородной группы животных, выращенных в одинаковых условиях и получавших одинаковую пищу, могут быть обусловлены рядом генетически детерминированных факторов. Прежде всего, врожденным соотношением активности нейромедиаторных моноаминергических систем мозга, функциональная активность которых является определяющей при проявлении психоэмоциональных характеристик. Именно взаимосвязи между индивидуальными особенностями поведения животных и спецификой метаболизма моноаминергических систем мозга лежат в основе индивидуальной чувствительности и эмоциональной устойчивости организма к действию различного рода влияний (стрессовых, фармакологических) [18-20].

#### *Анализ влияния алкоголизации на психоэмоциональное состояние животных*

Анализ влияния двухнедельной алкоголизации на поведенческий профиль выделенных подгрупп крыс выявил следующие закономерности.

Обращает на себя внимание тот факт, что чувствительность ряда поведенческих показателей крыс к введению этанола находилась в некоторой зависимости от исходного уровня депрессивности животных, про-

явленного в тесте Порсолта. Так, на показатели поведения высокодепрессивных животных в приподнятом крестообразном лабиринте алкоголизация не повлияла; у низкодепрессивных наблюдалось сокращение суммарного времени пребывания на открытом пространстве и частоты повторных выходов на него в 1,8 ( $p<0,05$ ) и 2 ( $p<0,05$ ) раза соответственно; исходно среднедепрессивные животные на открытом пространстве не находились и повторных выходов на него не совершали (**табл. 2**).

На анксиогенный эффект этанола указывали исследователи и ранее. Как установлено Сметаниным В.А. и соавт. [21], увеличение тревожности у животных при употреблении этанола связано со снижением уровня нейротропного фактора Y, который обладает противотревожным эффектом. Подтверждают полученные в данном исследовании результаты и работы Тюренкова И.Н. с соавт. [2], где показано сокращение как времени пребывания на открытом пространстве лабиринта у самцов после принудительной алкоголизации, так и сокращенное количество выходов на него. Вместе с тем, данных относительно индивидуальных особенностей чувствительности тревожного поведения животных при алкоголизации в литературе не обнаружено.

При анализе влияния 14-дневного введения этанола на исследовательскую и двигательную активность самцов в открытом поле, отличающихся по уровню депрессивности, установлено следующее. Прежде всего, следует отметить, что алкоголизация привела к значительно-

Таблица 1

#### **Показатели поведения у животных в исходных условиях ( $M\pm m$ )**

Поведенческие показатели	Уровни депрессивности		
	низкий ( $n=8$ )	средний ( $n=18$ )	высокий ( $n=14$ )
Результаты тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте			
Открытые рукава, с	58,3±18,6*	99,8±21,9	22,2±11,6**
Выходы в открытое пространство	1,6±0,3*	2,2±0,2	0,7±0,3**
Результаты тестирования в открытом поле			
Исследовательская (вертикальная) активность	13,4±1,6	15,6±2,1	11,5±1,8
Двигательная (горизонтальная) активность	15,7±2,2*	23,2±3,2	14,0±1,6**
Число актов груминга	1,7±0,6	1,6±0,3	1,2±0,8
Результаты тестирования в тесте Порсолта			
Время неподвижности, с	13,0±0,8***	23,4±1,9	46,7±1,8**
Общее количество периодов неподвижности	3,7±0,2***	5,1±0,8	8,2±0,6**
Количество фекальных болюсов	2,6±0,5*	3,0±0,6	4,0±0,9

**Примечание.** #, ## – различия статистически значимы ( $p<0,05$ ) и ( $p<0,01$ ) соответственно в сравнении показателей условного контроля (средний тип выраженности показателей поведения) с группами высокого и низкого типа показателей поведения; \*, \*\* – различия статистически значимы ( $p<0,05$ ) и ( $p<0,01$ ) соответственно при сравнении показателей группы с крайними типами выраженности показателей поведения.

му (в 2,8—3,2 раза,  $p < 0,05$ ) угнетению исследовательской активности у всех самцов, независимо от их исходного уровня депрессивности (см. табл. 2). Вместе с тем, двигательная активность сократилась только у самцов с исходно низким уровнем депрессивности (в 1,9 раз,  $p < 0,05$ ), а у самцов остальных подгрупп осталась неизменной. Такое сокращение исследовательской и двигательной активности у низкодепрессивных крыс свидетельствует о развитии выраженного поведенческого дефицита, что является признаком индукции депрессивноподобного состояния у животных этой подгруппы.

Полученные данные относительно угнетения исследовательской активности на фоне введения этанола согласуются с результатами других авторов, указывавших на значительное сокращение данного вида активности, вплоть до развития поведенческого дефицита у лабораторных животных [2, 22, 23].

Что касается изменения двигательной активности, то полученные результаты противоречат данным Тригуб М.М., Богдановой Н.Г. и др. [3], указывавшим на выраженное сокращение количества пересеченных квадратов в открытом поле у крыс, получавших инъ-

Таблица 2

**Характер влияния алкоголизации и последующего введения сульпирида алкоголизированным крысам на показатели поведения в батарее тестов (M±m)**

Поведенческие показатели	Этап эксперимента	Уровни депрессивности		
		низкий (n=8)	средний (n=18)	высокий (n=14)
Результаты тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте				
Открытые рукава, с	контроль	58,3±18,6	99,8±21,9	22,2±11,6
	алкоголизация	13,6±6,7 <sup>••</sup>	0,0 <sup>••</sup>	37,0±7,9
	сульпирид	54,2±11,1 <sup>••</sup>	48,2±4,2 <sup>••••</sup>	45,7±5,7
Выходы в открытое пространство	контроль	1,6±0,3	2,2±0,2	0,7±0,3
	алкоголизация	0,7±0,2 <sup>•</sup>	0,0 <sup>••</sup>	0,8±0,3
	сульпирид	1,7±0,3 <sup>•</sup>	2,0±0,0 <sup>••</sup>	1,9±0,4 <sup>••</sup>
Результаты тестирования в открытом поле				
Исследовательская (вертикальная) активность	контроль	13,4±1,6	15,6±2,1	11,5±1,8
	алкоголизация	4,1±1,0 <sup>••</sup>	5,6±1,4 <sup>••</sup>	3,7±1,1 <sup>••</sup>
	сульпирид	4,7±1,1 <sup>••</sup>	7,8±1,8 <sup>••</sup>	3,3±0,9 <sup>••</sup>
Двигательная (горизонтальная) активность	контроль	15,7±2,2	23,2±3,2	14,0±1,6
	алкоголизация	8,6±1,3 <sup>••</sup>	16,6±4,2	12,7±3,8
	сульпирид	8,6±1,8 <sup>••</sup>	12,8±2,6 <sup>••</sup>	6,8±2,4 <sup>•</sup>
Число актов груминга	контроль	1,7±0,6	1,6±0,3	1,2±0,8
	алкоголизация	0,0 <sup>•</sup>	1,6±0,25	1,2±0,60
	сульпирид	0,6±0,3 <sup>•</sup>	2,4±0,5	0,0
Результаты тестирования в тесте Порсолта				
Время неподвижности, с	контроль	13,0±0,8	23,4±1,9	46,7±1,8
	алкоголизация	96,6±2,4 <sup>••</sup>	88,6±8,7 <sup>••</sup>	47,0±11,1
	сульпирид	24,7±1,4 <sup>••</sup>	33,0±5,6 <sup>••</sup>	51,5±0,8
Общее количество периодов неподвижности	контроль	3,7±0,2	5,1±0,8	8,2±0,6
	алкоголизация	15,3±0,5 <sup>••</sup>	15,8±1,2 <sup>••</sup>	8,3±1,2
	сульпирид	4,1±0,2 <sup>••</sup>	5,0±0,8 <sup>••</sup>	9,0±0,5
Количество фекальных болюсов	контроль	2,6±0,5	3,0±0,6	4,0±0,9
	алкоголизация	9,0±0,5 <sup>••</sup>	8,2±0,9 <sup>••</sup>	7,7±0,6 <sup>••</sup>
	сульпирид	5,8±0,3 <sup>••••</sup>	6,0±0,7 <sup>••••</sup>	3,7±0,4 <sup>••</sup>

**Примечание.** •, •• — различия статистически значимы при ( $p < 0,05$ ) и ( $p < 0,01$ ) соответственно при сравнении значений показателей, полученных после алкоголизации, с исходными (контрольными); ▲, ▲▲ — различия статистически значимы при ( $p < 0,05$ ) и ( $p < 0,01$ ) соответственно при сравнении значений показателей, полученных после введения сульпирида, с исходными (контрольными); ■, ■■ — различия статистически значимы при ( $p < 0,05$ ) и ( $p < 0,01$ ) соответственно при сравнении значений показателей, полученных после введения сульпирида, с результатами алкоголизации.

екции этанола в дозе 2 г/кг, поскольку в наших исследованиях двигательная активность сокращалась только у той части животных, поведение которых в исходных условиях характеризовалось низким уровнем депрессивности. На сокращение двигательной активности у алкоголизованных самцов указывали и другие авторы [22, 24]. Однако никто из них не установил индивидуальных особенностей реагирования животных на действие этанола.

Что касается влияния двухнедельной алкоголизации на груминговое поведение, то следует отметить, что чувствительными по данному компоненту поведенческих реакций к этанолу оказались только самцы с исходно низким уровнем депрессивности: груминг у них зафиксирован не был.

Как видно из **табл. 2**, двухнедельная алкоголизация привела к росту депрессивности в тесте Порсолта у животных с исходно низким и средним уровнем депрессивности в 7,4 ( $p < 0,05$ ) и 3,8 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. У высокодепрессивных самцов суммарное время неподвижности не изменилось. Аналогичным образом изменялось и общее число замираний животных в данном тесте — у самцов, проявивших увеличение депрессивности после введения раствора этанола, выявлено увеличение частоты замираний в 3—4 раза ( $p < 0,05$ ). Подобный угнетающий эффект этанола на ЦНС подтвержден результатами ряда исследований [3, 24], в которых также указывалось на увеличение суммарного времени неподвижности в тесте Порсолта и увеличение числа периодов иммобильности.

Обращает на себя внимание тот факт, что на проявления эмоциональности у экспериментальных животных этанол повлиял однонаправлено (см. табл. 2) — установлен рост эмоциональности независимо от исходного уровня депрессивности в 2—3,5 раза ( $p < 0,05$ ), что согласуется с данными А.О. Пахомовой и О.А. Коваленко [23, 25], показавшими увеличение эмоциональной нестабильности у крыс после введения этанола.

Среди возможных причин полученных поведенческих эффектов 14-дневного введения этанола следует отметить не только его влияние на содержание нейропептида Y [21], но и ингибирующее действие на NMDA-рецепторы [26, 27], которое имеет место в присутствии ионов магния. Потребление этанола может приводить к снижению концентрации магния в организме с уменьшением концентрации магния внутри клетки и во внеклеточной среде. Имеются данные о влиянии недостатка ионов магния на развитие депрессивного состояния [26].

Ведущим нейрохимическим механизмом реализации полученных эффектов является действие этанола и его метаболитов на рецепторы моноаминов и эндо-

генную опиоидную систему [28—31], результатом чего может быть изменение синтеза и высвобождения преимущественно дофамина и норадреналина в структурах мезокортиколимбической системы (прилежащее ядро, вентральная область покрышки, миндалина, медиальная префронтальная кора) [29, 30]. Как показано исследованиями ряда авторов, длительное введение этанола приводит к снижению функциональной активности нейронов мезокортиколимбической системы, что проявляется не только в морфологических изменениях нервных клеток и глиальных элементов, но и в изменении поведения, указывающего на гиподинамию дофаминергической системы (снижение вертикальной активности, самостимуляции гипоталамуса и др.) [32, 33]. Причинами подобных изменений поведения алкоголизованных крыс являются резкое падение уровня высвобождения дофамина в прилежащем ядре и замедление его оборота [34]. Вместе с тем, дисбаланс моноаминергических систем мозга (ускорение синтеза дофамина и норадреналина, снижение уровня серотонина) объясняет и нарушение функции гипоталамической системы: введение этанола оказывает определенные влияния и на гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему, что в свою очередь приводит к модуляции выделения АКТГ и повышению уровня кортикостерона [35].

#### *Оценка влияния блокирования сульпиридом ауторецепторов дофамина на психоэмоциональный профиль алкоголизованных самцов*

Фармакологическое увеличение количества нейромедиатора дофамина в синаптической щели путем блокирования сульпиридом ауторецепторов дофамина оказывало влияние на психоэмоциональное состояние алкоголизованных крыс.

Как следует из таблицы 2, инъекции сульпирида алкоголизованным крысам привели к увеличению ( $p < 0,05$ ) до исходных значений времени пребывания исходно низкодепрессивных животных на открытом пространстве. У самцов с исходно средним уровнем депрессивности так же установлен анксиолитический эффект сульпирида на алкоголизованных крыс, однако исходных значений у среднедепрессивных самцов данный показатель не достиг. Высокодепрессивные животные не проявили чувствительность ни к двухнедельному введению этанола, ни к последующим инъекциям сульпирида. Анксиолитический эффект сульпирида на алкоголизованных крыс подтверждается и изменением числа повторных выходов на открытое пространство ПКЛ: у низко- ( $p < 0,05$ ) и среднедепрессивных ( $p < 0,05$ ) самцов число выходов возросло, достигнув исходных (контрольных) значений.

Кроме того, установлено увеличение числа повторных выходов на открытое пространство лабиринта у алкоголизованных самцов с исходно высоким уровнем депрессивности в 2,4 раза ( $p < 0,05$ ).

Не повлияло блокирование сульпиридом ауторецепторов дофамина на проявления двигательной и исследовательской активности в открытом поле у алкоголизованных самцов, отличающихся по уровню депрессивности в исходных условиях.

В тесте Порсолта введение сульпирида оказало антидепрессивный эффект на алкоголизованных самцов с исходно низким и средним уровнем депрессивности. Так, суммарное время неподвижности первых сократилось в 3,9 раза ( $p < 0,05$ ), вторых – в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ), достигнув исходных (контрольных) значений (см. табл. 2). Аналогичным образом наблюдалось сокращение общего количества периодов иммобильности в 3,2-3,7 раза ( $p < 0,05$ ) у алкоголизованных самцов данных подгрупп после инъекций сульпирида, что подтверждает антидепрессивный эффект блокирования ауторецепторов дофамина на алкоголизованных животных этих подгрупп. На депрессивный статус высокодепрессивных самцов сульпирид влияния не оказал.

Что касается влияния сульпирида на эмоциональность алкоголизованных самцов, то установлена стабилизация эмоциональности во всех подгруппах животных. При этом у высокодепрессивных самцов эмоциональность достигла исходных значений.

Таким образом, полученные результаты существенно дополняют имеющиеся в научной литературе данные относительно характера влияния длительного введения этанола на психоэмоциональный статус особи и возможности последующей коррекции возникших нарушений с учетом индивидуально-типологических особенностей.

## Выводы

1. Двухнедельная алкоголизация приводит к увеличению тревожности самцов с исходно низким и средним уровнем депрессивности, на что указывает сокращение пребывания животных данных подгрупп на открытом пространстве приподнятого крестообразного лабиринта и частоты повторных выходов на него. Блокирование D2/D3-рецепторов дофамина сульпиридом корректирует анксиогенный эффект этанола у животных этих подгрупп и приводит к увеличению частоты повторных выходов на открытое пространство у самцов с исходно высокой депрессивностью.

2. Введение этанола в течение 14 сут угнетает исследовательскую активность самцов в открытом поле независимо от исходного уровня их депрессивности и

двигательную активность у низкодепрессивных животных. Последующее введение сульпирида не приводит к компенсации эффекта алкоголизации на показатели поведенческой активности в открытом поле.

3. У низкодепрессивных самцов на фоне двухнедельной алкоголизации развивается депрессивноподобное состояние, характеризующееся выраженным поведенческим дефицитом в открытом поле.

4. Двухнедельная алкоголизация оказывает депрессогенный эффект на самцов с исходно низким и средним уровнем депрессивности в тесте Порсолта, на что указывает увеличение суммарного времени неподвижности в 7,4 и 3,8 раза соответственно и числа замираний в 3-4 раза у животных этих подгрупп. Последующее введение блокатора ауторецепторов дофамина сульпирида скорректировало эффект алкоголизации на показатели депрессивности в тесте Порсолта.

5. Введение этанола в течение 14 сут приводит к значительному (в 2-3,5 раза) росту эмоциональности не зависимо от исходного уровня депрессивности крыс, что полностью корректируется последующим введением сульпирида у высокодепрессивных самцов и приводит к частичному снижению проявлений эмоциональности у низко- и среднедепрессивных животных.

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

## Литература

1. Пивоварчик М.В. Участие опиоидной и дофаминовой систем мозга в реализации аддиктивных свойств этанола. *Журнал ГГМУ*. 2003; 4: 3-6.
2. Тюренков И.Н., Воронков А.В., Бородкина Л.Е. Влияние фенибуты на поведение животных в условиях добровольной хронической алкоголизации. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2005; 68(3): 42-5.
3. Тригуб М.М., Богданова Н.Г., Колпаков А.А., Башкатова В.Г., Судаков С.К. Влияние агонистов опиоидных рецепторов периферического действия на депрессивный эффект этанола. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013; 156(12): 741-4.
4. Лебедев А.А., Дробленков А.В., Шабанов П.Д. Реакция клеток мезокортиколимбической дофаминергической системы мозга на длительную алкоголизацию у крыс. *Психофармакология и биологическая наркология*. 2008; 8(3-4): 2453-6.
5. Кондашевская М.В., Мхитаров В.А. Морфофункциональные нарушения аденогипофиза и мужских половых желез при алкоголизме (обзор литературы). *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2012; 2: 66-73.
6. Голоенко И.М., Даниленко Н.Г., Копытов А.В., Синявская М.Г. Генетические факторы предрасположенности к алкоголизму. *Здравоохранение*. 2010; 8: 25-8.
7. Фисенко В.П., ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.; Минздрав РФ, ЗАО «ИИА „Ремедиум»»; 2000.
8. Kudryavtseva N.N., Bakshtanovskaya I.V., Avgustinovich D.F., Koryakina L.A., Serova L.I., Wishnivetskaya G.B., et al. *Social defeats*,

- depression and anxiety: an experimental model. Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics SD RAS, 1995.
9. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*. М.; Медицина, 1991.
  10. Амикишиева А.В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование. *Вестник ВОГиС*. 2009; 13 (3): 529-42.
  11. Сергутина А.В., Герштейн Л.М. Влияние L-ДОФА на мозг в зависимости от индивидуальной особенностей поведения. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2004; 12: 56-9.
  12. Шалыпина В.Г., Вершинина Е.А., Ракицкая В.В. Изменение приспособительного поведения активных и пассивных крыс вистар в водно-иммерсионной модели депрессии. *Журнал ВНД им. И.П. Павлова*. 2006; 4: 543-7.
  13. Сапронов Н.С., Федотова Ю.О. Влияние L-триптофана на условный рефлекс активного избегания у крыс-самцов с повышенным уровнем тестостерона. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2000; 7: 67-9.
  14. Индутный А.В. *Метаболические предпосылки интолерантности к алкоголю в условиях стресса*. Автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. Омск, 1997.
  15. Федотова Ю.О., Фролова Г.А. Эффекты стимуляции и блокирования дофаминовых рецепторов на эмоциональные формы поведения самок крыс. *Физиологический журнал (Киев)*. 2014; 60(6): 41-5.
  16. Судаков К.В., Котов А.В., Перцов С.С. Экспериментальные подходы к индивидуальной медицине: зависимость эффектов фармакологического воздействия от характера поведения животных. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2004; 1: 51-7.
  17. McEwen B.S. Genome and hormones: gender differences in physiology. Invited review: estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J. Appl. Physiol.* 2001; 91: 2785-801.
  18. Исмаилова Х.Ю., Агаев Т.М., Семенова Т.П. *Индивидуальные особенности поведения (моноаминергические механизмы)*. Баку: Нурлан, 2007.
  19. Анохина И.П., Веретинская А.Г., Васильева Г.Н. О единстве биологических механизмов индивидуальной предрасположенности к злоупотреблению различными психоактивными веществами. *Физиология человека*. 2000; 26(6): 74-81.
  20. Доведова Е.Л., Монакова М.Ю. Особенности метаболизма нейромедиаторов в корково-подкорковых структурах мозга крыс, различающихся по поведенческим характеристикам. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2000; 130(9): 289-91.
  21. Сметанин В.А., Бардинова Ж.С., Петрушова О.П., Генгин М.Т. Влияние этанола на уровень нейропептидов в организме. *Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского*. 2008; 10(14): 49-53.
  22. Пурсанов К.А., Хомутов А.Е., Слободенюк В.С., Бочкарева А.В. Влияние гепарина на гиподинамию крыс, вызванную этиловым спиртом. *Медицинский альманах*. 2009; 1(6): 127-8.
  23. Пахомова А.О., Коваленко О.А., Говоруха Т.М., Бабан В.М., Макачук Н.Е. Изменение поведенческих реакций и липоперекисных процессов в ткани печени у Остро алкоголизованных крыс при введении кверцетина в течение 14 суток. *Физика животного*. 2008; 16(1): 105-10.
  24. Спасов А.А., Петров В.И., Иёжица И.Н., Онищенко Н.В., Чурбакова Н.В., Паршев В.В. Изучение фармакологической активности комплексного магнийсодержащего препарата на основе минерала бишофит и пиридоксина гидрохлорида на модели длительной алкоголизации крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2003; 66(5): 40-4.
  25. Zanettini C., Panlilio L.V., Allicki M. et al. Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front. Behav. Neurosci.* 2011; 5(57): 1-21.
  26. Беспалов А.Ю., Звартау Э.Э. *Нейропсихофармакология антагонистов NMDA-рецепторов*. СПб.; Невский диалект, 2000.
  27. Johnson S. The multifaceted and widespread pathology of magnesium deficiency. *Med. Hypotheses*. 2001; 56(2): 163-70.
  28. Анохина И.П. *Некоторые биологические механизмы индивидуальной чувствительности к психоактивным веществам. Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам. 4-я междунар. конф.* М.; 2006.
  29. Шабанов П.Д. *Основы наркологии*. СПб; Лань, 2002.
  30. Шабанов П.Д. *Психофармакология*. СПб; Элби-СПб, 2008.
  31. Семке В.Я., Мельникова Т.Н., Бохан Н.А. Нейробиологические механизмы алкоголизма. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2002; 102(8): 61-6.
  32. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Павленко В.П. Влияние пептидов, вводимых в центральное ядро миндалины, на самостимуляцию латерального гипоталамуса у крыс при хронической алкоголизации. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2006; 69(5): 44-9.
  33. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Русановский В.В., Воеводин Е.Е., Павленко В.П., Яковлева О.А. Модуляция пептидами самостимуляции латерального гипоталамуса у крыс при хронической алкоголизации. *Наркология*. 2006; 3: 36-41.
  34. Nikolaev S.V., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Oblyapin A.V., Dambinova S.A., Shabanov P.D. The effect of substance P after central administration on the activity of the mesolimbic system of the rat brain as studied by microdialysis. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2004; 34(7): 743-6.
  35. Ogilvie K.M., Rivier C. Gender difference in alcohol-evoked hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat: ontogeny and role of neonatal steroids. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1996; 20(2): 255-61.

## References

1. Pivovarchik M.V. Participation of opioid and dopamine systems of the brain in the implementation of the addictive properties of ethanol. *Zhurnal GGMU*. 2003; 4: 3-6. (In Russian)
2. Tyurenkov I.N., Voronkov A.V., Borodkina L.E. Effect of phenibut on the behavior of experimental animals under conditions of voluntary chronic alcoholism. *Experimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya*. 2005; 68(3): 42-5. (In Russian)
3. Trigub M.M., Bogdanova N.G., Kolpakov A.A., Bashkatova V.G., Sudakov S.A., Shabanov P.D. The influence of agonists of opioid receptors in peripheral actions on the depressive effect of ethanol. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny*. 2013; 156(12): 741-4. (In Russian)
4. Lebedev A.A., Droblenkov A.V., Shabanov P.D. Cell Reaction of the Brain Mesocorticolimbic Dopaminergic System on Chronic Alcoholization in Rats. *Psychopharmacol Biol. Narcol.* 2008; 8(3-4): 2453-6. (In Russian)
5. Kondashevskaya M.V., Mkhitarov V.A. Impaired structure and function of adenylophosphatase and male gonads under the conditions of alcoholism (review). *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya*. 2012; 2: 66-73. (In Russian)
6. Goloenko I.M., Danilenko N.G., Kopytov A.V., Sinyavskaya M.G. Genetic factors of alcohol abuse predisposition. *Zdravoohranenie*. 2010; 8: 25-8. (In Russian)
7. Fisenko V.P., eds. *Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*. [Rukovodstvo po eksperimentalnomu

- (*doklinicheskomu*) *izucheniyu novikh farmakologicheskikh veshchestv*. Moscow; Minzdrav RF, ZAO «IIA «Remedium»; 2000. (In Russian)
8. Kudryavtseva N.N., Bakshtanovskaya I.V., Avgustinovich D.F., Koryakina L.A., Serova L.I., Wishnivetskaya G.B., et al. *Social defeats, depression and anxiety: an experimental model*. Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics SD RAS, 1995.
  9. Buresh Ya., Bureshova O., Hyuston D.P. Methods and basic experiments to study the brain and behavior. [*Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniu mozga i povedeniya*]. Moscow; Meditsina, 1991. (In Russian)
  10. Amikishieva A.V. Behavioral phenotyping: up-to-date methods and equipment. *Vestnik VOGiS*. 2009; 13(3): 529-42. (In Russian)
  11. Sergutina A.V., Gershtein L.M. The effects of L-DOPA on the brain depending on the individual characteristics of behavior. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2004; 12: 56-9. (In Russian)
  12. Shalyapina V.G., Verzhinina E.A., Rakitskaya V.V., Rizhova L.Yu. Alteration of Active and Passive Wistar Rats Adaptive Behavior in Water-Immersion Model of Depression. *I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2006; 4: 543-7. (In Russian)
  13. Sapronov N.S., Fedotova Yu.O. Effect of L-tryptophan on active avoidance response in male rats with increased testosterone level. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny*. 2000; 7: 67-9. (In Russian)
  14. Indutnyy A.V. The metabolic background of intolerance to alcohol under stress. Abstract. Diss. on competition of a scientific degree Cand. honey. sciences'. [*Metabolicheskie predisposylki intolerantnosti k alkogolyu v usloviyakh stressa*. Avtoref. diss. na soiskanie uchenoy stepeni kandidata meditsinskikh nauk]. Omsk, 1997. (In Russian)
  15. Fedotova Yu.O., Frolova G.A. Effects and quinperole and sulphiride on emotional behaviors in female rats. *Fiziologicheskij zhurnal* (Kiev). 2014; 60(6): 41-5. (In Russian)
  16. Sudakov K.V., Kotov A.V., Pertcov S.S. Experimental approaches to personalized medicine: the dependence of the effects of pharmacological exposure to the nature of animal behavior. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2004; 1: 51-7. (In Russian)
  17. McEwen B.S. Genome and hormones: gender differences in physiology. Invited review: estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J. Appl. Physiol.* 2001; 91: 2785-801.
  18. Ismailova H.Yu., Agaev T.M., Semenova T.P. *Individual behaviors (monoaminergic mechanisms)*. [*Individual'nye osobennosti povedeniya (monoaminergicheskie mehanizmy)*]. Baky: Nyrlan, 2007. (In Russian)
  19. Anohina I.P., Veretinskaya A.G., Vasilyeva G.N. The unity of biological mechanisms of individual predisposition to the abuse of various psychoactive substances. *Fiziologiya cheloveka*. 2000; 26(6): 74-81. (In Russian)
  20. Dovedova E.L., Monakova M.Yu. Metabolism of neurotransmitters in cortical and subcortical brain structures in rats with different behavioral characteristics. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny*. 2000; 130(9): 289-91. (In Russian)
  21. Smetanin V.A., Bardinova Zh.S., Petrushova O.P., Gengin M.T. Influence of ethanol on the level of neuropeptides in the organism. *Izv. Penz. gos. pedagog. univ. im. V.G. Belinskogo*. 2008; 10(14): 49-53. (In Russian)
  22. Pursanov K.A., Homutov A.E., Slobodenuk V.S., Bochkareva A.V. Influence of heparin on rats' hypodynamia caused by ethyl alcohol. *Meditsinskiy a'manakh*. 2009; 1(6): 127-8. (In Russian)
  23. Pahomova A.O., Kovalenko O.A., Govoruha T.M., Baban V.M., Markarchuk M.Yu. Change of behavioral reactions and lipopercsation processes in liver in strongly alcoholised rats under introduction of quercetin during 14 days. *Fizika zhivogo*. 2008; 16 (1): 105-10. (In Ukrainian)
  24. Spasov A.A., Petrov V.I. et al. Pharmacological activity of a complex magnesium-containing preparation based on mineral bishofit and pyridoxine hydrochloride studied on the model of chronic alcohol intoxication in rats. *Experimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya*. 2003; 66 (5): 40-4. (In Russian)
  25. Zanettini C., Panlilio L.V., Alicki M. et al. Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front. Behav. Neurosci.* 2011; 5(57): 1-21.
  26. Bespalov A.Yu., Zvartay E.E. *Neuropsychopharmacology of NMDA receptor antagonists [Neyropsikhofarmakologiya antagonistov NMDA-receptorov]*. Saint-Petersburg; Nevsky dialect, 2000. (In Russian)
  27. Johnson S. The multifaceted and widespread pathology of magnesium deficiency. *Med. Hypotheses*. 2001; 56(2): 163-70.
  28. Anohina I.P. *Some biological mechanisms of individual sensitivity to psychoactive substances. Biological basis of individual sensitivity to psychotropic drugs. 4th international. Conf. M., [Nekotorye biologicheskie mekhanizmy individual'noy chuvstvitel'nosti k psikhooaktivnym veshhestvam]*. 4th Intern. Conf. Moxcow; 2006. (In Russian)
  29. Shabanov P.D. *The basics of addiction medicine [Osnovy narkologii]*. St. Petersburg, Lan, 2002. (In Russian)
  30. Shabanov P.D. *Psychopharmacology [Psikhofarmakologiya]*. St. Petersburg; Elsbi-StP, 2008. (In Russian)
  31. Semke V.Ya., Melnikova T.N., Bohan N.A. Neurobiological mechanisms of alcoholism. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2002; 102 (8): 61-6. (In Russian)
  32. Shabanov P.D., Lebedev A.A., Pavlenko V.P. Effect of peptides introduced into the central nucleus of amygdala on the hypothalamic self-stimulation in chronically alcoholized rats. *Experimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya*. 2006; 69(5): 44-9. (In Russian)
  33. Shabanov P.D., Lebedev A.A., Rusanovsky V.V. et al. Neuropeptides modulate hypothalamic self-stimulation in chronically alcoholized rats. *Narkologiya*. 2006; 3: 36-41. (In Russian)
  34. Nikolaev S.V., Lebedev A.A., Bychkov E.R. et al. The effect of substance P after central administration on the activity of the mesolimbic system of the rat brain as studied by microdialysis. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2004; 34(7): 743-6.
  35. Ogilvie K.M., Rivier C. Gender difference in alcohol-evoked hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat: ontogeny and role of neonatal steroids. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1996; 20(2): 255-61.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.8:599.323.4

Карпова М.Н., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Кукушкин М.Л.

## Влияние ипидакрина на острую боль и развитие невропатического болевого синдрома у крыс линии Вистар

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

**Цель** исследования - изучение особенностей действия ипидакрина («Ипигрикс» Эйч Би Эм Фарма с.р.о., Словакия) на острую боль и динамику развития невропатического болевого синдрома у крыс линии Вистар.

**Методика.** Проведено 2 серии опытов. В 1-й серии влияние ипидакрина изучали на моделях острой боли. Пороги болевой чувствительности определяли до внутримышечного введения ипидакрина (0,5 и 1 мг/кг), а также через 30 и 60 мин после введения. Оценку изменения индивидуальной болевой чувствительности у животных проводили с помощью 2 стандартных тестов: «Tail flick» и «Hot plate». Во 2-й серии изучали влияние ипидакрина на развитие невропатического болевого синдрома, который воспроизводили перерезкой опытным и контрольным животным левого седалищного нерва на уровне подколенной ямки. Интенсивность невропатического болевого синдрома у животных оценивали в баллах по выраженности аутономии на оперированной конечности, времени появления аутономий и количеству животных с аутономией. Внутримышечное введение ипидакрина осуществляли ежедневно (1 мг/кг) в течение 20 сут.

**Результаты.** Введение ипидакрина (0,5 мг/кг) не оказывает антиноцицептивного действия: порог болевой чувствительности не менялся по тестам «Tail flick» и «Hot plate». Введение ипидакрина (1 мг/кг) за 30 мин до тестирования также не влияло на порог болевой чувствительности по тестам «Tail flick» и «Hot plate», а через 60 мин после введения ипидакрина порог болевой чувствительности увеличился на 15,8 % (\* $p=0,033$ ) по тесту «Tail flick» по сравнению с показателем до введения препарата.

**Заключение.** Ипидакрин значительно задерживал развитие невропатического болевого синдрома НБС, но не оказывал влияния на острую боль в тестах «Tail flick» и «Hot plate».

**Ключевые слова:** ипидакрин, острая боль, порог болевой чувствительности, невропатический болевой синдром, болевая чувствительность, аутономии, крысы.

**Для цитирования:** Карпова М.Н., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Кукушкин М.Л. Влияние ипидакрина на острую боль и развитие невропатического болевого синдрома у крыс линии Вистар. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 29-33.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.29-33

**Для корреспонденции:** Карпова Маргарита Николаевна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП, e-mail: karpovamn@gmail.com

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

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

Поступила 21.03.2019

Карпова М.Н., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Kukushkin M.L.

### Effect of ipidacrine on acute pain and development of neuropathic pain syndrome in wistar rats

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

**The aim** of the study was to elucidate specific features of the effect of ipidacrine (IPIGRIS, Slovakia) on acute pain and development of neuropathic pain syndrome (NPS) in Wistar rats.

**Methods.** Two series of experiments were performed. In the first series, effects of ipidacrine were studied on models of acute pain. Thresholds of pain sensitivity (PS) were determined before and 30 and 60 min after ipidacrine injection (0.5 and 1 mg/kg, i.m.). Changes in individual pain sensitivity were assessed with two standard tests, tail flick and hot plate. In the second series of experiments, the effect of ipidacrine on the development of NPS was studied. NPS was induced by transection of the left sciatic nerve at the level of popliteal fossa in experimental and control animals. The NPS intensity was evaluated in scores based on severity of autotomy on the operated extremity, time of autotomy emergence, and number of animals with autotomy. Ipidacrine (1 mg/kg, i.m.) was injected daily for 21 days.

**Results.** Ipidacrine at a dose of 0.5 mg/kg did not exert an antinociceptive effect – the PS threshold did not change in the tail flick and hot plate tests. Ipidacrine at a dose of 1 mg/kg 30 min before testing did not affect the PS thresholds in the tail flick and hot

plate tests; at 60 min after the ipidacrine injection, the PS thresholds increased by 15.8% (\* $p = 0.033$ ) in the tail flick test compared to the value before the ipidacrine injection.

**Conclusion.** Ipidacrine significantly delayed the development of NPS but did not affect acute pain in the tail flick and hot plate tests.

**Keywords:** ipidacrine, acute pain, pain threshold, neuropathic pain syndrome, pain sensitivity, autotomy, rats.

**For citation:** Karpova M.N., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Kukushkin M.L. Effect of ipidacrine on acute pain and development of neuropathic pain syndrome in Wistar rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63 (2): 29-33. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 29-33

**For correspondence:** *Karpova M.N.*, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Laboratory of fundamental and applied problems of pain FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», e-mail: karpovamn@gmail.com

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

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

**Information about authors:**

Karpova M.N., <http://orcid.org/0000-0002-4338-5567>

**Received** 21.03.2019

## Введение

Боль относится к значимым медико-социальным проблемам, поскольку существенно изменяет поведение человека. Острая и хроническая боль приводит к различным нарушениям основных систем организма, нарушает процессы регуляции разных видов чувствительности и формирует особый тип болевого поведения. Несмотря на значительный прорыв в изучении механизмов боли, распространенность болевых синдромов в общей структуре заболеваемости продолжает расти. Частота встречаемости различных болевых синдромов по данным эпидемиологических исследований среди населения развитых стран составляет от 30 до 80%.

Эффективность лечения при терапии болевого синдрома во многом зависит от выбора терапевтических средств. Пациенты, страдающие хронической болью часто не получают полного обезболивания. Современные методы лечения невропатической боли часто неэффективны и/или вызывают серьезные побочные эффекты. Невропатическая боль является наиболее частой причиной инвалидизации и значительного ухудшения качества жизни больных. Поэтому актуален поиск и изучение механизма действия новых и уже имеющихся лекарственных средств, обладающих поликомпонентным спектром фармакологических эффектов и многофакторным механизмом действия.

Показано, что активация холинергической системы различными холинергическими агонистами и антихолинэстеразными агентами индуцирует антиноцицепцию у лабораторных животных [1–3]. Для лечения пациентов с поражениями периферической нервной системы, сопровождающимися периферическими парезами и болевыми синдромами, применяются ингибиторы ацетилхолинэстеразы [4, 5]. Одним из представителей этого класса препаратов является ипидакрин - обратимый ингибитор ацетилхолинэстеразы, вызывающий увеличе-

ние содержания ацетилхолина в синаптической щели и блокаду калиевых каналов, точкой приложения которого являются в первую очередь эфферентные (двигательные) волокна периферических нервов. Однако преимущественное влияние препарата на ноцицептивный и невропатический компоненты боли остается недостаточно изученными. Вопросы преимущественного его влияния на ноцицептивный и невропатический компоненты боли, терапевтического эффекта, способности потенцировать действие других лекарственных средств, применяемых с целью купирования болевого синдрома до настоящего времени не решены полностью.

**Цель** исследования – изучение особенностей действия ипидакрина («Ипигрикс» Эйч Би Эм Фарма с.р.о.) на острую боль и динамику развития невропатического болевого синдрома (НБС) у крыс линии Вистар.

## Методика

Эксперименты выполнены на взрослых крысах самцах линии Вистар ( $n=61$ ) с исходной массой 160-200 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, и Межгосударственными стандартами ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», соответствующими Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123, Страсбург, 18 марта 1986 г. с приложением от 15.06.2006, требованиями Международной ассоциации по изучению боли и Директивы Совета европейского сообщества (86/609/ЕЕС). Исследования проводили под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП».

Проведено 2 серии опытов. В 1-й серии изучали влияние ипидакрина («Ипидрикс» Эйч Би Эм Фарма с. р. о.) на моделях острой боли. Оценку изменения индивидуальной болевой чувствительности у животных проводили с помощью 2 стандартных тестов: «Tail flick» и «Hot plate». Пороги болевой чувствительности (ПБЧ) определяли до внутримышечного введения ипидакрина (0,5 и 1 мг/кг), а также через 30 и 60 мин после введения. Тест отдергивания хвоста (воздействие фокусированного теплового луча) «Tail flick» позволяет оценить особенности регуляции болевой чувствительности на уровне сегментарных отделов спинного мозга. Измерение ПБЧ проводили при помощи прибора «Ugo Basile» (Италия), позволяющего подавать сфокусированный пучок света на хвост животного и фиксировать время появления болевой реакции (латентный период) по отведению хвоста животного. Оценка болевой чувствительности с помощью теста горячей пластины «Hot plate» используется для определения особенностей регуляции болевой чувствительности на уровне центральных структур мозга. Измерение ПБЧ проводили при помощи прибора «TSE Systems» (Германия), позволяющего регулировать нагрев пластины и фиксировать время появления признаков болевого поведения (облизывание лап или подпрыгивание). Величина ПБЧ измерялась в секундах по времени отведения хвоста в «Tail flick» или по времени появления болевого поведения животного, находящегося на нагретой до 55°C металлической пластине в «Hot plate».

Во 2-й серии ( $n=16$ ) изучали влияние внутримышечного введения ипидакрина на динамику развития НБС у животных. НБС воспроизводили путем перерезки опытным и контрольным животным левого седалищного нерва на уровне подколенной ямки под эфирным наркозом по общепринятой методике [6]. Первая инъекция ипидакрина (1 мг/кг) в правую бедренную мышцу была произведена через 1 ч после операции. Далее препарат вводили ежедневно в течение 20 сут. Контрольным животным в аналогичных условиях в том же объеме вводили физиологический раствор. Тяжесть болевого синдрома на оперированной конечности оценивали в течение 27 сут после операции по специализированной шкале для оценки выраженности аутономии. Оценивалась степень поражения когтей, фаланг стопы оперированной лапы [7], а также время появления аутономии и количество животных с аутономией. Ежедневно перед введением препаратов регистрировали массу тела контрольных и экспериментальных животных.

Статистическую обработку данных осуществляли по алгоритмам программы «Statistica 8.0». Оценку значимости показателей и различий рассматриваемых выборок проводили по U-критерию Манна-Уитни. Ча-

стоту встречаемости признака оценивали с помощью точного метода Фишера. В качестве средневыборочной характеристики использовали медиану (Me), первый и третий квартили (Q1; Q3). Статистически значимыми считали различия между группами при  $p<0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Данные по изменению порога болевой чувствительности после системного введения ипидакрина представлены в **таблице**. В 1 серии экспериментов у контрольных животных чувствительность к боли до и после введения физиологического раствора была одинаковой.

Как видно из **таблицы**, введение ипидакрина в дозе 0,5 мг/кг не оказывало антиноцицептивного действия: ПБЧ по тестам «Tail flick» и «Hot plate» существенно не менялся. Увеличение дозы до 1 мг/кг не оказывало существенного антиноцицептивного действия по тесту «Hot plate». Однако в тесте «Tail flick» через 60 мин после введения ипидакрина ПБЧ был статистически значимо выше (на 15,8 %) по сравнению с показателями до введения препаратов.

Во 2-й серии изучение динамики развития болевого синдрома показало, что у контрольных животных ( $n=8$ ) с введением физиологического раствора аутономии появились на 3-и сут после операции (**рис. А**). Количество животных с аутономией составило – 50% (у 4 из 8), а выраженность аутономии – 1,5 (1; 2) балла. У животных опытной группы с введением ипидакрина ( $n=8$ ) аутономии появились у 1 из 8 животных (12,5%;  $p=0,025$ ) на 13-е сут после операции, т.е. на 10 сут позднее, чем в контроле (**рис. А**), а выраженность аутономии составила 2 балла.

На 21-е сут после операции (через 1 сут после отмены препаратов) в контрольной группе аутономия отмечалась у 6 из 8 животных (75%), а выраженность аутономии составила 2 (1;3) балла. Количество животных с аутономией в опытной группе осталось прежним и составило 12,5 % (у 1 из 8 крыс;  $p=0,025$ ), а выраженность аутономии – 1 балл. На 27-е сут после операции количество животных с аутономией в группе контроля осталось прежним. У животных опытной группы количество животных с аутономией выросло до 50% (у 5 из 8) с выраженностью аутономии 2 (1;3) балла.

Различия между опытными и контрольными животными проявлялось и в динамике изменения массы тела (**рис. Б**). В группе животных с введением ипидакрина на протяжении 2 нед ежедневного наблюдения прослеживалась тенденция в задержке увеличения массы тела. Статистически значимые межгрупповые различия по этому показателю были выявлены на 3-й нед наблюдения. После отмены введения ипидакрина (с

21 по 27 сут) не наблюдалось статистически значимых различий в приросте массы тела между группами, но тенденция в отставании увеличения массы тела в опытной группе сохранялась.

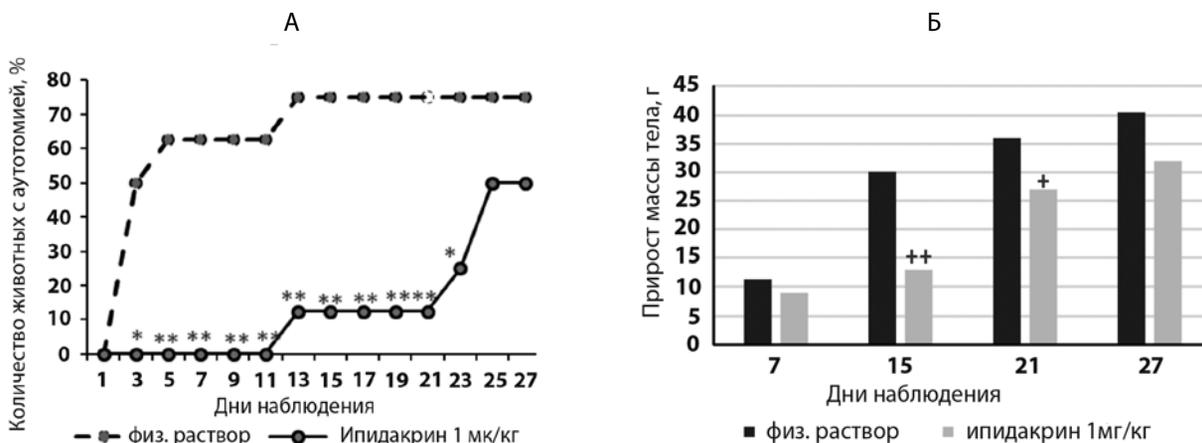
Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ипидакрин при однократном введении не оказывал влияния на острую боль в тестах «Tail flick» и «Hot plate», но значительно задерживал развитие НБС у животных при длительном ежедневном введением ипидакрина. Эти животные оказались более устойчивыми к развитию НБС: аутономии появились на 10 сут позднее, чем в контроле и только у 1 животного, тогда как в контроле аутономии были обнаружены на 3-и сут наблюдения у половины животных (у 4 из 8). Через 3 сут после окончания введения ипидакрина в опытной группе число животных с аутономиями выросло до 25% (у 2 из 8); и к концу эксперимента через 5 сут после окончания введения препарата достигло 50%, а в контрольной группе число животных с аутономиями не изменилось и составило 75%.

Невропатическая боль – это боль, которая вызывается первичным поражением или повреждением центральной или периферической нервной системы. Невропатическая боль может проявляться как самостоятельный синдром, а также являться сопутствующим фактором целого ряда заболеваний. Ипидакрин является обратимым ингибитором холинэстеразы и оказывает свойственные препаратам этой группы фармакологические эффекты. От обычных ингибиторов холинэстеразы он отличается тем, что одновременно стимулирует непосредственно проведение возбуждения в нервных волокнах и синаптическую передачу в нервно-мышечных окончаниях, что связано с блокадой калиевых каналов возбудимых мембран. Ипидакрин представляет собой эффективный препарат в комплексном лечении заболеваний как центральной, так и периферической нервной системы. Результаты клинических исследований свидетельствуют о том, что назначение ипидакрина в составе комплексной медикаментозной терапии, лечебной гимнастики и физи-

**Изменение порогов болевой чувствительности после системного введения ипидакрина (Me; (Q1; Q3))**

Группы и число (n) животных	Порог болевой чувствительности до введения препарата		Порог болевой чувствительности после введения препарата			
			30 мин		60 мин	
	Tail flick (с)	Hot plate (с)	Tail flick (с)	Hot plate (с)	Tail flick (с)	Hot plate (с)
1 – контроль, физ. р-р n=12	4,15 (3,5; 4,6)	6,20 (4,0; 10,0)	4,35 (3,4; 5,6)	7,50 (5,3; 10,5)	3,50 (3,0; 4,0)	6,10 (4,0; 9,1)
2 – ипидакрин 0,5 мг/кг n= 11	3,70 (3,3; 4,8)	8,0 (5,8; 9,5)	3,50 (3,4; 5,8)	7,40 (6,0; 11,1)	4,20 (3,7; 4,5)	8,20 (6,0; 10)
3 – ипидакрин 1 мг/кг n=10	3,80 (3,5; 3,9)	9,85 (8; 10,5)	4,0 (3,4; 4,5)	8,10 (7,4; 13,6)	4,40 (3,8; 5,4)**	8,25 (4,6; 11,4)

**Примечание.** \*p=0,033 – по сравнению с соответствующими показателями до введения препаратов; \*p=0,024 – по сравнению с группой контрольных животных.



Динамика развития невропатического болевого синдрома у крыс на фоне введения ипидакрина и физиологического раствора. А — оцениваемая по количеству животных с аутономией конечности. Б — Динамика изменения массы тела (в граммах) животных контрольной и опытной групп.

\*p=0,05; \*\*p=0,025; + p=0,013; ++p=0,007 - по сравнению с контрольными животными.

отерапевтических процедур не только повышает активность нервно-мышечной передачи, но и оказывает противоболевой эффект и, в некоторых случаях, по эффективности не уступает НПВС [8, 9]. Анальгетический эффект препарата частично можно связать с тем, что он блокирует проницаемость мембраны для натрия [9, 10]. Подтверждением этому служит тот факт, что в основе анальгетического действия некоторых современных противоэпилептических препаратов лежит блокада потенциалзависимых натриевых каналов [10].

### Литература

1. Hamurtekin E., Gurun M.S. The antinociceptive effects of centrally administered CDP-choline on acute pain models in rats: the involvement of cholinergic system. *Brain Res.* 2006; 1117: 92–100. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.07.118
2. Rowley T.J., McKinstry A., Greenidge E., Smith W., Flood P., Antinociceptive and anti-inflammatory effects of choline in a mouse model of postoperative pain. *Br J Anaesth.* 2010; 105 (2): 201–7. DOI: 10.1093/bja/aeq113
3. Gurun M.S., Parker R., Eisenach J.C., Vincler M. The effect of peripherally administered CDP-choline in an acute inflammatory pain model: the role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Anesth Analg.* 2009; 108: 1680–7. DOI: 10.1213/ane.0b013e31819dcd08
4. Строков И.А., Захарова В.В., Головачева В.А., Брад Т.Я. Активация холинэргической иннервации заболеваний периферической и центральной нервной системы. *Неврологический журнал.* 2013; 6: 91–100.
5. Камчатнов П.Р., Дзугаева Ф.К., Чугунов А.В., Казаков А.Ю. Применение ипидакрина у пациентов с заболеваниями периферической нервной системы. *Неврология и ревматология. Приложение к журналу Consilium Medicum.* 2018; 1: 36–40. DOI: 10.26442/2414357X.2018.2.180097
6. Кукушкин М.Л., Смирнова В.С. Значение функционального состояния седалищного нерва в момент его перерезки для последующего развития болевого синдрома у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 1993; 1: 7–8.
7. Осипов А.В., Кукушкин М.Л. Влияние стресса на развитие деafferентационного болевого синдрома у крыс после перерезки седалищного нерва. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1993; 115(5): 471–3.
8. Бойко А.Н., Батышева Т.Т., Зайцев К.А. и др. Применение препарата аксамон в комплексной реабилитации больных с двигательными нарушениями при патологии поясничного отдела позвоночника. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.* 2008; 9: 45–7.

### Сведения об авторах:

**Карпова Маргарита Николаевна**, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП;

**Кузнецова Лада Владимировна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП;

**Клишина Наталья Юрьевна**, науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП;

**Кукушкин Михаил Львович**, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП.

9. Авакян Г.Н., Авакян Г.Г. Клинико-электронейромиографическое исследование эффективности ипидакрина у пациентов с мононевропатиями. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.* 2015; 9: 17–22. DOI: 10.17116/jnevro20151159117-22
10. Smith E. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *J Neurol.* 2018; 265: 231–8. DOI: 10.1007/s00415-017-8641-6.

### References

1. Hamurtekin E., Gurun M.S. The antinociceptive effects of centrally administered CDP-choline on acute pain models in rats: the involvement of cholinergic system. *Brain Res.* 2006; 1117: 92–100. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.07.118.
2. Rowley T.J., McKinstry A., Greenidge E., Smith W., Flood P., Antinociceptive and anti-inflammatory effects of choline in a mouse model of postoperative pain. *Br J Anaesth.* 2010; 105 (2): 201–7. DOI: 10.1093/bja/aeq113.
3. Gurun M.S., Parker R., Eisenach J.C., Vincler M. The effect of peripherally administered CDP-choline in an acute inflammatory pain model: the role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Anesth Analg.* 2009; 108: 1680–7. DOI: 10.1213/ane.0b013e31819dcd08
4. Strokov I.A., Zakharova V.V., Golovacheva V.A., Brad T.Ya. The activation of the cholinergic innervation in the treatment of diseases of the peripheral and central nervous system. *Neurologicheskiy zhurnal.* 2013; 6: 91–100. (in Russian)
5. Kamchatnov P.R., Dzugaeva F.K., Chugunov A.V., Kazakov A.Yu. Use of ipidacrine in patients with peripheral nervous system diseases. *Neurologiya i revmatologiya. Prilozhenie k zhurnalul Consilium Medicum.* 2018; 12(1): 44–8. (in Russian)
6. Kukushkin M.L., Smirnova V.S. The value of the functional state of the sciatic nerve at the time of its transection for the subsequent development of pain in rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 1993; 1: 7–8. (in Russian)
7. Osipov A.V., Kukushkin M.L. The effect of stress on the development of deafferentation pain syndrome in rats after transection of the sciatic nerve. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 1993; 115(5): 471–3. (in Russian)
8. Boyko A.N., Batysheva T.T., Zaytsev K.A. i dr. The use of axamon in the complex rehabilitation of neurological patients with movement disorders in the pathology of lumbar spine. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova.* 2008; 9: 45–7. (in Russian)
9. Avakyan G.N., Avakyan G.G. A clinical-electroneuromyographic study of the efficacy of ipidacrine in patients with mononeuropathies. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova.* 2015; 9: 17–22. DOI: 10.17116/jnevro20151159117-22. (in Russian)
10. Smith E. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *J Neurol.* 2018; 265: 231–8. DOI: 10.1007/s00415-017-8641-6.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Будникова О.В.<sup>1</sup>, Афанасьев С.А.<sup>1</sup>, Кондратьева Д.С.<sup>1</sup>, Ворожцова И.Н.<sup>1,2</sup>, Ахмедов Ш.Д.<sup>1</sup>, Шипулин В.М.<sup>1</sup>

## Взаимосвязь уровня гликированного гемоглобина с ритмоинотропной реакцией миокарда больных с ишемической болезнью сердца, ассоциированной с сахарным диабетом 2 типа

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634012, г. Томск, Россия, ул. Киевская, д. 111а;

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

**Введение.** При сахарном диабете 2 типа повышается риск возникновения нарушений ритма сердца. Вместе с тем, каково значение высокого уровня гипергликемии в изменении возбудимости и нарушении внутриклеточного транспорта ионов кальция кардиомиоцитов недостаточно изучено. **Цель.** Изучить взаимосвязь уровня гликированного гемоглобина и ритмоинотропной реакцией миокарда больных с ишемической болезнью сердца, ассоциированной с сахарным диабетом.

**Методика.** Работа выполнена на изолированных трабекулах, выделенных из ушек правого предсердия пациентов во время операции коронарного шунтирования. Уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) определяли в крови пациентов, взятой до проведения операции. Исследовали инотропную реакцию изолированных трабекул пациентов на экстрасистолические воздействия, оказываемые через 0,2—1,5 с от начала регулярного сокращения в условиях стимуляции с частотой 0,5 Гц.

**Результаты.** Обнаружено, что в исследуемой когорте пациентов клинко-анамнестические показатели были сходны, кроме значений уровня HbA1c. Оказалось, что у пациентов с HbA1c >8% возбудимость миокарда была выше по сравнению с аналогичными параметрами пациентов с уровнем гликированного гемоглобина ниже 8%.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что у пациентов с уровнем гликированного гемоглобина ниже 8%, сарколеммальная мембрана кардиомиоцитов более электрически стабильна, чем у пациентов с уровнем гликированного гемоглобина выше 8%.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2 типа; ишемическая болезнь сердца; гликированный гемоглобин.

**Для цитирования:** Будникова О.В., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С., Ворожцова И.Н., Ахмедов Ш.Д., Шипулин В.М. Взаимосвязь уровня гликированного гемоглобина с ритмоинотропной реакцией миокарда больных с ишемической болезнью сердца, ассоциированной с сахарным диабетом 2 типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 34-40.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 34-40

**Для корреспонденции:** Будникова Олеся Викторовна, аспирант лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, e-mail: budnikovaolesya@mail.ru

**Финансирование.** Результаты электрофизиологических исследований получены при поддержке гранта РФФИ № 17-04-01450. Остальные исследования проведены в рамках выполнения фундаментальной темы №АААА-А15-115123110026-3 НИИ кардиологии.

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

**Поступила** 21.07.2018

Budnikova O.V.<sup>1</sup>, Afanasyev S.A.<sup>1</sup>, Kondratieva D.S.<sup>1</sup>, Vorozhtsova I.N.<sup>1,2</sup>, Akhmedov S.D.<sup>1</sup>, Shipulin V.M.<sup>1</sup>

## Relationship of glycated hemoglobin with the rhythm-inotropic myocardial response in patients with ischemic heart disease associated with type 2 diabetes mellitus

<sup>1</sup> Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Kievskaya Str. 111a, Tomsk 634012, Russian Federation;

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

The risk of heart rhythm disturbance increases in type 2 diabetes mellitus. However, significance of high hyperglycemia for altered excitability and disordered intracellular calcium transport in cardiomyocytes has not been adequately studied.

**Aim.** To study the relationship between the level of glycated hemoglobin and the rhythm-inotropic myocardial response of patients with coronary heart disease associated with type 2 diabetes mellitus.

**Methods.** The study was performed on isolated trabeculae from right atrium appendages obtained from patients during a coronary artery bypass surgery. The concentration of glycosylated hemoglobin (HbA1c) was measured in blood withdrawn before the operation. The inotropic response of isolated trabeculae to an extrasystole-inducing stimulus was studied. The stimulus was applied at 0.2-1.5 s after the onset of regular contractions under stimulation at a frequency of 0.5 Hz.

**Results.** In the studied cohort, clinical and anamnestic indices were similar except for the HbA1c concentration. Myocardial excitability was higher in patients with HbA1c >8% than in patients with HbA1c <8%.

**Conclusion.** In patients with HbA1c <8%, the cardiomyocyte sarcolemma membrane was electrically more stable than in patients with HbA1c >8%.

**Keywords:** type 2 diabetes; ischemic heart disease glycosylated hemoglobin.

**For citation:** Budnikova O.V., Afanasyev S.A., Kondratieva D.S., Vorozhtsova I.N., Akhmedov S.D., Shipulin V.M. Relationship of glycosylated hemoglobin with the rhythm-inotropic myocardial response in patients with ischemic heart disease associated with type 2 diabetes mellitus. *Patologicheskaya Fiziologiyai Eksperimental' nayaterapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 34-40. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 34-40

**For correspondence:** *Budnikova Olesya V*, Postgraduate Student, Laboratory of Molecular Cell Pathology and Genetic Diagnostics, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, e-mail: budnikovaolesya@mail.ru

**Acknowledgments.** The electrophysiological studies were supported by the RFBR grant # 17-04-01450. The rest of the studies were carried out as a part of the Basic Topic # AAAA-A15-115123110026-3 of the Research Institute of Cardiology.

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

**Information about authors:**

Budnikova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5004-1896>

Kondratieva D.S., <https://orcid.org/0000-0002-4004-2497>

Shipulin V.M., <https://orcid.org/0000-0001-9887-8214>

**Received** 21.07.2018

Afanasyev S.A., <https://orcid.org/0000-0001-6066-3998>

Akhmedov S.D., <https://orcid.org/0000-0002-0791-7466>

## Введение

Несмотря на новейшие методы профилактики и лечения ежегодно более 7 млн людей погибает от сердечно-сосудистых катастроф — осложнений ишемической болезни сердца (ИБС) [1]. Отмечено, что риск развития ИБС в 2-4 раза повышается на фоне сахарного диабета 2 типа (СД2) [2]. СД2 индуцирует в миокарде «злой триумвират»: увеличивает риск и частоту миокардиальной ишемии; снижает толерантность миокарда к ишемии-реперфузии и подавляет кардио-защитные механизмы [3]. Ишемическая болезнь сердца нередко заканчивается внезапной смертью от аритмии, среди больных СД2 риск такого исхода возрастает в 2 раза. Центральное место в этом занимает аритмогенное воздействие СД2. Нарушение ритма сердца при сахарном диабете 2 типа связывают с процессами денервации структур сердца. Хроническая гипергликемия и эпизоды преходящей ишемии миокарда оказывают потенцирующий негативный эффект и приводят к повреждению нервных волокон, развитию и прогрессированию диабетической кардионейропатии, которая способствует нарушению ритма [4]. В структуре нарушений ритма у пациентов с СД2 на первом месте стоит суправентрикулярная экстрасистолия, второй по распространенности среди пациентов с коморбидной патологией является желудочковая экс-

трасистолия, затем следует пароксизмальная тахикардия [5]. Выделение наиболее чувствительных предикторов формирования электрической нестабильности миокарда у больных СД2 является приоритетным направлением исследований, нацеленных на улучшение прогноза развития сердечно-сосудистых осложнений у данной категории пациентов.

Клиническими исследованиями доказана зависимость между уровнем гликированного гемоглобина (HbA1c) и сердечно-сосудистыми событиями [6-9]. Считается, что оценка риска возникновения сердечно-сосудистых осложнений в зависимости от уровня HbA1c у больных СД2 должна проводиться индивидуально, с учетом состояния конкретного пациента, реакции его организма на гипогликемическую терапию. При этом целевые значения гликемического контроля для пожилых пациентов должны быть более высокими по сравнению с молодыми, и соответствовать уровню HbA1c 7,5 – 8,0% [2]. Согласно результатам когортных исследований, проведенных в 2010-2014 гг., терапия, направленная на достижение уровня HbA1c ниже 9% не показала значимых преимуществ в предотвращении макрососудистых осложнений [10, 11]. Исходя из этого, в литературе нет четкого представления о целевых уровнях HbA1c для прогностически благоприятного течения коморбидного заболевания. Кроме того, пока не определено при каких значениях уров-

на HbA1c риск развития нарушений сердечного ритма минимален.

Цель исследования — оценка взаимосвязи инотропной реакции миокарда на экстрасистолические воздействия и уровень гликированного гемоглобина при коморбидной патологии ИБС и СД 2 типа.

### Методика

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004). Работа одобрена этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ РАН.

В исследование включено 30 пациентов (6 женщин и 24 мужчин) в возрасте 55-70 лет, поступивших в клинику НИИ кардиологии Томского научно-исследовательского медицинского центра. Критерии включения в исследование: диагноз — ИБС с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) I-III ФК по NYHA в сочетании с СД 2 типа; информированное согласие пациентов на участие в исследовании. Критериями исключения являлись: острые формы ИБС, кетоацидотические состояния; наличие иной клинически значимой сопутствующей патологии (гепатиты и онкопатология). Участники исследования получали стандартную терапию ИБС и СД 2.

Определяли уровень HbA1c турбидиметрическим методом на анализаторе Konelab (Финляндия) коммерческим набором «ThermoFisherScientific» (Финляндия).

Всем пациентам была выполнена операция коронарного шунтирования, во время которой при подключении аппарата искусственного кровообращения иссекли фрагмент ушка правого предсердия. Трабекулы, выделенные из ушка правого предсердия, использовали для исследования контрактильных свойств миокарда. Сразу после иссечения, фрагмент ушка помещали в ледяной раствор Кребса-Хензеляйта, после чего при помощи объектмикрометра из него выделяли мышечные полоски с поперечным сечением 0,5 — 0,7 мм и длиной 5 мм. Подготовленную мышцу помещали в термостабилизированную (36 °C) проточную камеру объемом 1 мл установки для изучения сократительной активности мышечных препаратов (Scientific Instruments GmbH, Германия). Суперфузию мышц осуществляли раствором Кребса-Хензеляйта, для оксигенации которого использовали карбоген (O<sub>2</sub> — 95%, CO<sub>2</sub> — 5%) [12]. Стимуляцию мышц проводили электрическими импульсами прямоугольной формы длительностью 5 мс, подаваемыми с частотой 0,5 Гц на платиновые электроды, расположенные в перфузионной камере. Сократительную активность мышц регистрировали в изометрическом режиме, используя датчик Forcetransducer KG4

(Scientific Instruments GmbH, Германия). Оценивали развиваемое мышцей напряжение в пересчете на площадь её сечения (мН/мм<sup>2</sup>).

Перед началом проведения тестирующих воздействий мышцы адаптировали в течение 60 мин к условиям перфузии и электрической стимуляции. Кривые одиночного цикла «сокращение — расслабление» мышц регистрировали и обрабатывали при помощи программы «MUSCLEDATA» (Scientific Instruments GmbH, Германия).

Для оценки сократительных свойств миокарда проводили экстрасистолический тест. Для этого, на фоне базовой стимуляции наносили однократно внеочередной электрический импульс через 0,2—1,5 с от начала регулярного цикла «сокращение — расслабление» мышц [13]. Оценивали величину экстрасистолического инотропного ответа мышц.

Статистический анализ проводился с помощью лицензионного пакета программ «Statistica 6.0» (Statsoft Inc, США) и Microsoft Office Excel 2007. Оценка статистически значимых различий результатов исследования осуществлялась непараметрическим методом (U критерий Манна-Уитни). Данные считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

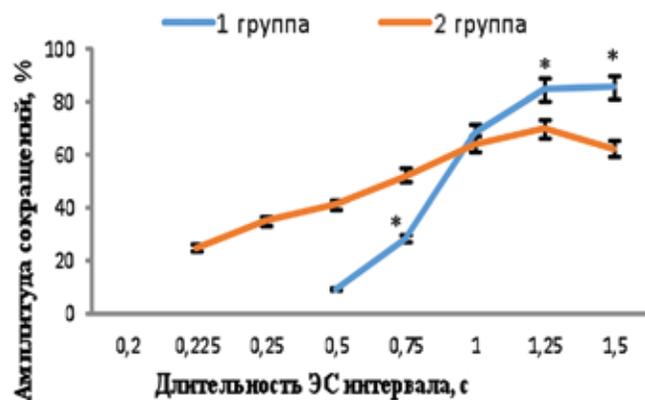
### Результаты и обсуждение

Когорта пациентов была разделена на 2 группы в соответствии с рекомендуемыми уровнями гликированного гемоглобина: 1-ю группу составили 17 пациентов с уровнем HbA1c ниже 8,0%, 2-ю — 13 пациентов с уровнем HbA1c выше 8,0% [2]. Характеристика клинико-anamnestических данных в группах пациентов с разным уровнем гликированного гемоглобина представлена в **таблице**.

Сравнительный анализ сформированных групп показал, что по основным исходным показателям группы были сопоставимы. Большинство пациентов в обеих группах имели III ФК стенокардии напряжения (82% и 77%) и I степень ожирения (23% и 54%), соответственно. При этом сформированные группы, ожидаемо, различались по уровню гликемии натощак и уровню гликированного гемоглобина. Пациенты обеих групп были сопоставимы по проводимой лекарственной терапии СД2.

На **рис. 1** отражена динамика проявления экстрасистолического инотропного ответа после воздействия внеочередного электрического импульса. Видно, что для изолированных полосок миокарда пациентов 1-й группы, экстрасистолический ответ был получен только в том случае, если внеочередной стимулирующий импульс подавали с интервалом не менее чем 0,5 с. На-

против, для полосок миокарда пациентов 2-й группы, первый экстрасистолический ответ был зафиксирован уже при экстрасистолическом интервале 0,225 с, при



Динамика экстрасистолических сокращений (ЭС) миокарда пациентов в зависимости от уровня HbA1c.

По оси ординат – амплитуда ЭС в процентах по отношению к регулярному сокращению; по оси абсцисс – длительность ЭС интервала (с), \*  $p$  – статистически значимое различие между группами ( $p < 0,05$ ).

этом его амплитуда была почти в 3 раза больше ( $p < 0,05$ ). Более выраженный инотропный ответ у мышц 2-й группы сохранялся и при последующих экстрасистолических интервалах, включая 0,75 с интервал. Однако при более длительных интервалах, экстрасистолический ответ во 2-й группе хоть и сохранял положительную динамику, но становился меньше экстрасистолического ответа мышц 1-й группы пациентов. Причём при интервалах 1,25 с и 1,5 с преобладание экстрасистолического ответа мышц 1-й группы пациентов, становилось статистически значимым. Известно, что инотропный ответ миокарда на внеочередной электрический импульс возникает только в случае попадания этого импульса в фазу относительного рефрактерного периода потенциала действия [10]. На этом основании, полученные результаты однозначно свидетельствуют о более высокой возбудимости мембраны кардиомиоцитов у 2-й группы пациентов. В нашем исследовании именно эта группа характеризуется высокими значениями HbA1c. Вместе с тем, по данным ЭКГ исследований пациенты обеих групп были сопоставимы по структуре и частоте возникновения нарушений ритма.

#### Характеристика клинико-anamnestических данных пациентов в зависимости от уровня гликированного гемоглобина ( $M \pm SD$ )

Показатель	Группы пациентов		$p$
	HbA1c <8%, $n=17$	HbA1c >8%, $n=13$	
Возраст (годы)	65,76 ± 7,44	61,31 ± 5,12	0,075
Мужчины/женщины	13/4	11/2	0,958
Длительность СД, годы	4,32 ± 0,57	3,56 ± 0,36	0,467
Длительность ИБС, годы	7,3 ± 1,97	8,27 ± 1,57	0,0687
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	28,96 ± 4,79	32,21 ± 6,45	0,265
Уровень гликемии натощак	6,96 ± 1,17	8,63 ± 1,64	0,048
Функциональный класс стенокардии напряжения:			
1	0	1(8%)	0,674
2	3(18%)	2(15%)	
3	14(82%)	10(77%)	
Функциональный класс хронической сердечной недостаточности по NYHA			
I	4(23%)	6(46%)	0,549
II	11(65%)	5(39%)	0,511
III	2(12%)	2(15%)	0,569
Сахароснижающие препараты (бигуаниды/производные сульфонилмочевины)	9(53%)/4(23%)	9(69%)/2(15%)	0,642
Уровень холестерина в крови, ммоль/л	4,78 ± 1,06	4,17 ± 1,12	0,142
Нарушение ритма по результатам ЭКГ:			
фибриляция предсердий	2(12%)	1(8%)	0,66
желудочковые экстрасистолы	1(6%)	1(8%)	0,962
предсердные экстрасистолы	1(6%)	0	
нарушение реполяризации	6(35%)	1(8%)	0,057

**Примечание.**  $n$  – количество пациентов;  $p$  – статистическая значимость различий между группами ( $p < 0,05$ ).

Как известно, с увеличением длительности экстрасистолических интервалов внеочередной электрический импульс попадает в более позднюю фазу относительного рефрактерного периода потенциала действия, при этом количество активированных кальциевых потенциалзависимых каналов увеличивается [14]. Это приводит к увеличению количества ионов кальция, участвующих в сокращении и, соответственно, к повышению амплитуды экстрасистолических сокращений миокарда [15]. Как оказалось, в нашем исследовании у пациентов 2-й группы экстрасистолическое сокращение миокарда возникало в более ранние сроки рефрактерного периода, что свидетельствует о большей возбудимости сарколеммы кардиомиоцитов. Это может быть связано с тем, что у пациентов с более высокими значениями гликированного гемоглобина мембраны кардиомиоцитов гликозилированы в большей степени. Последнее влияет на функциональное состояние ионных каналов сарколеммы [16], вследствие чего нарушается внутриклеточный ионный баланс кардиомиоцитов и снижается пороговый уровень потенциала действия.

Оценивая структуру цикла «сокращение-расслабление» при частоте 0,5 Гц, можно отметить, что при нанесении внеочередного стимула на коротких интервалах (0,2-1 с) в экстрасистолическом сокращении участвуют в большей степени ионы кальция экстраклеточного пула, которые поступают в клетку во время внеочередного стимула, тогда как внутриклеточный пул  $Ca^{2+}$  саркоплазматического ретикула еще не успевает восстановиться после регулярного сокращения. Амплитуда экстрасистолических сокращений на коротких экстрасистолических интервалах при максимальных значениях не превышает 50-60% от уровня регулярных циклов. Вероятно в более возбудимом миокарде пациентов 2-й группы (с высоким уровнем гликированного гемоглобина) при внеочередном возбуждении в клетки сердца поступает большее количество экстраклеточного кальция, в результате чего амплитуда экстрасистол более высокая по сравнению с аналогичными параметрами миокарда пациентов 1-й группы. При величине интервала более 1 с уже полноценно участвует внутриклеточный пул кальция саркоплазматического ретикула. Так, мы обнаружили, что при нанесении внеочередного электрического импульса через 1 с и более, амплитуда экстрасистолических сокращений полосок миокарда пациентов 1 группы, напротив, оказалась больше относительно группы пациентов с высоким уровнем HbA1c. Считается, что СД является болезнью внутриклеточного обмена ионов кальция [17]. При СД активность и/или количество  $Ca^{2+}$ -АТФ-азы саркоплазматического ретикула снижается и повышается активность и экс-

прессия  $Na^{+}/Ca^{2+}$ -обменника в кардиомиоцитах [16]. Это приводит к уменьшению обратного захвата ионов кальция саркоплазматическим ретикуломом и более интенсивному удалению этих ионов из клетки. В результате происходит обеднение саркоплазматического ретикула ионами кальция, и соответственно, уменьшение количества ионов кальция, участвующего в цикле «сокращение-расслабление». Вероятно, ремоделирование метаболических процессов в условиях длительного воздействия гипергликемии способствует изменению не только состояния сарколеммы кардиомиоцитов, но и нарушению работы внутриклеточных систем транспорта ионов кальция. Это проявляется в более низкой амплитуде экстрасистолических сокращений миокарда пациентов с высоким уровнем HbA1c в сравнении с инотропной реакцией миокарда пациентов с менее выраженным нарушением углеводного обмена. Результаты исследования показали, что значения HbA1c более 8% могут быть показателями патологического ремоделирования кардиомиоцитов.

## Заключение

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что у пациентов пожилого возраста, у которых уровень гликированного гемоглобина ниже 8%, сарколеммальная мембрана кардиомиоцитов более электрически стабильна, чем у пациентов с уровнем гликированного гемоглобина выше 8%. Это позволяет предполагать, что у таких пациентов риск развития нарушений ритма сердца ниже, чем у пациентов с уровнем гликированного гемоглобина выше 8%.

## Литература

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases [Internet] 2017 Available from: [http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова. 8-й выпуск. М.; УП ПРИНТ; 2017.
3. Russell J, Du Toit EF, Peart JN, Patel NN, Headrick JP. Myocyte membrane and microdomain modifications in diabetes: determinants of ischemic tolerance and cardioprotection. *Cardiovascular Diabetology*. 2017; 16: 155. doi:10.1186/s12933-017-0638-z.
4. Ворожцова И.Н., Будникова О.В., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С. Влияние диабета 2 типа на миокард у больных ишемической болезнью сердца. *Сибирский медицинский журнал*. 2018; 33(1): 14-20.
5. Аметов А.С., Курочкин И.О., Зубков А.А. Сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания. *Российский медицинский журнал*. 2014; 13: 943-58.
6. The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008; 358: 2545-59.

7. The ADVANCE Collaborative Group. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008; 358: 2560–72.
8. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet.* 1998; 352: 837–53.
9. Duckworth W, Abraira C, Moritz T et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2009; 360: 129–39.
10. Vijan S, Sussman JB, Yudkin JS, Hayward RA. The effect of patients' risks and preferences on health gains with glucose lowering in type 2 diabetes. *JAMA Intern Med.* 2014; 174(8): 1227–34. doi:10.1001/jamainternmed.2014.2894.
11. Currie, C. J. Survival as a function of HBA(1c) in people with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. *The Lancet.* 2010; 357(9713): 481–9. doi: 10.1016/s0140-6736(09)61969-3.
12. Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С., Канев А.Ф., Козлов Б.Н., Попов С.В. Различия в динамике зависимости «интервал-силы» изолированного миокарда человека с ишемической болезнью сердца на фоне и без сахарного диабета 2 типа, роль CA2 + -АТФазы саркоплазматического ретикулума. *Физиология человека.* 2017; 1 (43): 63-9.
13. Wu S.N., Shen A.Y., Hwang T.L. Analysis of mechanical restitution and post-rest potentiation in isolated rat atrium. *Chinese J. Physiol.* 1996; 39: 23-9.
14. Wang L, Myles RC, De Jesus NM, Ohlendorf AKP, Bers DM, Ripplinger CM. Optical Mapping of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> in the Intact Heart: Ryanodine Receptor Refractoriness During Alternans and Fibrillation. *Circulation research.* 2014; 114(9): 1410–21. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302505.
15. Arruda AP, Hotamisligil GS. Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. *Cell metabolism.* 2015; 22(3): 381–97. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.010.
16. Александров А.А., Ядрихинская М.Н., Кухаренко С.С. Мерцательная аритмия: новый лик сахарного диабета в XXI веке. *Сахарный диабет.* 2011; 2011; 1: 53-60.
17. Голухова Е.З., Мустафаева А.З. Влияние сахарного диабета II типа на диастолическую функцию миокарда левого желудочка у больных с ишемической болезнью сердца. *Креативная кардиология.* 2013; 2: 46-52.
4. Vorozhtsova I.N., Budnikova O.V., Afanasyev S.A., Kondratyeva D.S. Influence of type 2 diabetes on the myocardium of patients with ischemic heart disease. *Sibirskiy Meditsinskiy zhurnal.* 2018; 33 (1): 14–20. (in Russian)
5. Ametov A.S., Kurochkin I.O., Zubkov A.A. Diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Russkiy meditsinskiy zhurnal.* 2014; 13: 943–58. (in Russian)
6. The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008; 358: 2545–59.
7. The ADVANCE Collaborative Group. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358: 2560–72.
8. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet.* 1998; 352: 837–53.
9. Duckworth W, Abraira C, Moritz T et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2009; 360: 129–39.
10. Vijan S, Sussman JB, Yudkin JS, Hayward RA. The effect of patients' risks and preferences on health gains with glucose lowering in type 2 diabetes. *JAMA interna lmedicine.* 2014; 174(8): 1227–34. doi:10.1001/jamainternmed.2014.2894.
11. Currie, C.J. Survival as a function of HBA(1c) in people with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. *The Lancet.* 2010; 357(9713): 481–9. doi: 10.1016/s0140-6736(09)61969-3.
12. Afanasyev S.A., Kondrateva D.S., Kaney A.F., Kozlov B.N., Popov S.V. Differences in the dynamics of the dependence of the “interval-force” of isolated human myocardium with ischemic heart disease in the background and without type 2 diabetes, the role of CA<sup>2+</sup> + -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Human physiology.* 2017; 1(43): 63-9.
13. Wu S.N., Shen A.Y., Hwang T.L. Analysis of mechanical restitution and post-rest potentiation in isolated rat atrium. *Chinese J. Physiol.* 1996; 39: 23-9.
14. Wang L, Myles RC, De Jesus NM, Ohlendorf AKP, Bers DM, Ripplinger CM. Optical Mapping of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> in the Intact Heart: Ryanodine Receptor Refractoriness During Alternans and Fibrillation. *Circulation research.* 2014; 114(9): 1410–21. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302505.
15. Arruda AP, Hotamisligil GS. Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. *Cellmetabolism.* 2015; 22(3): 381–97. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.010.
16. Aleksandrov A.A., Yadrinhinskaya M.N., Kukharenko S.S. Atrial fibrillation: the new face of diabetes in the XXI century. *Sakharnyy diabet.* 2011; 1: 53-60. (in Russian)
17. Golukhova EZ, Mustafaeva A.Z. Influence of type II diabetes on the diastolic function of left ventricular myocardium in patients with ischemic heart disease. *Kreativnaya kardiologiya.* 2013; 2: 46-52. (in Russian)

## References

1. *World Health Organization. Cardiovascular diseases [Internet] 2017 Available from: [http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).*
2. Dedov II., M.V. Shestakov, A.Yu. Mayorov. ed. *Algorithms of specialized medical care for patients with diabetes mellitus. The 8th issue. [Algoritmy spetsializirovannoy meditsinskoj pomoshchi bol'nym sakharnym diabetom. 8 izdanie].* Moscow; UE PRINT; 2017. (in Russian)
3. Russell J, Du Toit EF, Peart JN, Patel HH, Headrick JP. Myocyte membrane and microdomain modifications in diabetes: determinants

**Сведения об авторах:**

**Будникова Олеся Викторовна**, аспирант лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, e-mail: budnikovaolesya@mail.ru;

**Афанасьев Сергей Александрович**, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, e-mail: Tursky@cardio-tomsk.ru;

**Кондратьева Дина Степановна**, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, e-mail: dina@cardio-tomsk.ru;

**Ворожцова Ирина Николаевна**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. эндокринологии и диабетологии Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России; вед. науч. сотр. отд-ния функциональной и лабораторной диагностики НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, e-mail: abv@mail.tomsknet.ru;

**Ахмедов Шамиль Джаманович**, доктор мед. наук, проф., заместитель директора НИИ кардиологии Томского НИМЦ по инновационной деятельности и стратегическому развитию, вед. науч. сотр. отд-ния сердечно-сосудистой хирургии, e-mail: shamil@cardio-tomsk.ru;

**Шипулин Владимир Митрофанович**, доктор мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела сердечно-сосудистой хирургии НИИ кардиологии Томского НИМЦ, e-mail: shipulin@cardio-tomsk.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 57.014

Гильяно Н.Я.<sup>1</sup>, Носкин Л.А.<sup>1</sup>, Журишкина Е.В.<sup>1</sup>, Степанов С.И.<sup>1</sup>,  
Ибатуллин Ф.М.<sup>1</sup>, Торшин В.И.<sup>2</sup>, Якунина Е.Б.<sup>2</sup>, Алчинова И.Б.<sup>3</sup>

## Комбинация низких доз глюкозамина и 2-DG усиливает цитотоксический эффект в опухолевых клетках человека в культуре

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»; 188300, Ленинградская обл., Гатчина, ул. Орлова Роща, д. 1;

<sup>2</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Химиотерапия опухолей традиционно направлена на ингибирование пролиферации раковых клеток и активацию апоптоза. В данной работе на клетках карциномы (линия HeLaG63) и эндотелиоцитах (линия ECV304) человека проведено сравнительное исследование эффектов низких концентраций (1,5—10 мМ) двух аналогов глюкозы: 2-DG и глюкозамина D. Оценка эффективности действия этих агентов проводилась по следующим параметрам: снижение жизнеспособности по МТТ-тесту, изменение проницаемости клеточной мембраны, изменение прогрессии по клеточному циклу, выраженность апоптотической гибели при культивировании клеток в питательной среде с различным содержанием глюкозы. Показано, что 48 часовая обработка 2-DG в исследованных концентрациях приводила к снижению доли клеток в G<sub>1</sub> и S-фазах и аккумуляции их в G<sub>2</sub>/M фазах. Глюкозамин D, в отличие от 2-DG при тех же концентрациях блокировал эти же клетки в G<sub>1</sub>/S фазе клеточного цикла. При обработке клеток HeLaG63 глюкозамин D оказывал более токсичное действие, чем 2-DG. При сочетанном воздействии 2-DG и глюкозамина D регистрировали существенное увеличение суб- G<sub>1</sub>-популяции по сравнению с раздельным воздействием. Эффективность обработки увеличивалась при снижении концентрации глюкозы в питательной среде и/или с увеличением дозы агентов. Эндотелиоциты (ECV304) были менее чувствительны, как к действию глюкозамина D, так и 2-DG, и сочетанное воздействие даже при концентрациях 10 мМ не отличалось от раздельного воздействия. Обработка клеток 10 мМ 2-DG и глюкозамина D приводила к увеличению проницаемости клеточных мембран для флуоресцентного красителя пропидиум йодида, при этом наибольшую эффективность регистрировали для клеток HeLaG63.

**Ключевые слова:** глюкозамин D, 2-деокси-D-глюкоза; HeLaG63, ECV304; МТТ-тест; проточная цитометрия; клеточный цикл; апоптоз.

**Для цитирования:** Гильяно Н.Я., Носкин Л.А., Журишкина Е.В., Степанов С.И., Ибатуллин Ф.М., Торшин В.И., Якунина Е.Б., Алчинова И.Б. Комбинация низких доз глюкозамина D и 2-DG усиливает цитотоксический эффект в опухолевых клетках человека в культуре. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 41-49.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.41-49

**Для корреспонденции:** Гильяно Надежда Яковлевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. медицинской биофизики,

**e-mail:** giliano@omrb.pnpi.spb.ru

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

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

**Поступила** 13.03.2019

Giliano N.Y.<sup>1</sup>, Noskin L.A.<sup>1</sup>, Zhurishkina E.V.<sup>1</sup>, Stepanov S.I.<sup>1</sup>, Ibatullin F.M.<sup>1</sup>, Torshin V.I.<sup>2</sup>, Yakunina E.B.<sup>2</sup>, Alchinova I.B.<sup>3</sup>

## A combination of low-dose glucosamine D and 2-deoxy-D-glucose enhances the cytotoxic effect on cultured human tumor cells

<sup>1</sup>B.P. Konstantinov Petersburg Institute of Nuclear Physics of the Kurchatov Institute National Research Center, Orlova Roshcha Str. 1, Leningradskaya Region, Gatchina 188300, Russian Federation;

<sup>2</sup>Peoples' Friendship University of Russia, School of Medicine 6, Miklukho-Maklaya Str., Moscow 117198, Russian Federation;

<sup>3</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Chemotherapy for tumors has traditionally been aimed at inhibiting proliferation and activating apoptosis of cancer cells. **Aim.** To perform a comparative study of effects of two glucose analogues, 2-deoxy-D-glucose (2-DG) and glucosamine D, at low con-

centrations (1.5-10 mM) on carcinoma cells (HeLaG63 line) and endotheliocytes (ECV304 line). **Methods.** Efficacy of these agents was evaluated by decreased cell viability (MTT test), permeability of the cell membrane, changes in progression by the cell cycle, and apoptosis (cytometric method) of cells cultured in mediums with different glucose concentrations. **Results.** The 48-h 2-DG treatment of cells in the studied concentrations reduced the proportion of cells in G<sub>1</sub> and S-phases and their accumulation in G<sub>2</sub>/M phases. The same concentrations of glucosamine D, as distinct from 2-D, blocked the same cells in the G<sub>1</sub>/S phase of the cell cycle. The same concentrations of glucosamine D were more toxic to carcinoma cells than 2-DG. A combination of 2-DG and glucosamine D significantly greater increased the sub-G<sub>1</sub> population of HeLaG63 cells than either agent alone. The treatment effectiveness increased with a decrease in the glucose concentration in the medium and/or with an increase in the agent dose. Endotheliocytes (ECV304) were less sensitive to both glucosamine D and 2-DG, and the effect of their combination did not differ from the effect of either agent alone, even at concentrations of 10 mM. Treatment of cells with 10 mM 2-DG and glucosamine D increased the cell membrane permeability for the fluorescent dye, propidium iodide, with the greatest effect recorded for HeLaG63 cells. **Conclusion.** Therefore, the anticarcinogenic efficacy of glycolysis inhibitors can be enhanced, which would allow to considerably reduce their doses and avoid potential side effects induced by therapeutically effective drug concentrations.

**Keywords:** glucosamine D, 2-deoxy-D-glucose; HeLaG63, ECV304; MTT-test; flow cytometry; cell cycle; apoptosis.

**For citation:** Giliano N.Y., Noskin L.A., Zhurishkina E.V., Stepanov S.I., Ibatullin F.M., Torshin B.I., Yakunina E.B., Alchinova I.B. The combination of low doses of glucosamine D and 2-DG enhances the cytotoxic effect in human tumor cells in culture. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 41-49. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 41-49

**For correspondence:** *Giliano N.Y.*, Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», e-mail: giliano@omrb.pnpi.spb.ru

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

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

**Information about authors:**

Torshin V.I., <http://orcid.org/0000-0002-3950-8296>

Yakunina E.B., <http://orcid.org/0000-0002-7962-1971>

Alchinova I.B. <http://orcid.org/0000-0001-5294-7317>

**Received** 13.03.2019

Химиотерапия опухолей традиционно направлена на ингибирование пролиферации раковых клеток, которое достигается за счет блокирования прогрессии по клеточному циклу. Известно, что опухолевые клетки проявляют устойчивость к апоптотической гибели, вследствие чего возрастает интерес к противоопухолевым препаратам, индуцирующим апоптоз. Широкий спектр фармакологических свойств глюкозамина D и 2-деокси-D-глюкоза (2-DG) привлекают внимание исследователей к этим агентам. Глюкозамин D, так же, как и 2-DG является аналогами глюкозы с той лишь разницей, что в составе глюкозамина присутствует аминогруппа. Показана антиоксидантная и противовоспалительная способность глюкозамина, что делает его привлекательным мультифункциональным терапевтическим агентом [1]. Глюкозамин D может как индуцировать, так и ингибировать апоптоз в зависимости от типа клеток и активности специфического биохимического пути. Показана *in vitro* токсичность глюкозамина D для ряда малигнанных клеточных линий, а также *in vivo* для клеток опухолей в концентрациях, имеющих малый эффект на нормальные клетки [2-4]. Противоопухолевая активность глюкозамина D исследуется более полуве-

ка, однако до настоящего времени механизмы противоопухолевого действия окончательно не ясны [5].

Известно, что 2-DG ингибирует транспорт глюкозы и гликолитическую продукцию АТФ, что широко используется в исследованиях в качестве метаболического ингибитора [7]. Показана токсичность 2-DG для различных типов раковых клеток и повышение эффективности лучевой и химиотерапии [6].

Ранее нами была показана селективная эффективность аналога глюкозы 2-DG в высоких концентрациях (20/40/80мМ) как индуктора апоптотической гибели опухолевых клеток и блокирования пролиферации в G<sub>2</sub>/M фазах клеточного цикла. Была показана также зависимость эффективности 2-DG- обработки клеток от уровня глюкозы в питательной среде [8].

В данной работе проведено сравнительное исследование влияния низких концентраций 2-DG и глюкозамина D на эндотелиоциты (линия ECV304) человека, на пролиферацию, прогрессию по клеточному циклу, апоптоз и повреждение клеточных мембран клеток карциномы (линия HeLaG63). Проведена оценка влияния этих веществ при различном содержании глюкозы в питательной среде.

## Методика

Работа выполнена на клетках карциномы шейки матки (линия HeLaG63), на эндотелиоцитах (линия ECV304) человека. Клетки культивировали на среде Игла с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки и гентамицина (50мг/мл) («БиолоТ», Россия).

Клетки выращивали в пенициллиновых флаконах с покровными стеклами, что позволяло одновременно проводить морфологический и цитометрический анализ одной и той же популяции клеток. После окрашивания ацетоорсеином подсчитывали процент морфологически измененных клеток (не менее чем на 1000 клеток) с помощью светового микроскопа «Motic» (Китай).

Клетки с поверхности флаконов смывали раствором Версена («Биолот», Россия). Клеточную суспензию центрифугировали, осадок суспендировали в растворе, содержащем 0,1 % бромистого этидия. Используя проточно-цитометрический анализ, получали распределение клеток по содержанию ДНК, что позволило проследить как за прогрессией клеток по циклу: 2с- G1-фаза; 3с- S-фаза; 4с- G2/M-фазы, так и оценить цитотоксичность препаратов при анализе доли клеток с содержанием ДНК меньше диплоидного (<2с или суб-G1-популяцию). Последние появляются в результате фрагментации ядер в процессе апоптоза [9].

Жизнеспособность клеток оценивали по транспорту флюорохрома пропидий йодида (PI) [10], который проникает только через поврежденные мембраны клеток. Клетки с поверхности флакона снимали раствором Версена. Клеточную суспензию помещали на лед, добавляли раствор PI (конечная концентрация 1 мкг/мл) и анализировали на проточном цитометре (ПИ-ЯФ, Россия).

МТТ – метод изначально был разработан для оценки токсичности препаратов, но затем стал широко использоваться при оценке индукции или ингибирования клеточной пролиферации в моделях *in vitro*. Метод основан на восстановлении формазана с помощью внутриклеточных NAD(P)H-оксиредуктаз. При определенных условиях метаболическая активность этого фермента может отражать количество жизнеспособных клеток [11].

Клетки высевали на 96-луночные планшеты в концентрации 10 000 на лунку. Через 24 ч в лунки добавляли различные концентрации (от 1,5 до 20мМ) исследуемых веществ: 2-DG, D-глюкозамина. Через 48 ч и за 4 ч до фиксации в лунки добавляли МТТ (тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид). Оценивали оптическую плотность на ридере «Thermo Fisher» (США) при дли-

не волны 450 нм. Индекс жизнеспособности определяли как отношение (в %) оптической плотности экспериментальных образцов к контрольным. Статистическая обработка результатов проводилась в программе Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США). Эксперимент повторяли не менее 3 раз. В каждом случае анализировали не менее 20 тыс. клеток.

## Результаты и обсуждение

*Влияние низких концентраций глюкозамина на клетки различных опухолевых линий.* Оценка влияния различных концентраций D-глюкозамина на жизнеспособность клеток двух линий, проведенная с помощью МТТ метода, показала, что клетки карциномы (линия HeLaG63) проявляют большую чувствительность, и обнаруживают значительное дозозависимое снижение метаболической активности (рис. 1, А).

Появление суб- G<sub>1</sub> популяции при параллельном цитометрическом анализе состава клеточной популяции подтвердило высокую чувствительность клеток карциномы линии HeLaG63 к обработке глюкозамином D в концентрации до 20мМ (рис. 1, в). По сравнению с необработанным контролем (2%) уровень клеток с содержанием <2с увеличился почти в 8 раз (15%). Эндотелиоциты линии ECV304 в таких же условиях культивирования только замедляли прогрессию по клеточному циклу: доля клеток в фазе G1 увеличилась с 46% в контроле до 60% после обработки глюкозамином D. Доля клеток с содержанием ДНК <2с не увеличилась по сравнению с контролем, что позволяет предположить отсутствие апоптотической гибели. Морфологический анализ клеток линии ECV304 также не выявил фрагментации клеточных ядер, свойственной для апоптоза, несмотря на то, что концентрация 20мМ глюкозамина D считается токсичной для некоторых клеточных линий [12].

После 48-часовой инкубации клеток обеих линий с еще более низкими концентрациями глюкозамина D (3мМ и 10мМ) количество клеток HeLa в образцах по сравнению с контролем резко снижалось до 55 и 40% соответственно. Количество клеток ECV304 составило 95–85% от контроля (рис. 1, Б). Эти значения согласуются с результатами морфологического и цитометрического анализов, но противоречат данным, полученным с помощью МТТ метода. Так как при концентрации 10мМ глюкозамина D индекс жизнеспособности клеток ECV304 снижается до 50% (рис. 1, А). При увеличении концентрации глюкозамина D до 20мМ в клетках ECV304 регистрируется блокировка прогрессии по клеточному циклу, что, вероятно, приводит к снижению метаболической активности

NAD(P)H-зависимой оксиредуктазы, но не всегда приводит к гибели клеток этой линии. МТТ- тест позволяет определить метаболическую активность, которая качественно определяет наличие живых клеток, но дает лишь приблизительную оценку числа выживших [13].

Влияние низких концентраций 2-DG на клетки разных линий. Результаты экспериментов по сравнительной оценке цитотоксичности 2-DG для рассматриваемых клеточных линий показали дозозависимое снижение индекса жизнеспособности клеток при увеличении концентрации (рис. 2).

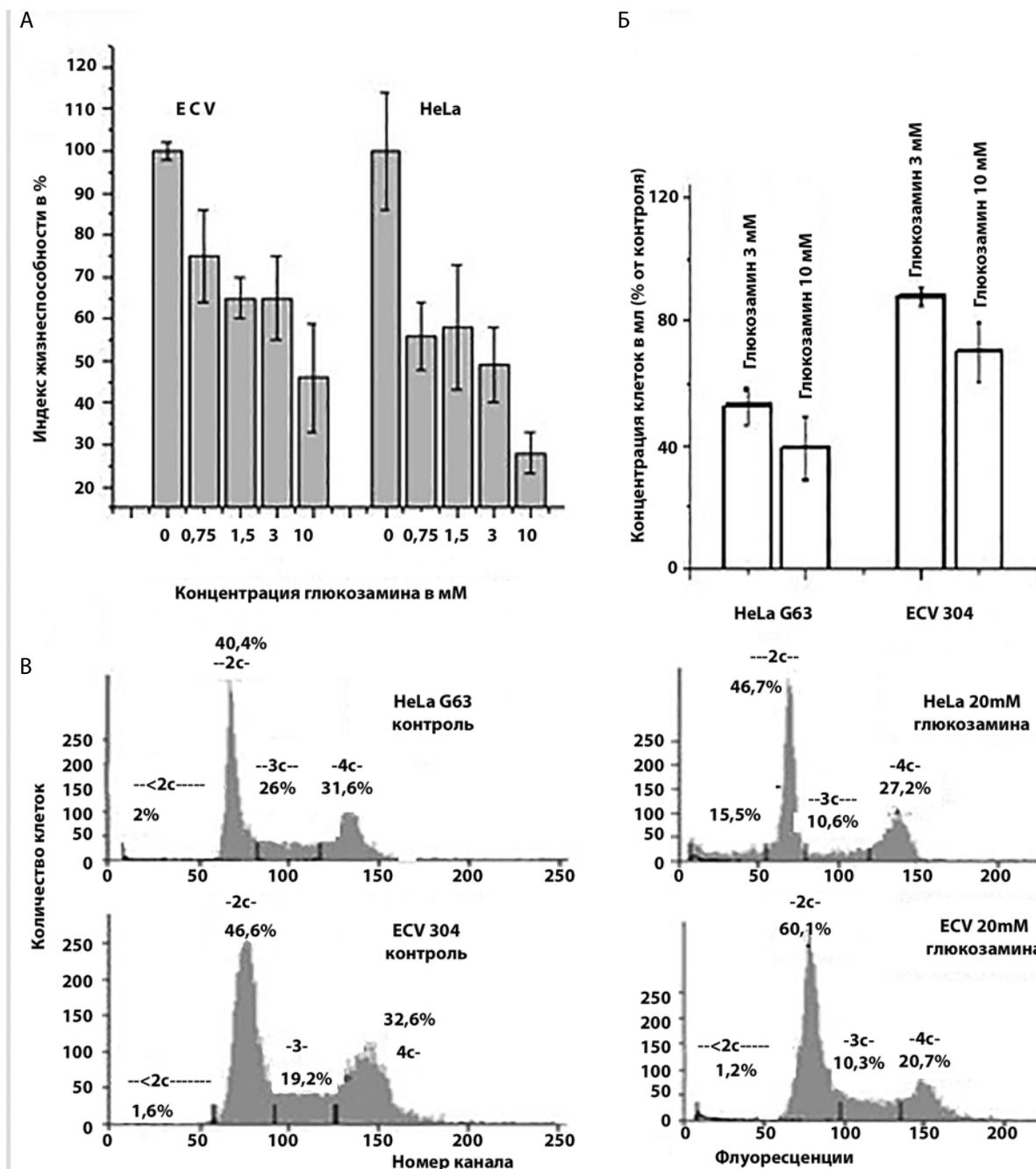


Рис. 1. А. Индекс жизнеспособности клеток в зависимости от концентрации глюкозамина D (по активности NAD(P)H-зависимой оксиредуктазы). Б. Относительная концентрация клеток после 48 часовой инкубации с 3 или 10 mM глюкозамина D, в % к контролю. В. Распределение клеток по содержанию ДНК после 48 ч. инкубации клеток в питательной среде с 20mM глюкозамина D.

С увеличением концентрации отчетливее проявлялись различия между клеточными линиями. Вместе с тем, отмечен одинаковый эффект для клеток HeLaG63 и ECV304 при концентрациях 10мМ и 20мМ соответственно.

*Исследование токсического действия глюкозамина D и 2-DG на жизнеспособность HeLaG63 при культивировании на средах с разным содержанием глюкозы.* Как показали наши исследования, фактором, влияющим

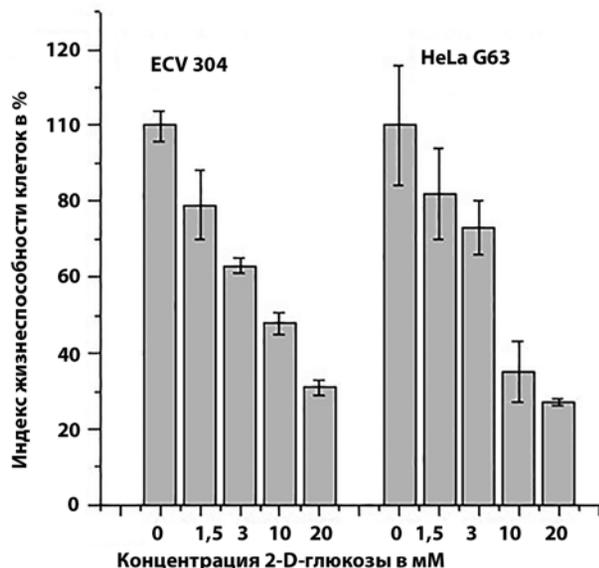


Рис.2. Индекс жизнеспособности клеток в зависимости от концентрации 2-DG (по активности NAD(P)H-зависимой оксиредуктазы).

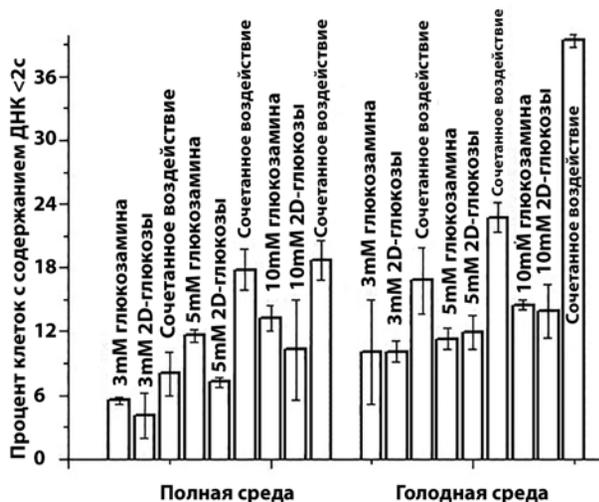


Рис.3. Процент клеток с содержанием ДНК меньше 2с, индуцированный разными концентрациями глюкозамина D и 2-DG в клетках HeLaG63 при инкубировании их в течение 48 ч. среде с разным содержанием глюкозы.

на токсичность низких концентраций 2-DG и глюкозамина D, является концентрация глюкозы в среде культивирования. С помощью проточной цитометрии определяли процент клеток с количеством ДНК меньше 2с (суб- $G_1$ ). Последние считали клетками, находящимися в апоптозе. Было показано, что линия HeLa G63 проявляет дозозависимую чувствительность как к глюкозамину D, так и к 2-DG.

Увеличение в среде концентрации как глюкозамина D, так и к 2-DG приводило к возрастанию числа апоптотических клеток. Повреждающее действие глюкозамина D было более выраженным по сравнению с 2-DG, если среда содержала стандартное количество глюкозы (4 г/л). При уменьшении концентрации глюкозы до 1 г/л (голодная среда) цитотоксическое действие обоих веществ было одинаково (рис. 3).

Сочетанное использование препаратов в равных концентрациях вызывало повреждения в большем количестве клеток по сравнению с их отдельным применением. Низкое содержание глюкозы в среде культивирования также повышало токсичность глюкозамина D и 2-DG при их совместном использовании (рис. 3).

Обработка клеток глюкозамин D и 2-DG при отдельном и сочетанном использовании влияла на пролиферацию и приводила к накоплению клеток в фазе  $G_1$  при культивировании на полной среде. Исключением стало сочетанное действие 10мМ глюкозамина D и 10мМ 2-DG, которое блокировало клетки в фазе  $G_2/M$  (рис. 4).

Иная картина наблюдалась при инкубировании клеток в среде с низким содержанием глюкозы. Глюкозамин D увеличивал несущественно уровень  $G_1$ -популяции клеток, а 2-DG как в концентрации 3мМ, так и 10мМ существенно увеличивала уровень  $G_2/M$ -популяции. Сочетанное воздействие сопровождалось существенным снижением клеток к фазе  $G_1$  и повышением уровня  $G_2/M$ -популяции, что согласуется с данными литературы [14].

*Исследование токсического действия глюкозамина D и 2-DG на жизнеспособность ECV304 при культивировании на средах с разным содержанием глюкозы*

При культивировании клеток ECV 304 на полной среде (глюкоза 4 г/л) низкие концентрации (3мМ) и глюкозамина D, и 2-DG не повышали апоптотическую гибель клеток (суб- $G_1$  популяция менее 5% от общего числа клеток) и существенно не изменяли прогрессию клеток по циклу (рис.4).

Глюкозамин D в концентрации 10 мМ приводил к накоплению клеток в  $G_1$ -фазе. Повышение концентрации 2-DG приводило в блокированию цикла в  $G_2/M$ . Совместная обработка клеток этими вещества-

ми как в концентрации 3мМ так и концентрации 10мМ приводили к накоплению клеток в G<sub>1</sub>-фазе.

При культивировании клеток на голодной среде (глюкоза 1г/л) блокирование клеток в G<sub>1</sub>-фазе регистрируется уже и при низких концентрациях глюкозамина D и 2-DG. При концентрации 10мМ 2-DG индуцирует накопление клеток в G<sub>2</sub>\M фазах. Очевидно, что в клетках линии ECV 304 глюкозамин D индуцирует остановку клеточного цикла в G<sub>1</sub>-фазе, а 2-DG в G<sub>2</sub>\M.

Из вышеизложенного можно предположить, что ингибирование синтеза ДНК и блокирование перехода клеток из G<sub>1</sub>\S играют главную роль в ингибировании пролиферации клеток низкими концентрациями глюкозамина D. Как вероятный механизм противоопухолевого действия глюкозамина D в низких концентрациях рассматривают его влияние на семейство белков Cip/Kip, контролирующих переход клетки в митоз. Кроме того глюкозамин ингибирует фосфорилирование белка STAT3, основной мишенью которого является сурвивин - ингибитор апоптоза [15]. При

повышении концентрации глюкозамина D и снижении уровня глюкозы в питательной среде, определяющим фактором в ингибировании пролиферации выступает блокирование в G<sub>2</sub>\M- фазах. Сочетанное воздействие глюкозамина D и 2-DG в низких концентрациях приводит к снижению доли клеток в G<sub>1</sub> – фазе и увеличению доли клеток в G<sub>2</sub>\M.

Противоопухолеваая активность глюкозамина D может быть связана с его способностью нарушать биосинтез холестерина, тем самым способствовать повреждению мембран [12, 16].

Инкубация клеток HeLaG63 в течение 48 ч как глюкозамином D, так и 2-DG приводит к увеличению проницаемости клеточных мембран и увеличению числа интенсивно-флюоресцирующих поврежденных клеток (окраска пропидий йодитом) по сравнению с необработанным контролем (рис. 6, А). Морфологический анализ подтвердил результаты цитометрического анализа (рис. 6, Б).

Таким образом, цитотоксичность низких концентраций глюкозамина D и 2-DG зависит от типа клеток

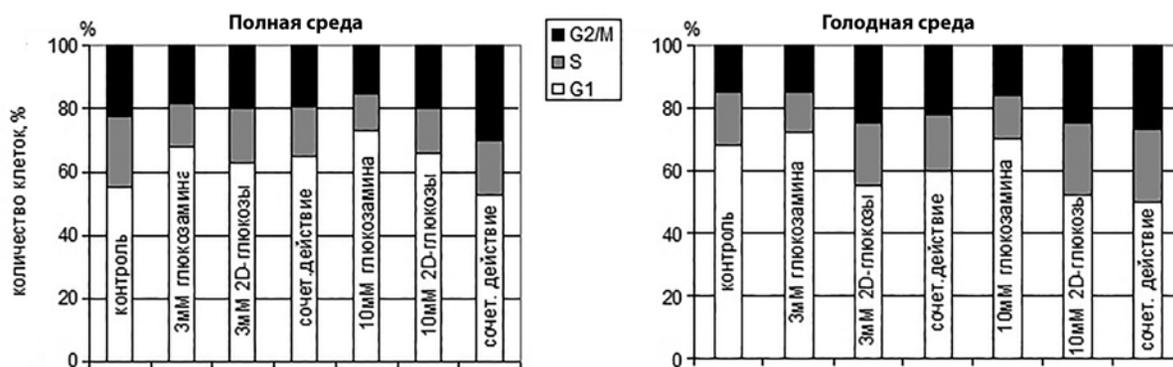


Рис. 4. Распределение клеток по фазам цикла, индуцированное 3 и 10мМ концентрациями глюкозамина D и 2-DG при воздействии на клетки HeLaG63 в среде с разным содержанием глюкозы.

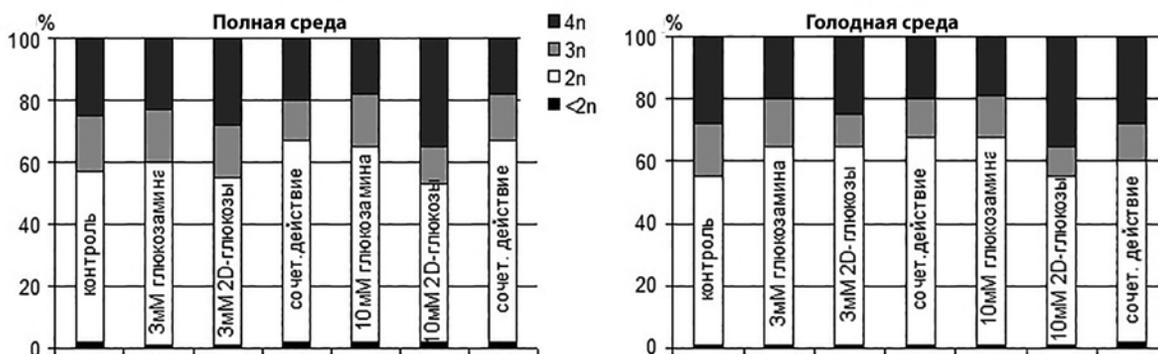
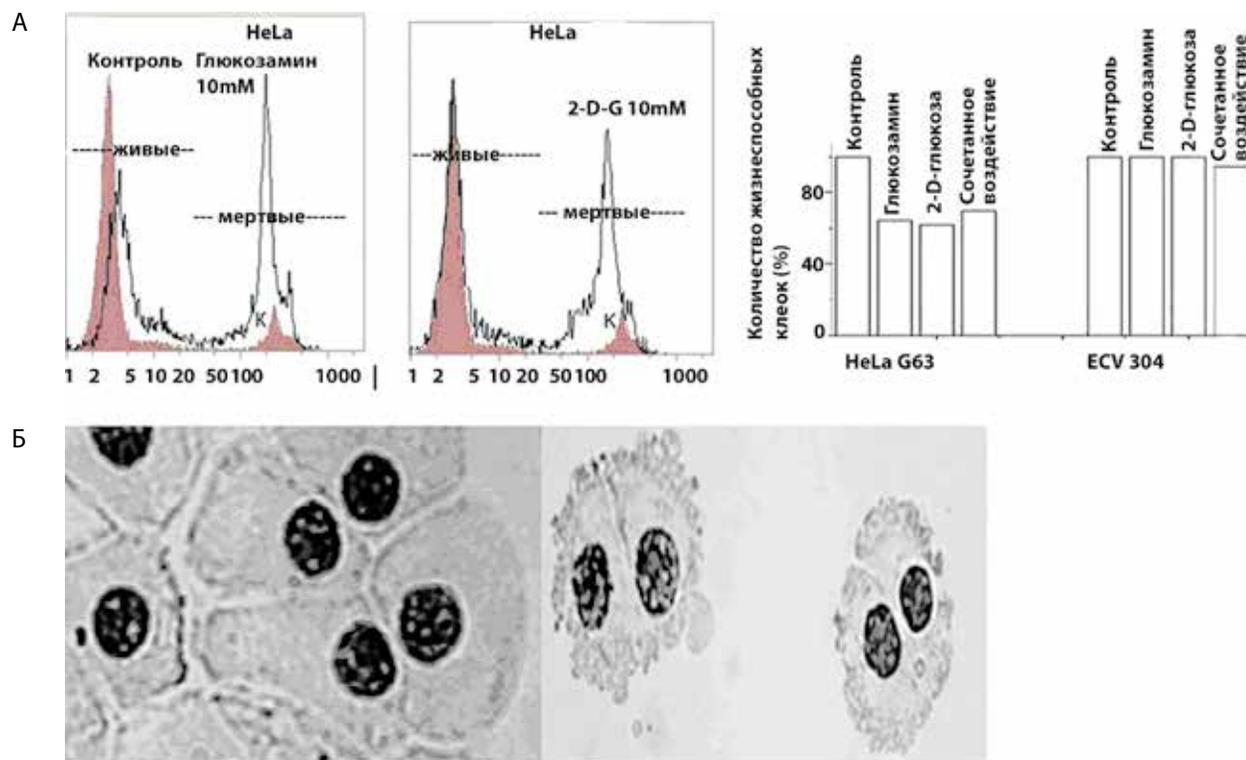


Рис. 5. Распределение клеток по фазам цикла, индуцированное различными концентрациями глюкозамина D и 2-DG при воздействии на клетки ECV304 в среде с разным содержанием глюкозы.

и от концентрации глюкозы в питательной среде. Клетки карциномы HeLaG63 проявляют наибольшую чувствительность к глюкозамину D, под действием, которого нарушается прогрессия по циклу и к 48 часам регистрируется рост апоптотической гибели клеток. Свой вклад в эту гибель привносят и поврежденные мембраны. Кроме того, низкое содержание глюкозы в среде и сочетанное применение с 2-DG значительно повышают цитотоксические свойства низких концентраций глюкозамина D. Это согласуется с результатами исследований, где было показано, что высокий уровень глюкозы ослабляет противоопухолевый эффект 5-фторурацила (5-Fu) для клеток рака поджелудочной железы AsPC-1. Предполагается, что уровень сахара в крови пациента может влиять на эффект химиотерапии [17, 18]. Эндотелиоциты ECV304 были менее чувствительны как к обработке глюкозамином D, так и к 2-DG в исследованных концентрациях. Снижение уровня глюкозы в питательной среде незначительно увеличивало цитотоксичность глюкозамина D и 2-DG в эндотелиоцитах, что согласуется с нашими ранними результатами [19].

Исследованные нами 2 аналога глюкозы со сходным механизмом действия при низких концентрациях включали в клетках различные чек-пойнты: глюкозамин D ингибировал прогрессию клеток из  $G_1$  в S-фазу, а 2-DG блокировала клетки в  $G_2/M$ . Ингибирование сразу двух чек-пойнтов при сочетанном воздействии приводило к увеличению цитотоксичности даже низких концентраций глюкозамина D и 2-DG. Повышенная зависимость опухолевых клеток от глюкозы приводила к увеличению цитотоксичности аналогов глюкозы при культивировании клеток в среде с низким содержанием глюкозы. Для эндотелиоцитов, сохранивших особенности нормальных клеток, блокирование прогрессии по циклу было обратимым и не приводило к гибели клеток. Полученные результаты указывают на то, что антиканцерогенную эффективность ингибиторов гликолиза можно повысить, используя сочетанное воздействие двух ингибиторов, что позволяет значительно уменьшать дозы, сохранить селективность и избежать возможных побочных эффектов, вызываемых терапевтически эффективными концентрациями препаратов.



**Рис. 6.** А. Гистограммы распределения клеток HeLa G 63 по интенсивности флюоресценции после обработки ИР. Заштрихованная гистограмма – без обработки; незаштрихованная — после 48 ч инкубации 10mM глюкозамина D и 2-ДВ. Б. Морфологические изменения клеточной мембраны до и после обработки клеток HeLa G 63 10mM глюкозамин D.

## Литература

## References

- Dalirfardouei R., Rfrimi G., Jamialahmadi K. Molecular mechanisms and biomedical applications of glucosamine as a potential multifunctional therapeutic agent. *Life Science*. 2016; 152: 21-9.
- Zhang L, Liu W-S, Han B-Q et al. Antitumor activities of D-glucosamine and its derivatives. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2006; 7: 608-14.
- Xu W., Jiang C., Kong X. et al. Chitooligosaccharides and N-acetyl-D-glucosamine stimulate peripheral blood mononuclear cell-mediated antitumor immune responses. *Mol. Med. Rep.* 2012; 6 (2): 385-90.
- Jung CW1, Jo JR, Lee SH et al. Anti-cancer properties of glucosamine-hydrochloride in YD-8 human oral cancer cells: Induction of the caspase-dependent apoptosis and down-regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Toxicol In Vitro*. 2012; Feb; 26(1): 42-50.
- Quastel JH, Cantero A. Inhibition of tumor growth by D-glucosamine. *Nature*. 1953; 171: 252-4.
- Lee A.M. Glucose regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat. Rev. Cancer*. 2014; 14(4): 263-76.
- Zhang X. D., Deslandes E., Villedieu M. et al. Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Various Malignant Cell Lines In Vitro. *ANTICANCER RESEARCH*. 2006; 26: 3561-6.
- Гильяно Н.Я., Бондарев Г.Н., Конева Л.В. и др. Возможные механизмы селективного действия ингибиторов гликолиза на эндотелиоциты и клетки карциномы человека в культуре. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 58(4): 78-85.
- Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics*. Cambridge university press. 2005.
- Jonson S, Nguyen V., Coder D. *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley& Sons, Inc. 2013. Supplement 64. Unit 9.2
- Berridge M.V., Tan A.S., Herst P.M. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11. 2005; 127-52.
- Friedman SJ, Skehan P. Membrane-active drugs potentiate the killing of tumor cells by D-glucosamine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 1172-6.
- Quent VM1, Loessner D, Friis T, et al. Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(4): 1003-13.
- Masson E, Wiernsperger N, Lagarde M et al. Glucosamine induces cell-cycle arrest and hypertrophy of mesangial cells: implication of gangliosides. *Biochem. J*. 2005; 388: 537-44.
- Chesnokov V, Sun Ch., Itakura K. Glucosamine suppresses proliferation of human prostate carcinoma DU145 cells through inhibition of STAT3 signaling. *Cancer Cell International*. 2009; 9: 25.
- Friedman SJ, Cheng S, Skehan P. Mechanisms of cholesterol synthesis inhibition by D-glucosamine. *Can J Biochem Cell Biol*. 1985; 63(12): 1253-7
- Chengy Y., Diao D., Zhang H. et al. Dang C. High glucose-induced resistance to 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells alleviated by 2-deoxy-D-glucose. *Biomedical Reports*, 2014; 2: 188-92.
- Chen H, Yao W, Chu Q et al. Synergistic effects of metformin in combination with EGFR-TKI in the treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer and type 2 diabetes. *Cancer Lett*. 2015; 369(1): 97-102
- Гильяно Н.Я., Семенова Е.Г., Федорцева Р.Ф., Конева Л.В. Характеристика спонтанно-трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV 304. Функциональные особенности клеток. *Цитология*. 2008; 50 (7): 576-85.
- Dalirfardouei R., Rfrimi G., Jamialahmadi K. Molecular mechanisms and biomedical applications of glucosamine as a potential multifunctional therapeutic agent. *Life Science*. 2016; 152: 21-9.
- Zhang L, Liu W-S, Han B-Q et al. Antitumor activities of D-glucosamine and its derivatives. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2006; 7: 608-14.
- Xu W., Jiang C., Kong X. et al. Chitooligosaccharides and N-acetyl-D-glucosamine stimulate peripheral blood mononuclear cell-mediated antitumor immune responses. *Mol. Med. Rep.* 2012; 6(2): 385-90.
- Jung CW1, Jo JR, Lee SH et al. Anti-cancer properties of glucosamine-hydrochloride in YD-8 human oral cancer cells: Induction of the caspase-dependent apoptosis and down-regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Toxicol In Vitro*. 2012; Feb; 26(1): 42-50.
- Quastel JH, Cantero A. Inhibition of tumor growth by D-glucosamine. *Nature*. 1953; 171: 252-4.
- Lee A.M. Glucose regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat. Rev. Cancer*. 2014; 14(4): 263-76.
- Zhang X. D., Deslandes E., Villedieu M. et al. Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Various Malignant Cell Lines In Vitro. *ANTICANCER RESEARCH*. 2006; 26: 3561-6.
- Giliano N Y, Bondarev G N, Konevega L V. et al. Possible mechanism of the selective action of the inhibitors of glycolysis in the endothelial cells and the human carcinoma cells in the. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; 58(4): 78-85. (in Russian)
- Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics*. Cambridge university press. 2005.
- Jonson S, Nguyen V., Coder D. *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley& Sons, Inc. 2013. Supplement 64. Unit 9.2
- Berridge M.V., Tan A.S., Herst P.M. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11. 2005. 127-52.
- Friedman SJ, Skehan P. Membrane-active drugs potentiate the killing of tumor cells by D-glucosamine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 1172-6.
- Quent VM1, Loessner D, Friis T, et al. Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(4): 1003-13.
- Masson E, Wiernsperger N, Lagarde M et al. Glucosamine induces cell-cycle arrest and hypertrophy of mesangial cells: implication of gangliosides. *Biochem. J*. 2005; 388: 537-44.
- Chesnokov V, Sun Ch., Itakura K. Glucosamine suppresses proliferation of human prostate carcinoma DU145 cells through inhibition of STAT3 signaling. *Cancer Cell International*. 2009; 9: 25.
- Friedman SJ, Cheng S, Skehan P. Mechanisms of cholesterol synthesis inhibition by D-glucosamine. *Can J Biochem Cell Biol*. 1985; 63(12): 1253-7.
- Chengy Y., Diao D., Zhang H. et al. Dang C. High glucose-induced resistance to 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells alleviated by 2-deoxy-D-glucose. *Biomedical Reports*, 2014; 2: 188-92.
- Chen H, Yao W, Chu Q et al. Synergistic effects of metformin in combination with EGFR-TKI in the treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer and type 2 diabetes. *Cancer Lett*. 2015; 369(1): 97-102.
- Giliano N.Ya., Semenova E.G., Fedortseva R.F, Konevega L.V. Characteristic of the spontaneously transformed human endothelial cell line ECV 304. Functional responses of the ECV 304 cells. *Tsitologiya*. 2008; 50(7): 576-85. (in Russian)

**Сведения об авторах:**

**Гильяно Надежда Яковлевна**, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. медицинской биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: giliano@omrb.pnpi.spb.ru;

**Носкин Леонид Алексеевич**, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. медицинской биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: lanoskin42@mail.ru;

**Ибатуллин Фарид Миникасимович**, канд. хим. наук, зав. лаб. биоорганической и медицинской химии Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт»;

**Журишкина Елена Васильевна**, инженер, Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт»;

**Степанов Сергей Иванович**, науч. сотр. лаб. медицинской биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: stepanovsmai@gmail.com;

**Алчинова Ирина Борисовна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: alchinovairina@yandex.ru;

**Торшин Владимир Иванович**, доктор биол. наук, проф., зав. каф. нормальной физиологии Медицинского института, ФГАОУ ВО РУДН, e-mail: vtorshin@mail.ru;

**Якунина Елена Борисовна**, канд. мед. наук, ассистент каф. нормальной физиологии Медицинского института, ФГАОУ ВО РУДН, e-mail: yakunina@list.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-005.6-08

Васина Е.Ю., Чефу С.Г., Петрищев Н.Н.

## Влияние Нотромбела на развитие $\text{FeCl}_3$ -индуцированного тромбоза сонной артерии крыс

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8

**Цель работы** – изучение влияния Нотромбела (ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург, РФ) на развитие экспериментального тромбоза.

**Методика.** Опыты выполнены на крысах-самцах Вистар массой 250-270 г. Нотромбел вводили внутривенно и интрагастрально в течение 10 сут (курсовая доза 25, 50 и 100 мг/кг). В качестве препаратов сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту (АСК) и Клопидогрел (курсовая доза 10,5 и 20 мг/кг соответственно). Тромбоз сонной артерии вызывали 60-секундной аппликацией 20%  $\text{FeCl}_3$ . Кровоток регистрировали методом высокочастотной ультразвуковой доплерографии («Минимакс-Допплер-К» Санкт-Петербург, РФ, с рабочей частотой датчика 20 МГц). Прекращение кровотока рассматривали как показатель тромбоокклюзии сонной артерии.

**Результаты.** У контрольных крыс через 20-30 мин после аппликации  $\text{FeCl}_3$  кровоток в сонной артерии не определялся, что свидетельствовало о развитии тромбоза. Нотромбел как при интрагастральном, так и при внутривенном введении тормозил развитие  $\text{FeCl}_3$ -индуцированного тромбоза сонной артерии. Наиболее эффективной независимо от способа введения оказалась курсовая доза препарата 100 мг/кг, при которой ни в одном из опытов тромбоз не развивался. Антитромботический эффект Нотромбела сопоставим с эффектами АСК и Клопидогрела. В механизме антитромботического влияния Нотромбела имеют значение его прямое ингибирующее влияние на функциональную активность тромбоцитов, а также антиоксидантная активность.

**Заключение.** Нотромбел можно рассматривать как перспективный антитромботический препарат.

**Ключевые слова:** N,N'-замещенные пиперазины, Нотромбел,  $\text{FeCl}_3$ -индуцированный тромбоз, сонная артерия, ацетилсалициловая кислота, Клопидогрел.

**Для цитирования:** Васина Е.Ю., Чефу С.Г., Петрищев Н.Н. Влияние Нотромбела на развитие  $\text{FeCl}_3$ -индуцированного тромбоза сонной артерии крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 50-55.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.50-55

**Для корреспонденции:** Чефу Светлана Григорьевна, канд. биол. наук, зав. лаб. экспериментальных исследований Центра лазерной медицины, e-mail: chefusveta@yandex.ru

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

**Поступила** 26.06.2018

Vasina E.Y., Chefu S.G., Petrishchev N.N.

### The effect of Notrombel on $\text{FeCl}_3$ -induced carotid artery thrombosis in rats

I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,  
L'va Tolstogo Str. 6-8, Saint Petersburg 197022, Russia

**Aim.** To study the effect of Notrombel (ZAO Vertex, St. Petersburg, Russia), a drug of the N, N'-substituted piperazine class containing a carboximidamide group, on experimental thrombosis.

**Methods.** Experiments were carried out on male Wistar rats weighing 250-270 g. Notrombel was administered intravenously and intragastrically for 10 days (course doses 25, 50, and 100 mg/kg). Acetylsalicylic acid (ASA) and Clopidogrel (course doses 10.5 and 20 mg/kg, respectively) were used as comparator drugs. Carotid artery thrombosis was induced by a 60-s application of 20%  $\text{FeCl}_3$ . Blood flow was recorded by high-frequency ultrasonic dopplerography (Minimax-Doppler-K, St. Petersburg, RF; sensor operating frequency, 20 MHz). Stagnation of blood flow was considered as an indicator of carotid artery occlusion.

**Results.** In control rats 20-30 minutes after the application of  $\text{FeCl}_3$ , the carotid blood flow was undeterminable, which indicated development of thrombosis. Notrombel, both intragastric and intravenous, inhibited the development of  $\text{FeCl}_3$ -induced carotid thrombosis. The most effective dose was 100 mg/kg irrespective of the administration route. Thrombosis has not developed in any experiment. The antithrombotic effect of Notrombel was comparable to that of ASA and Clopidogrel. The Notrombel inhibition of platelet activity and its antioxidant properties contribute to the mechanism of Notrombel antithrombotic effect. **Conclusion:** Notrombel can be considered as a promising antithrombotic drug.

**Keywords:** N, N'-substituted piperazines, Notrombel,  $\text{FeCl}_3$ -induced thrombosis, carotid artery, Acetylsalicylic acid, Clopidogrel.

**For citation:** Vasina E.Y., Chefu S.G., Petrishchev N.N. The effect of Notrombel on FeCl<sub>3</sub>-induced carotid artery thrombosis in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 50-55. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02. 50-55

**For correspondence:** *Svetlana G. Chefu*, Candidate of Biological Sciences, Head of Experimental Research Laboratory of the Laser Medicine Center (Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 197022, Russian Federation, Saint Petersburg, L'va Tolstogo str. 6-8), e-mail: chefusveta@yandex.ru

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**Received** 26.06.2018

## Введение

Среди новых антитромботических препаратов, проходящих доклинические исследования, большой интерес представляют производные N-замещенных пиперазинов. Ранее было установлено, что один из N,N'-замещенных пиперазинов, содержащий карбоксимидамидную группу (Нотромбел, ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург, РФ), является ингибитором агрегации тромбоцитов, уменьшает экспрессию P-селектина и тромбоцитарного мембранного комплекса GPIIb-IX-V, тормозит тромбин-индуцированное образование тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов. Возможными мишенями для Нотромбела являются тромбоксановый путь передачи сигнала активации, а также непосредственно мембранные рецепторы GPIIb-IX-V [1-4]. Антитромботические свойства Нотромбела были продемонстрированы на модели фототромбоза бедренной артерии крыс [5]. Продолжая исследование в этом направлении, мы использовали модель FeCl<sub>3</sub>-индуцированного тромбоза артерий, которая рекомендуется для тестирования препаратов с потенциальным антитромботическим действием [6].

**Цель работы** – изучение влияния курсового внутривенного и интрагастрального введения препарата Нотромбел на развитие экспериментального тромбоза, индуцированного FeCl<sub>3</sub>.

## 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 Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского Университета им. акад. И.П. Павлова. Исследования проводились на крысах-самцах Вистар массой 250–270 г (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово») в соот-

ветствии с «Руководством по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» [7]. Животные содержались на стандартном рационе при свободном доступе к воде без ограничения, при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 ч. Температура поддерживалась в пределах 22–25 °С, относительная влажность – 50–70%. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 сут.

Исследуемый препарат Нотромбел вводили ненаркотизированным животным 10-кратно 1 раз в сут в фиксированный световой период (с 10.30 до 13.00). Препарат вводили вне зависимости от приема пищи:

- а-внутривенно (хвостовую вену) в течение 1 мин,
- б-интрагастрально

В качестве сравнения использовали препараты, механизм действия которых хорошо изучен:

а) ацетилсалициловую кислоту при внутривенном введении,

б) Клопидогрел – при интрагастральном введении.

Разовые дозы для введения препаратов:

Нотромбел использован в одинаковых дозах 2,5; 5,0 и 10,0 мг/кг в объеме 4 мл/кг для всех доз.

Клопидогрел – 2,0 мг/кг в объеме 4 мл/кг  
ацетилсалициловая кислота (АСК) – 1,05 мг/кг в объеме 4 мл/кг

*Приготовление растворов.*

Нотромбел для внутривенного введения растворяли в физиологическом растворе (контроль 1), при интрагастральном введении – в ацетатном буфере, содержащем 0,5 % TWIN-80 (контроль 2).

АСК (Sigma Aldrich) для внутривенного введения растворяли в воде для инъекций при нагревании (40 °С) на водяной бане при периодическом энергичном встряхивании до полного растворения кристаллов, после чего добавляли стерильный 10% раствор хлорида натрия до конечной концентрации 0,9%.

Клопидогрел для интрагастрального введения растворяли в ацетатном буфере, содержащем 0,5% TWIN-80(ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург, РФ).

Разовый объем вводимых растворов как при внутривенном, так и при интрагастральном введении составлял 4 мл/кг для всех доз.

Исследования начинали через 90 мин после 10-го интрагастрального введения препаратов и через 24 ч после завершения курса внутривенного введения препаратов. Животных наркотизировали (4,3% хлоралгидрат 10 мл/кг внутривенно). Производили разрез длиной около 3 см на передней поверхности шеи животного. Участок сонной артерии длиной около 6 мм выделяли из сосудисто-нервного пучка, подводили под него полоску пластика шириной 4 мм, изолируя тем самым окружающие ткани от воздействия FeCl<sub>3</sub>.

Модель FeCl<sub>3</sub>-индуцированного тромбоза магистральных артерий была разработана Kurz KD с соавторами в 1990 г [8]. В настоящее время для тестирования антитромботических препаратов рекомендуется использовать 20% FeCl<sub>3</sub> [9, 10].

После регистрации фонового кровотока на правую сонную артерию накладывали смоченный в 20% растворе FeCl<sub>3</sub> диск фильтровальной бумаги (фильтры обеззоленные Красная лента, ООО «Мелиор XXI») диаметром 3 мм; экспозиция составляла 60 с.

Исследование кровотока в сонной артерии проводили при помощи высокочастотной ультразвуковой доплерографии («Минимакс-Допплер-К» Санкт-Петербург, РФ, с рабочей частотой датчика 20 МГц) непосредственно перед моделированием тромбоза и в последующие 70 мин эксперимента. В случае отсутствия кровотока при повторной 2-х-кратной регистрации исследование прекращали.

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics Version 20. Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью критерия Пирсона χ-квадрат. Значения p менее чем 0,05 рассматривались как значимые.

## Результаты и обсуждение

Введение Нотромбела, АСК и Клопидогрела все животные переносили удовлетворительно. В 10-суточный период наблюдения изменений общего состояния животных не отмечено. При инъекциях и проведении хирургических манипуляций повышенной кровоточивости не наблюдалось.

У интактных животных и крыс контрольных групп (получавших внутривенно 0,9% раствор NaCl либо интрагастрально ацетатный буфер) остановка кровотока в сонной артерии наступала не позднее 30-й мин после аппликации FeCl<sub>3</sub> (табл. 1 и 2), что свидетельствует о тромбоокклюзии сосуда.

В группе животных, получавших внутривенно АСК, остановка кровотока на 30-й мин наблюдалась у 2 животных из 8 (25%), и до 70-й мин кровотоки сохранились у 5 крыс (62,5%), что свидетельствует об антитромботическом действии АСК (табл. 1).

У крыс, получавших внутривенно Нотромбел в дозе 2,5 мг/кг, окклюзия сонной артерии на 30-й мин имела место в 4 случаях из 8 (50%), на 70-й мин — у всех животных, при этом время развития тромбоза варьировало от 10 до 70 мин (табл. 1). В группе крыс, получавших внутривенно Нотромбел в дозе 5,0 мг/кг, на 30-й мин кровотоки сохранялись у 7 животных из 8 (87%), а 70-й мин — у 4 из 8 (50%) (табл. 1). У крыс, получавших внутривенно Нотромбел в дозе 10,0 мг/кг, не было зафиксировано ни одного случая тромбоокклюзии (табл. 1).

Таким образом, Нотромбел при внутривенном введении препятствовал развитию тромбоза сонной артерии, индуцированного FeCl<sub>3</sub>. Наиболее эффективной оказалась доза 10 мг/кг.

В группе животных, получавших интрагастрально Клопидогрел, на 30-й мин остановки кровотока в сонной артерии после аппликации FeCl<sub>3</sub> не наблюдалось. До 70-й мин кровотоки сохранились у 6 крыс из 8 (75%),

Таблица 1

### Влияние внутривенного введения Нотромбела и АСК на развитие FeCl<sub>3</sub>-индуцированного тромбоза в сонной артерии

Группа животных	Количество животных с наличием кровотока в сонной артерии								
	До FeCl <sub>3</sub>	Время после аппликации FeCl <sub>3</sub> , мин							
		10	20	30	40	50	60	70	
Интактные	7	7	0	0	0	0	0	0	
Контроль 1 (NaCl)	8	8	3	0	0	0	0	0	
АСК, 1,05 мг/кг	8	8	6	6**	6**	5**	5**	5**	
Нотромбел, мг/кг	2,5	8	8	5	4*	4*	2	1	0
	5,0	8	8	7*	7**	6**	5**	5**	4*
	10,0	7	7	7*	7**	7**	7**	7**	7**

Примечание. \* – p<0,05 по сравнению с контролем; \*\* – p<0,01 по сравнению с контролем.

что свидетельствует об антитромботическом действии Клопидогрела (табл. 2).

У крыс, получавших интрагастрально Нотромбел в дозе 2,5 мг/кг, остановка кровотока на 30-й мин наблюдалась в 4 из 7 опытов (57,1 %), на 70-й мин кровотока сохранялся только у одного животного (14,3 %) (табл. 2).

В группе крыс, получавших интрагастрально Нотромбел в дозе 5,0 мг/кг, на 30-й мин кровотока сохранялся у 6 животных из 7 (85,7 %) на 70-й мин – у 3 (42,9 %) (табл. 2).

У крыс, получавших интрагастрально Нотромбел в дозе 10,0 мг/кг, не было зафиксировано ни одного случая остановки кровотока (табл. 2).

Таким образом, при интрагастральном введении (как и при внутривенном) Нотромбел препятствовал развитию индуцированного  $FeCl_3$  тромбоза сонной артерии. Наиболее эффективной также оказалась доза 10 мг/кг.

По данным литературы, после аппликации  $FeCl_3$  развиваются структурные изменения во всех слоях стенки сонной артерии крыс, в том числе наблюдаются участки дезэндоотелизации [8-12]. Показано, что  $FeCl_3$  воздействует на стенку сосуда не только со стороны адвентиции, но, проникая в просвет сосуда, и со стороны ламинальной поверхности эндотелиоцитов [11, 13].

В механизме альтерации сосудистой стенки под влиянием  $FeCl_3$  имеют значение: прямое влияние на белковые структуры [13, 14]; воздействие на эритроциты и их гемолиз, окисление гемоглобина и образование редокс-активных молекул, нарушающих функции эндотелия и лейкоцитов [15, 16]; образование активных форм кислорода при железозависимой генерации свободных радикалов [16-18].

Комплексное воздействие  $FeCl_3$  на клеточные элементы крови и молекулы сосудистой стенки приводит

к образованию окклюзионного тромба, состоящего из тромбоцитов, эритроцитов и фибрина [8].

Модель  $FeCl_3$ -индуцированного тромбоза широко используется для исследования эффективности антитромботических препаратов [19–21]. Замедление  $FeCl_3$ -индуцированного тромбоза в артериях наблюдалось при профилактическом применении антикоагулянтов и антиагрегантных препаратов [9, 10, 20, 22, 23]. Известно, что Клопидогрел, являющийся селективным ингибитором пуриновых рецепторов тромбоцитов, оказывал более выраженный антитромботический эффект, чем АСК (ингибитор циклооксигеназы). При пероральном однократном введении крысам Клопидогрел (30 мг/кг) за 4 ч до аппликации  $FeCl_3$  статистически значимо замедлял тромбоокклюзию сонной артерии, а АСК в той же дозе оказалась неэффективной; при 3-х - суточном применении (курсовая доза 90 мг/кг) АСК и особенно Клопидогрел увеличивали время сохранности кровотока [9]. В нашем исследовании при применении в меньших дозах АСК (курсовая доза 10,5 мг) и Клопидогрел (20 мг) также проявляли выраженный антитромботический эффект, причем Клопидогрел увеличивал время до тромбоокклюзии в большей степени, чем АСК.

Нотромбел оказывал дозозависимый антитромботический эффект, сопоставимый с препаратами сравнения, как при внутривенном, так и при интрагастральном применении. Нотромбел, как было показано ранее, обладает выраженной антиагрегантной активностью, уменьшает тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов. Учитывая возможность влияния Нотромбела непосредственно на мембранные рецепторы GPIIb-IX-V [3], можно предположить важную роль снижения адгезии и агрегации тромбоцитов в его антитромботическом действии. Это предположение согласуется с данными других авторов. Так, использо-

Таблица 2

#### Влияние интрагастрального введения Нотромбела и Клопидогрела на развитие экспериментального тромбоза в сонной артерии

Группа животных	Количество животных с наличием кровотока в сонной артерии								
	До $FeCl_3$	Время после аппликации $FeCl_3$ , мин							
		10	20	30	40	50	60	70	
Интактные	7	7	0	0	0	0	0	0	
Контроль 2 (Ацетатный буфер)	7	7	2	0	0	0	0	0	
Клопидогрел 2,0 мг/кг	8	8	8**	8**	8**	8**	7**	6**	
Нотромбел, мг/кг	2,5	7	7	5	4*	4*	2	1	1
	5,0	7	7	7**	6**	6**	4**	3	3
	10,0	7	7	7**	7**	7**	7**	7**	7**

**Примечание.** \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* –  $p < 0,01$  по сравнению с контролем.

вание метода прижизненной биомикроскопии показало, что Анфибатид — антагонист GPIb рецепторов тромбоцитов — замедлял FeCl<sub>3</sub>-индуцированный тромбоз в мезентериальных сосудах крыс [21].

Антитромботическая активность Нотромбела, выявленная нами на модели FeCl<sub>3</sub>-индуцированного тромбоза сонной артерии, по-видимому, связана как с прямым влиянием на тромбоциты и снижением их функциональной активности [1-3], так и с антиоксидантным действием, учитывая роль активных форм кислорода в механизме повреждения эндотелия [24].

**Заключение.** Нотромбел как при интрагастральном, так и при внутривенном введении тормозил развитие FeCl<sub>3</sub>-индуцированного тромбоза сонной артерии. Наиболее эффективной оказалась доза 10 мг/кг. Нотромбел можно рассматривать как перспективный антитромботический препарат.

Авторы выражают благодарность ЗАО «ВЕРТЕКС» за предоставленный для проведения исследования препарат Нотромбел.

### Литература

1. Весёлкина О.С., Викторов Н.Б., Петрищев Н.Н., Поплавская Ю.В. Вещество, обладающее сочетанной антиагрегантной, антикоагулянтной и вазодилаторной активностью, N,N'-замещенные пиперазины и способ их получения. Патент 2 469 029.
2. Весёлкина О.С., Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Боровитов М.Е., Селютин А.В., Чепанов С.В., Сельков С.А. Влияние новых соединений, N,N'-замещенных пиперазинов, на тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2014; 77(8): 28-33.
3. Весёлкина О.С., Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Боровитов М.Е., Селютин А.В., Чепанов С.В., Сельков С.А. Влияние препарата Нотромбел на экспрессию мембранного комплекса GPIb-IX-V тромбоцитами, активированными тромбином. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102(5): 590-6.
4. Весёлкина О.С., Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Боровитов М.Е., Селютин А.В., Чепанов С.В., Сельков С.А. Влияние препарата Нотромбел на тромбин-индуцированное образование тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2017; 103(3): 318-26.
5. Васина Е. Ю., Чефу С. Г., Петрищев Н. Н., Веселкина О. С. Влияние препарата Нотромбел на процесс фотоиндуцированного тромбообразования. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2017; 16(3): 70-5. doi: 10.24884/1682-6655-2017-16-3-70-75.
6. Миронов А.Н., ред. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*; Часть 1. М.; Гриф и К; 2012.
7. Белозерцева И.В., Драволина О.А., Тур М.А.; под ред. Э.Э. Звартау. *Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*; СПб; издательство СПбГМУ, 2014.
8. Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res*. 1990; 60(4): 269-80.
9. Surin WR, Prakash P, Barthwal MK, Dikshit M. Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: effect of anti-platelet and anti-coagulant drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010; 61(3): 287-91. doi: 10.1016/j.vascn.2009.11.002.
10. Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M., Cszenave J-P, Lanza F et al. Mechanisms underlying FeCl<sub>3</sub>-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011; 9(4): 779-89. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04218.x.
11. Tseng MT, Dozier A, Haribabu B, Graham UM. Transendothelial migration of ferric ion in FeCl<sub>3</sub> injured murine common carotid artery. *Thromb Res*. 2006; 118(2): 275-80.
12. Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT. Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(10): 2079-93. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.142810.
13. Ciciliano JC, Sakurai Y, Myers DR, Fay ME, Hechler B, Meeks S, et al. Resolving the multifaceted mechanisms of the ferric chloride thrombosis model using an interdisciplinary microfluidic approach. *Blood*. 2015; 126(6): 817-24. doi: 10.1182/blood-2015-02-628594.
14. Hoeschele JD, Turner JE, England MW. Inorganic concepts relevant to metal binding, activity, and toxicity in a biological system. *Sci Total Environ*. 1991; 109-110: 477-92.
15. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005; 293(13): 1653-62. DOI: 10.1001/jama.293.13.1653.
16. Woollard KJ, Sturgeon S, Chin-Dusting JP, Jackson S.P, Salem HH. Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury. *J Biol Chem*. 2009; 284(19): 13110-8. doi: 10.1074/jbc.M809095200.
17. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. 2001; 98(6): 1802-11. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V98.6.1802.
18. Graça-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood*. 2002; 99(11): 4160-5. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V99.11.4160.
19. Damiano BP, Mitchell JA, Giardino E, Corcoran T, Haertlein BJ, de Garavilla L, et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of RWJ-53308, a novel orally active glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Thromb Res*. 2001; 104(2): 113-26.
20. Митина Т.М., Яковлев Д.С., Спасов А.А., Суздаев К.Ф. антиагрегантная и антитромботическая активности нового P2Y<sub>1</sub>-антагониста — соединения Sbt-119 ex и in vivo. *Вестник ВолГМУ*. 2011; 4 (40): 19-21.
21. Lei X, Reheman A, Hou Y, Zhou H, Wang Y, Marshall AH et al. Anfibatide, a novel GPIb complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo in murine models of thrombosis. *Thromb Haemost*. 2014; 111(2): 279-89. doi: 10.1160/TH13-06-0490.
22. Lockyer S, Kambayashi J. Demonstration of Flow and Platelet Dependency in a Ferric Chloride-Induced Model of Thrombosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1999; 33(5): 718-725.
23. Kawamura Y, Takahari Y, Tamura N, Eguchi Y, Urano T, Ishida H, Goto S. Imaging of structural changes in endothelial cells and thrombus formation at the site of FeCl<sub>3</sub>-induced injuries in mice cremasteric arteries. *J Atheroscler Thromb*. 2009; 16(6): 807-14.
24. Веселкина О.С., Соловцова И.Л., Петрищев Н.Н., Галебская Л.В., Боровитов М.Е., Нилов Д.И. и др. Влияние N,N'-замещенных пиперазинов на цитолиз. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015; 49(11): 25-31.

## References

- Vesvolkina O.S., Viktorov N.B., Petrishchev N.N., Poplavskaya YU.V. A substance that has a combined antiplatelet, anticoagulant and vasodilator activity, N, N'-substituted piperazines, and a process for their preparation. Patent 2 469 029. (in Russian)
- Vesvolkina O.S., Petrishchev N.N., Vasina L.V., Borovitev M.E., Selyutin A.V., Chepanov S.V., Sel'kov S.A. Influence of New N,N'-Substituted Piperazines on Thrombin-Induced Platelet Activation. *Eksperim klin farmakologiya*. 2014; 77 (8): 28-33. (in Russian)
- Vesvolkina O.S., Petrishchev N.N., Vasina L.V., Borovitev M.E., Selyutin A.V., Chepanov S.V., Sel'kov S.A. Nothrombel effect on the expression of membrane complex gpIb-ix-v platelets activated by thrombin. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal imeni I.M. Sechenova*. 2016; 102 (5): 590-596. (in Russian)
- Vesvolkina O.S., Petrishchev N.N., Vasina L.V., Borovitev M.E., Selyutin A.V., Chepanov S.V., Sel'kov S.A. Nothrombel effect on the formation of platelet-leukocyte complexes induced by thrombin. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal imeni I.M. Sechenova*. 2017; 103(3): 318-26. (in Russian)
- Vasina E.Y., Chefu S.G., Petrishchev N.N., Veselkina O. S. The influence of Notrombel on the process of photo-induced thrombogenesis. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2017; 16(3): 70-5. doi: 10.24884/1682-6655-2017-16-3-70-75. (in Russian)
- A guide to preclinical drug research. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv; CHast' I].* Ed. A.N. Mironov. Part one. Moscow; Grief and K, 2012. (in Russian)
- Guidelines for the use of laboratory animals for scientific and educational purposes in the PSPbGMU them. acad. I.P. [Pavlova Rukovodstvo po ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh dlya nauchnykh i uchebnykh tseley v PSPbGMU im. akad. I.P. Pavlova].* Belozertseva IV, Dravalina OA, Tour MA; Ed. E.E. Zvartau. St. Petersburg, publishing house SPbGMU, 2014. (in Russian)
- Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res*. 1990; 60(4): 269-80.
- Surin WR, Prakash P, Barthwal MK, Dikshit M. Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: effect of anti-platelet and anti-coagulant drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010; 61(3): 287-91. doi: 10.1016/j.vascn.2009.11.002.
- Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M., Csenave J-P, Lanza F et al. Mechanisms underlying FeCl<sub>3</sub>-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011; 9(4): 779-89. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04218.x.
- Tseng MT, Dozier A, Haribabu B, Graham UM. Transendothelial migration of ferric ion in FeCl<sub>3</sub> injured murine common carotid artery. *Thromb Res*. 2006; 118(2): 275-80.
- Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT. Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(10): 2079-93. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.142810.
- Ciciliano JC, Sakurai Y, Myers DR, Fay ME, Hechler B, Meeks S, et al. Resolving the multifaceted mechanisms of the ferric chloride thrombosis model using an interdisciplinary microfluidic approach. *Blood*. 2015; 126(6): 817-24. doi: 10.1182/blood-2015-02-628594.
- Hoeschele JD, Turner JE, England MW. Inorganic concepts relevant to metal binding, activity, and toxicity in a biological system. *Sci Total Environ*. 1991; 109-110: 477-92.
- Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005; 293(13): 1653-62. DOI: 10.1001/jama.293.13.1653.
- Woollard KJ, Sturgeon S, Chin-Dusting JP, Jackson S.P, Salem HH. Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury. *J Biol Chem*. 2009; 284(19): 13110-8. doi: 10.1074/jbc.M809095200.
- Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. 2001; 98(6): 1802-11. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V98.6.1802.
- Graça-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood*. 2002; 99(11): 4160-5. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V99.11.4160.
- Damiano BP, Mitchell JA, Giardino E, Corcoran T, Haertlein BJ, de Garavilla L, et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of RWJ-53308, a novel orally active glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Thromb Res*. 2001; 104(2): 113-26.
- Mitina T.M., Yakovlev D.S., Spasov A.A., Suzdalev K. Ph. Antiaggregant and antithrombotic activity of new substance P2Y<sub>1</sub>-antagonists - SBT-119 ex and in vivo. *Vestnik of VolgGMU*. 2011; 4 (40): 19-21. (in Russian)
- Lei X, Reheman A, Hou Y, Zhou H, Wang Y, Marshall AH et al. Anfibatide, a novel GPIIb complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo in murine models of thrombosis. *Thromb Haemost*. 2014; 111(2): 279-89. doi: 10.1160/TH13-06-0490.
- Lockyer S, Kambayashi J. Demonstration of Flow and Platelet Dependency in a Ferric Chloride-Induced Model of Thrombosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1999; 33(5): 718-25.
- Kawamura Y, Takahari Y, Tamura N, Eguchi Y, Urano T, Ishida H, Goto S. Imaging of structural changes in endothelial cells and thrombus formation at the site of FeCl<sub>3</sub>-induced injuries in mice cremasteric arteries. *J Atheroscler Thromb*. 2009; 16(6): 807-14.
- Veselkina O. S., Solovcova I. L., Petrishchev N. N., Galebskaya L.V., Borovitev M. E., Nilov D. I. et al. Effect of NN-substituted piperazines on cytolysis. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2015; 49(11): 25-31. (in Russian)

## Сведения об авторах:

**Васина Елена Юрьевна**, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии (Первый СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова), e-mail: elenavasina17@gmail.com;

**Чefу Светлана Григорьевна**, канд. биол. наук, зав. лаб. экспериментальных исследований Центра лазерной медицины (Первый СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова), e-mail: chefusveta@yandex.ru;

**Петрищев Николай Николаевич**, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии (Первый СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова), e-mail: lasmed@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Тишевская Н.В.<sup>1</sup>, Бабаева А.Г.<sup>2</sup>, Геворкян Н.М.<sup>3</sup>

## Сравнительный анализ гемопоэтической активности суммарной РНК костного мозга и лимфоидных клеток селезенки при хронической бензолной анемии у крыс

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», 454092, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64;

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

<sup>3</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», 119121, г. Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8

**Цель** – оценка лечебных свойств суммарной РНК на модели хронической гипопластической анемии, выявление особенностей гемопоэтического действия суммарных РНК, выделенных из костного мозга и лимфоидных клеток селезенки.

**Методика.** Работа выполнена на 36 белых беспородных крысах-самках массой 130-250 г. Хроническую токсическую анемию моделировали подкожным введением смеси химически чистого бензола (0,05 мл/100 г) и стерильного растительного масла. Смесь вводили трижды с интервалом в 7 сут. Контрольным животным (группа 1 в каждой серии) в эти же сроки внутривенно вводили равное по объему количество 0,9% раствора NaCl. Выполнено 2 серии экспериментов. В 1-й серии оценивали гемопоэтическую активность суммарных РНК лимфоидных клеток селезенки, во 2-й — суммарных РНК костного мозга. Препараты суммарной РНК получали из костного мозга и лимфоидных клеток селезенки интактных крыс, а также из клеток тех же органов крыс, подвергнутых кровопусканию (2% от массы тела) за 17 ч до выделения из них РНК. Суммарную РНК выделяли методом гуанидин тиоцианат–фенол–хлороформной экстракции.

Для выяснения влияния суммарных РНК на состояние эритроидного роста костного мозга в препаратах, окрашенных по Паппенгейму, оценивали количественный и качественный состав эритроидных островков.

**Результаты.** Сравнение гемопоэтической активности суммарных РНК, выделенных из костного мозга и лимфоидных клеток селезенки здоровых животных, при их введении крысам с экспериментальной хронической бензолной анемией, показало, что различия клеточного состава лимфоидных органов-источников РНК отражается на их гемопоэтических свойствах. Суммарная РНК из лимфоидных клеток селезенки интактных животных в первую очередь способствует восстановлению количества лейкоцитов, в то время как суммарная РНК лимфоидных клеток костного мозга в начальный период регенерации не оказывает заметного влияния на лейкопоз. Показано также, что суммарная РНК, выделенная из костного мозга, в целом обеспечивает более интенсивный процесс гемопоэза. Кроме того, обнаружена более высокая эритропоэтическая активность суммарных РНК, выделенных из клеток обоих лимфоидных органов крыс-доноров, стимулированных кровопотерей, по сравнению с таковой суммарных РНК, полученных из органов интактных крыс.

**Заключение.** Подтверждена гемопоэтическая активность суммарной РНК костного мозга и лимфоидных клеток селезенки при гипопластической анемии. Выявлена более высокая эритропоэтическая активность суммарных РНК обоих лимфоидных органов животных после кровопускания по сравнению с их лейкопоэтической активностью.

**Ключевые слова:** гипопластическая анемия; бензол; суммарная РНК; гемопоэз; эритробластические островки.

**Для цитирования:** Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Сравнительный анализ гемопоэтической активности суммарной РНК костного мозга и лимфоидных клеток селезенки при хронической бензолной анемии у крыс.

*Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 56-64.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 56-64

**Для корреспонденции:** Геворкян Нина Михайловна, e-mail: gevorgiann@yandex.ru

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

**Поступила** 19.02.2018

Tishevskaya N.V.<sup>1</sup>, Babaeva A.G.<sup>2</sup>, Gevorkyan N.M.<sup>3</sup>

## Comparative analysis of hematopoietic activity of total RNA from bone marrow cells and splenocytes of rats with chronic benzene-induced anemia

<sup>1</sup>South Ural State Medical University, Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk 45409, Russia;

<sup>2</sup>Research Institute of Human Morphology, Tsuryupy Str. 3, Moscow 117418, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya Str. 10, Moscow 119121, Russia

**Aim.** To evaluate therapeutic properties of total RNA on a model of chronic hypoplastic anemia and to elucidate features of the hemopoietic effect of total RNA isolated from bone marrow splenic lymphoid cells.

**Methods.** Experiments were performed on 36 white mongrel rats weighing 230-250 g. Chronic toxic anemia was induced by subcutaneous injections of a mixture of chemically pure benzene (0.05 ml/100 g) and sterile vegetable oil. The mixture was injected three times with an interval of 7 days. Control animals (group 1 in each series) received intravenous injections of an equal volume of saline at the same time intervals. Two experimental series were performed. In series 1 and 2, hemopoietic activity of total RNAs from splenic lymphoid cells and from bone marrow, respectively, was evaluated. Total RNA was obtained from splenic lymphoid cells and from bone marrow of intact rats and rats subjected to hemorrhage (2% of body weight) 17 h prior to the RNA isolation. Total RNA was isolated by guanidine-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. The effect of total RNA on the erythroid lineage in the bone marrow was evaluated by the quantitative and qualitative composition of erythroid islets in Pappenheim-stained preparations. **Results.** Comparing the hematopoietic activity of total RNA isolated from bone marrow and splenic lymphoid cells of healthy animals and administered to rats with experimental chronic benzene anemia showed that the difference in cell composition of the lymphoid organs, sources of the RNAs, impacted on the RNA hemopoietic properties. The total RNA from splenic lymphoid cells of intact animals contributed primarily to the recovery of leukocyte count while the RNA from the bone marrow of intact rats did not significantly influence leukopoiesis during the early regeneration period. It was also shown that the total RNA extracted from the bone marrow generally provided a more intensive hemopoiesis. In addition, the erythropoietic activity of total RNA isolated from the cells of both lymphoid organs of the donor rats stimulated by blood loss was higher than that of the total RNA isolated from intact rats.

**Conclusion.** The total RNA isolated from bone marrow and lymphoid cells spleen exerted a hemopoietic effect in hypoplastic anemia. The erythropoietic activity of total RNA from both lymphoid organs of animals after hemorrhage was higher than the RNA leukopoietic activity.

**Keywords:** hypoplastic anemia; benzene; total RNA; hemopoiesis; erythroblastic islets.

**For citation:** Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. Comparative analysis of hematopoietic activity of total RNA from bone marrow cells and splenocytes of rats with chronic benzene-induced anemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63 (2): 56-64. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 56-64

**For correspondence:** Gevorkyan N.M., e-mail: gevorkiann@yandex.ru

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

**Received** 19.02.2018

Ранее при изучении особенностей развития эритроидных клеток в эритробластических островках (ЭО) костного мозга было установлено, что суммарная РНК нормальных и особенно стимулированных кровопотерей лимфоидных клеток селезенки обладает высокой эритропоэтической активностью [1–3]. Показано, что суммарные РНК костного мозга (КМ) и тимуса [4, 5] обладают выраженной гемопоэтической активностью при остром нарушении процесса кроветворения: на фоне однократного гамма-облучения в сублетальной дозе внутривенное (в/в) введение суммарных РНК КМ и тимуса у подопытных крыс вызывало быстрое и полное восстановление нормальной численности форменных элементов периферической крови. В данных пу-

бликациях продемонстрирована особенно высокая эффективность суммарных РНК, выделенных из активированных кровопотерей лимфоидных клеток, в отношении восстановления кроветворения при острых нарушениях гемопоэза. Это послужило основанием для изучения возможности использования гемостимулирующих свойств подобных препаратов РНК для коррекции хронических нарушений кроветворения, вызванных, например, бензольной интоксикацией. Лечение этих состояний, как известно, протекает медленно и далеко не всегда завершается полной нормализацией клеточного состава КМ и периферической крови [6, 7], поэтому потребность в препаратах, обладающих высокой гемопоэтической активностью, осо-

бенно высока, и поиски их до настоящего времени продолжают оставаться актуальными.

Цель — изучение лечебных свойств суммарной РНК на модели хронической гипопластической анемии и выявление особенностей гемопоэтического действия суммарных РНК, селезенки и костного мозга.

### Методика

Эксперименты выполнены в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики», утвержденным и введенным в действие Приказом Ростехрегулирования от 02.12.2009 (№ 544-ст, ГОСТ Р 53434-2009). Работа одобрена локальным этическим комитетом Южно-Уральского ГМУ.

Работа выполнена на 36 белых беспородных крысах-самках массой 130—250 г. Все манипуляции с животными производили под эфирным наркозом, включая и эвтаназию, осуществляемую путем цервикальной дислокации.

Препараты суммарной РНК получали из лимфоидных клеток селезенки и из костного мозга интактных крыс (препараты РНКс-1 и РНКкм-1), а также из клеток тех же органов крыс после кровопускания (2% от массы тела) за 17 ч до выделения из них суммарных РНК (препарат РНКс-2 и РНКкм-2). Суммарную РНК выделяли методом гуанидин тиоцианат—фенол—хлороформной экстракции [8].

Для выяснения влияния препаратов суммарных РНК на состояние эритроидного ростка костного мозга в препаратах, окрашенных по Паппенгейму, оценивали количественный и качественный состав эритроидных островков (ЭО). В препаратах подсчитывали количество ЭО, разделяя их на 5 классов зрелости [9]. При оценке состояния эритропоэза показателем стимуляции развития эритроидного ростка служило статистически значимое увеличение числа ЭО1, ЭО2 и ЭОрек, а также уменьшение числа ЭОинв, тогда как снижение числа ЭО1, ЭО2 и ЭОрек наряду с увеличением количества ЭОинв, напротив, указывало на торможение процессов пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток [10, 11].

Для моделирования хронической токсической анемии всем животным трижды, с интервалом в 7 сут, подкожно вводили равную по объему смесь химически чистого бензола (0,05 мл/100 г) и стерильного растительного масла.

Тестируемые препараты суммарной РНК начинали вводить животным через 28 сут после последней инъекции бензола. Обе серии опытов выполнялись по одинаковой схеме и в одинаковых условиях. В каждой

серии животные были разделены на 3 группы, по 6 крыс в каждой: 1-я группа — контроль (бензольная анемия); 2-я — животные с бензольной анемией, получившие препарат суммарной РНК интактных животных селезенки или костного мозга (РНКс-1 или РНК-1); 3-я — животные с бензольной анемией, получившие препараты суммарных РНК от животных с кровопотерей (РНКс-2 или РНКкм-2), выделенные на стадии проявления лимфоцитами стимулирующей морфогенетической активности в отношении кроветворения (17 ч после кровопотери). Суммарную РНК вводили в/в, трижды (с интервалом в 10 сут), в дозе 15 мкг/100 г массы тела. Контрольным животным (группа 1 в каждой серии) в эти же сроки в/в вводили равное по объему количество 0,9% раствора NaCl.

Контроль численности форменных элементов периферической крови проводили каждые 10 сут. Животные первой серии были выведены из эксперимента через 110 сут после начала введения препаратов РНК, а второй — через 40 сут.

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке с помощью компьютерной программы IBM SPSS Statistics 19,0. Сравнения групп проводились методами непараметрической статистики с использованием критериев Манна-Уитни и хи-квадрат.

### Результаты и обсуждение

До начала эксперимента все крысы имели нормальные для данного вида животных показатели периферической крови: эритроциты —  $9,8 \pm 1,5$  ( $10^{12}/л$ ); ретикулоциты —  $46,7 \pm 3,2$  ( $10^9/л$ ); лейкоциты —  $11,5 \pm 1,1$  ( $10^9/л$ ); тромбоциты —  $468,6 \pm 23,2$  ( $10^9/л$ ). После введения бензола, начиная с 7-х сут снижалось число форменных элементов крови у животных. К 28-м сут количество эритроцитов составляло  $6,7 \pm 0,4$  ( $10^{12}/л$ ); ретикулоцитов —  $5,9 \pm 1,1$  ( $10^9/л$ ); лейкоцитов —  $2,6 \pm 0,4$  ( $10^9/л$ ); тромбоцитов —  $93,1 \pm 7,9$  ( $10^9/л$ ).

Динамика изменения численности этих клеток в крови контрольных и подопытных крыс (1-я серия) после введения суммарной РНКс-1 или РНКс-2 представлена в **табл. 1**.

Несмотря на значительный срок, прошедший после последней инъекции бензола, число форменных элементов крови у контрольных животных, не получавших препараты РНК, продолжало сохраняться на низком уровне и имело тенденцию к дальнейшему снижению вплоть до 70-х сут, когда появились первые признаки спонтанной коррекции гемопоэза.

У подопытных крыс первая же инъекция РНКс-2 привела к достоверному двукратному увеличению числа ретикулоцитов в крови. После второй инъекции ко-

личество ретикулоцитов возросло в 3 раза, число тромбоцитов – в 1,4 раза. После 3-й инъекции РНКс-2 число ретикулоцитов продолжало увеличиваться – этот показатель в опытной группе уже в 5 раз превышал контрольное значение. На 40-е сут после начала введения РНКс-2 стимуляция эритропоэза отразилась и на количестве эритроцитов – этот показатель статистически значимо превысил контрольное значение и

достиг нижней границы нормы, характерной для этого вида животных.

В целом восстановление числа форменных элементов крови начиналось быстрее и на большинстве сроков оказывалось более чем в 2 раза интенсивнее, чем у крыс, получавших препарат РНКс-1, и в 7 раз быстрее, чем у крыс, не получавших суммарную РНК. Через 60 сут после начала введения препарата РНКс-2 (40-е сут

Таблица 1

## Динамика показателей периферической крови у крыс с бензольной анемией после введения суммарной РНК лимфоцитов селезенки

	Срок после введения РНК	Эритроциты (x 10 <sup>12</sup> /л)	Ретикулоциты (x 10 <sup>9</sup> /л)	Лейкоциты (x 10 <sup>9</sup> /л)	Тромбоциты (x 10 <sup>9</sup> /л)
Контроль	10 сут	6,4±0,4	6,1±0,8	2,5±0,5	94,2±6,3
РНКс-1		6,4±0,7	9,9±1,2	2,7±0,4	100,3±5,8
РНКс-2		6,5±0,5	12,4±2,3*	2,7±0,5	118,7±10,2
Контроль	20 сут	6,6±0,5	6,3±0,8	2,6±0,6	89,3±9,1
РНКс-1		6,8±0,7	8,8±0,9	8,9±0,3*	104,5±8,9
РНКс-2		7,0±0,8	18,5±1,2*■	3,0±0,5■	127,8±9,2*
Контроль	30 сут	5,9±0,7	5,9±0,6	2,8±0,6	90,9±7,5
РНКс-1		5,8±0,9	10,9±0,7*	9,3±0,7*	109,9±7,7
РНКс-2		7,2±0,5	26,1±1,4*■	3,2±0,1■	140,3±9,6*■
Контроль	40 сут	5,5±0,4	4,1±0,3	2,9±0,5	106,1±9,4
РНКс-1		6,0±0,3	11,2±0,5*	10,0±0,4*	122,4±8,1
РНКс-2		7,8±0,5*	29,2±1,1*■	3,7±0,3■	177,5±10,3*■
Контроль	50 сут	4,8±0,6	4,2±0,4	3,1±0,7	98,6±8,8
РНКс-1		6,4±0,6	15,5±0,6*	10,2±0,8*	150,8±10,1*
РНКс-2		7,8±0,5*	30,1±1,5*■	4,4±0,4■	214,4±11,2*■
Контроль	60 сут	4,7±0,3	4,2±0,5	3,1±0,5	102,8±8,7
РНКс-1		6,5±0,7	19,4±1,1*	10,1±0,6*	168,9±9,9*
РНКс-2		7,8±0,4*	32,8±1,6*■	4,9±0,5■	225,6±12,0*■
Контроль	70 сут	5,3±0,5	6,7±1,1	3,8±0,4	124,5±11,3
РНКс-1		6,9±0,8	18,5±2,3*	11,3±1,2*	170,7±10,1*
РНКс-2		7,9±0,9*	35,1±2,2*■	6,3±1,3■	219,9±9,9*■
Контроль	80 сут	5,6±0,6	7,2±0,8	4,3±0,5	139,7±15,6
РНКс-1		6,5±0,4	20,2±3,1*	10,2±0,8*	183,2±12,8*
РНКс-2		7,7±0,8*	36,6±2,7*■	8,8±1,6*	226,9±13,3*
Контроль	90 сут	6,9±0,5	12,1±1,3	6,7±0,8	188,9±12,2
РНКс-1		6,9±0,6	24,4±2,2*	10,3±1,8	214,1±18,2
РНКс-2		7,5±0,9	39,3±2,5*■	10,1±1,7	239,3±11,9*
Контроль	100 сут	6,7±0,7	19,1±1,5	6,5±0,7	194,4±13,6
РНКс-1		7,1±0,5	26,6±2,5	9,9±1,6	229,5±14,1
РНКс-2		7,4±1,2	38,8±4,7*■	10,5±1,9	248,4±14,8
Контроль	110 сут	7,0±0,5	27,4±2,8	6,6±0,9	223,7±15,5
РНКс-1		6,8±0,8	33,3±3,7	9,6±1,3	245,4±15,7
РНКс-2		7,1±1,1	38,2±3,9	10,5±1,9*	260,4±17,3

**Примечание.** \* – достоверные различия между показателями животных контрольной и опытных групп; ■ – достоверные различия между эффектами РНКс-1 и РНКс-2;  $p < 0,05$ .

после последней инъекции) количество ретикулоцитов увеличилось в 8 раз, эритроцитов – в 1,7 раза, а тромбоцитов – более чем в 2 раза. В отличие от крыс, получавших препарат РНКс-2, введение препарата РНКс-1 в первую очередь отразилось на количестве лейкоцитов в периферической крови, которое значительно увеличилось на 20-е сут после начала лечения, а к 40-м сут этот показатель превысил контрольное значение в 3 раза. К 50-м сут у животных этой группы наблюдалось отчетливое улучшение картины периферической крови по всем трем росткам кроветворения: почти в 4 раза возросло число ретикулоцитов, в 3 раза – количество лейкоцитов и в 1,5 раза – количество тромбоцитов, что дает основание говорить о стимулирующей гемопозитической активности суммарной РНК, полученной из лимфоидных клеток не только анемизированных, но и интактных животных.

К концу наблюдения все показатели, кроме уровня тромбоцитов, вошли в интервал референсных для

этого вида животных значений. При этом наилучшие результаты все же наблюдались у крыс, получивших инъекции препарата РНКс-2.

В отношении эритроидного роста кроветворения это получило подтверждение после изучения особенностей формирования ЭО в костном мозге (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о полноценном восстановлении темпа развития ЭО у крыс с бензольной анемией, получивших суммарную РНК лимфоидных клеток селезенки, стимулированных 2%-ой кровопотерей. Все три показателя активной пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток в ЭО – увеличение числа островков с пролиферирующими клетками в «короне» (ЭО1 и ЭОрек) и уменьшение количества зрелых ЭОинв – указывают на полную коррекцию экспериментально угнетенного эритропоэза у крыс, получивших РНКс-2, в отличие от группы, получавшей препарат РНКс-1, и группы без воздействия препаратов.

Таблица 2

**Влияние суммарных РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз в ЭО костного мозга крыс с бензольной анемией**

Показатели	Интактные крысы	Контроль	РНКс-1	РНКс-2
Абсолютное количество ЭО (10 <sup>3</sup> /бедр. кость)	254,6±4,4	175,3±8,6□	238,2±4,5*	249,1±3,6*
% ЭО1	5,4±0,7	3,1±0,1□	4,7±0,3*	5,5±0,1*
% ЭО2	8,2±0,6	4,6±0,2□	6,5±0,2*	7,0±0,2*
% ЭО3	25,0±0,8	19,8±0,4□	22,4±0,2	23,9±0,2*
% ЭОинв	50,2±1,4	64,7±0,2□	55,1±0,5*□	51,2±0,3*■
% ЭОрек	11,2±0,7	8,3±0,1□	10,3±0,2*	13,1±0,2*■

**Примечание.** \* – статистически значимые различия между опытными и контрольной группами; ■ – статистически значимые различия между эффектами РНКс-1 и РНКс-2; □ – статистически значимые различия по отношению к показателям интактных крыс (p<0,05).

Таблица 3

**Показатели периферической крови у крыс с бензольной анемией после введения суммарной РНК костного мозга**

	Срок после введения РНК	Эритроциты (x 10 <sup>12</sup> /л)	Ретикулоциты (x 10 <sup>9</sup> /л)	Лейкоциты (x 10 <sup>9</sup> /л)	Тромбоциты(x 10 <sup>9</sup> /л)
Контроль	10 сут	5,4±0,1	6,0±0,2	2,4±0,3	90,8±5,3
РНКкм-1		5,8±0,2	10,4±0,2*	2,7±0,1*	109,2±4,3*
РНКкм-2		6,1±0,2	19,1±0,3*■	4,3±0,1■*	128,5±5,8*
Контроль	20 сут	5,4±0,1	5,8±0,4	2,3±0,1	94,6±3,1
РНКкм-1		6,1±0,1*	15,3±0,2*	2,8±0,1*	115,2±4,6*
РНКкм-2		6,3±0,1*	28,5±0,3*■	5,1±0,2*■	148,7±2,4*■
Контроль	30 сут	5,2±0,1	5,9±0,1	2,5±0,3	92,4±2,8
РНКкм-1		6,7±0,2*	26,1±0,1*	5,9±0,2*	149,2±0,9*
РНКкм-2		6,9±0,3*	36,7±0,4*■	7,5±0,4*■	199,6±1,5*■
Контроль	40 сут	5,2±0,1	8,3±0,1	3,1±0,2	96,3±1,6
РНКкм-1		7,2±0,2*	22,8±0,2*	6,2±0,2*	168,7±1,1*
РНКкм-2		7,3±0,1*	39,5±0,2*■	7,9±0,3*■	212,5±1,4*■

**Примечание.** \* – статистически значимые различия между показателями животных контрольной и опытных групп; ■ – статистически значимые различия между эффектами РНКкм-1 и РНКкм-2 (p<0,05).

В задачу 2-й серии эксперимента входило выяснение вопроса, обладает ли гемопоэтической активностью (и в какой степени) РНКкм. Из представленных в таблице 3 результатов следует, что и РНКкм-1, и РНКкм-2 бесспорно обладают гемопоэтической активностью, которая в целом несколько выше, чем активность препаратов РНКс-1 и РНКс-2.

Стимулирующее действие костномозговых РНК проявлялось несколько раньше, и после их введения наблюдался более выраженный рост численности форменных элементов периферической крови. Можно предполагать, что это обусловлено наличием в костном мозге-источнике РНК ранних предшественников гемопоэза. Помимо этого, указанный эффект может быть связан также с наличием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в костном мозге – источнике РНК. Так, описано преимущественное поступление трансплантированных ММСК из периферической крови в те ткани, которые подверглись наибольшему повреждению, в частности, костный мозг после острой кровопотери [12]. Следовательно, сходным образом может вести себя и суммарная РНК из ММСК, выраженная эритропоэтическая активность которой *in vitro* была продемонстрирована нами ранее [13].

При исследовании качественного состава ЭО костного мозга крыс, получивших РНКкм-2, было установлено, что к 40-м сут пролиферативная активность эритроидных клеток полностью восстановилась, и темп формирования ЭО соответствовал физиологическому (табл. 4).

Проведенное нами исследование дает все основания утверждать, что суммарная РНК, выделенная как из костного мозга, так и из лимфоидных клеток селезенки, обладает ярко выраженными гемопоэтическими свойствами, которые обеспечивают коррекцию нарушений кроветворения, вызванных токсическим действием бензола.

В реализации регуляторных функций суммарных РНК существенную роль могут играть, в частности, малые некодирующие РНК. В последние годы многие неясные эффекты РНК приписывают действию различных микроРНК, хотя прямых данных, доказывающих такую взаимосвязь, пока нет. Отсутствие разнонаправленности действия препаратов костного мозга интактных и анемизированных животных (РНКкм-1 и РНКкм-2), которая у РНКс-1 и РНКс-2 выражалась в том, что РНКс-1 сначала стимулировала восстановление «белых» клеток в периферической крови и только потом «красных», послужило основанием для проведения электрофоретического анализа с целью определения соотношения фракций низкомолекулярных РНК в полученных нами препаратах. Оказалось, что по их процентному содержанию РНКкм-1 и РНКкм-2 гораздо меньше отличались друг от друга, чем РНКс-1 и РНКс-2. Так, если суммарная РНК лимфоидных клеток интактной селезенки содержала в 4 раза больше молекул с числом нуклеотидов менее 100, то различия между содержанием этих молекул в препаратах РНКкм-1 и РНКкм-2 составляли всего 20%. Зависит ли от этого указанная особенность действия препарата РНКс-1, пока остается неясным, хотя полученные данные свидетельствуют в пользу наличия связи между обнаруженными нами функциональными особенностями РНКс-1 и особенностями ее фракционного состава.

Первые исследования, в которых говорится об изменении экспрессии микроРНК в клетках костного мозга при бензольной интоксикации, появились совсем недавно. Установлено, что в полипотентных стволовых клетках костного мозга мышей с бензольной анемией экспрессия 50 микроРНК увеличивается, а 45 других снижается [14]. При этом значительно возрастает количество микроРНК-451, которая участвует в регуляции развития клеток эритроидного ряда [15], синтезе гемоглобина в эритроблестах [16], а также в

Таблица 4

## Влияние суммарной РНК костного мозга анемизированных крыс на эритропоэз в ЭО костного мозга крыс с бензольной анемией

Показатели	Интактные крысы	Контроль	РНКкм-2
Абсолютное количество ЭО ( $10^3$ /бедр. кость)	264,5±18,8	106,4±8,8□	228,4±16,1*
% ЭО1	4,7±0,9	0□	4,2±0,4*
% ЭО2	6,3±1,2	2,1±0,3□	5,9±1,1*
% ЭО3	25,3±3,6	15,7±2,5□	24,1±2,8*
% ЭОинв	51,1±8,3	75,6±7,2□	53,5±5,6*
% ЭОрек	12,6±1,5	6,2±0,8□	11,7±1,6*

**Примечание.** \* – статистически значимые различия между опытной и контрольной группами; □ – статистически значимые различия по отношению к показателям интактных крыс ( $p < 0,05$ ).

индукции дифференцировки самых ранних стволовых кроветворных клеток CD133<sup>+</sup> в эритроидном направлении [17].

В закономерностях развития восстановительных процессов, происходящих под влиянием суммарной РНК, имеются общие черты, выраженность которых значительно меньше зависит от того, из какого из указанных органов получен препарат, чем от функционального состояния этих органов. Суммарные РНК интактного костного мозга и лимфоидных клеток интактной селезенки по своим гемопоэтическим свойствам отличаются от таковых, выделенных из этих органов в условиях массивной кровопотери. Последние обладают большей корригирующей способностью, вызывая при этом одинаковую последовательность эффектов. Процессы восстановления гемопоэза под действием препаратов РНК из активированных кровопотерей лимфоидных органов начинаются со стимуляции эритроидного ростка, а затем распространяются на миелоидный и мегакариоцитарный. Интенсивность увеличения численности ретикулоцитов на ранних сроках наблюдения существенно выше при использовании РНК стимулированных кровопотерей клеток КМ и селезенки. Но, несмотря на то, что активность РНК<sub>км-2</sub> выше активности РНК<sub>с-2</sub>, в конечном итоге это не сказывается на результате, поскольку восстановление численности эритроцитов происходит примерно в одинаковые сроки.

Отсутствие прямой связи между интенсивностью прироста численности ретикулоцитов и увеличением числа эритроцитов в крови, по-видимому, объясняется тем, что в течение длительного времени даже после начала лечения гибель эритроцитов продолжается. Это следует из данных по изменению их числа у контрольных животных с бензолной анемией, не получавших лечебные препараты: в обеих сериях эксперимента в течение начального периода восстановления наблюдалось либо существенное снижение числа ретикулоцитов, либо постоянство их числа. Это явление может быть также следствием предполагаемого нарушения денуклеации оксифильных эритробластов, связанного с ослабленной фагоцитарной способностью макрофагов ЭО при бензолной интоксикации [18, 19].

К числу сходных черт влияния суммарной РНК на гемопоэз животных с бензолной анемией следует отнести также отсутствие полного восстановления численности всех форменных элементов периферической крови, особенно тромбоцитов — в опытных группах их количество достигает лишь половины исходного уровня. И это не связано с принципиальной неспособностью препаратов РНК стимулировать регенерацию мегакариоцитарного ростка кроветворения, так как, на-

пример, после острого лучевого воздействия исходный уровень всех форменных элементов крови под действием этих же препаратов достигается, а порой и превосходит его [4, 5].

Таким образом, в настоящей работе показано, что качественные различия клеточного состава лимфоидных органов-источников РНК сочетаются с определенными различиями их гемопоэтических свойств. Суммарная РНК лимфоидных клеток селезенки интактных животных (РНК<sub>с-1</sub>) в первую очередь способствует восстановлению количества лейкоцитов, в то время как РНК из костного мозга интактных крыс (РНК<sub>км-1</sub>) первые 20 сут не оказывает заметного влияния на лейкопоэз. Это оказалось единственным отличием гемопоэтического эффекта суммарной РНК интактных лимфоидных клеток селезенки от эффектов остальных изучаемых в данной работе препаратов РНК. Объяснить это, по-видимому, можно тем, что в норме селезенка играет особенно важную роль в обеспечении лейкогенеза. При массивной кровопотере, как и при всякой другой травме, меняется клеточность и популяционный состав лимфоидных клеток селезенки, что отражается на их функциональных свойствах и, соответственно, на свойствах их суммарной РНК. Кроме того, нами была зарегистрирована более высокая гемопоэтическая активность суммарной РНК стимулированных кровопотерей лимфоидных органов, что, по всей видимости, обусловлено таким мощным стимулом к регенерации крови, каким является 2% кровопотеря. Выявлена также более интенсивная эритропоэтическая активность РНК, выделенных из лимфоидных органов анемизированных кровопусканием животных по сравнению с их лейкопоэтической активностью, что, вероятнее всего, связано с морфогенетическими свойствами лимфоцитов [20], релализующих после кровопускания свою органоспецифическую регуляторную функцию.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 г. 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., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз *in vitro*. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014; 4(12): 35-9.

2. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз в культуре эритробластических островков полицитемичных животных. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014; 4(12): 40-3.
3. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Бабаева А.Г., Захаров Ю.М., Козлова Н.И., Болотов А.А. Влияние суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз при экспериментальной полицитемии. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2015; 101(4): 451-61.
4. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Болотов А.А. Влияние предварительного введения суммарной РНК клеток костного мозга на динамику восстановления эритропоэза у крыс после острого гамма-облучения. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(5): 670-3.
5. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Захаров Ю.М. Коррекция постлучевых нарушений эритропоэза суммарной РНК клеток костного мозга и тимуса. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2017; 57(4): 1-7.
6. Михайлова И.В., Смолягина А.И., Красиков С.И., Караулов А.В. Влияние бензола на иммунную систему и некоторые механизмы его действия. *Иммунология*. 2014; 35(1): 51-5.
7. Захаров Ю.М., Караулов А.В., Соколов В.В., Фраш В.Н. *Изменения системы крови при воздействии радиации и бензола*. Новосибирск: Наука; 1990.
8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-9.
9. Захаров Ю.М., Мельников И.Ю., Рассохин А.Г. Классификация эритробластических островков костного мозга с учетом изменения их клеточного состава. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1990; 5: 38-42.
10. Тишевская Н.В., Захаров Ю.М., Голуботовский Е.В., Колесников О.Л., Трофимова Н.В., Архипенко Ю.В. и др. Характер влияния фуллеренола C60(OH)24 на эритропоэз in vitro. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 157(1): 57-60.
11. Тишевская Н.В., Захаров Ю.М., Архипенко Ю.В., Сазонтова Т.Г. Максимальная разовая доза препарата коллоидного серебра негативно влияет на эритропоэз in vitro. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015; 78(7): 32-5.
12. 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.
13. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. Морфофункциональные особенности эритропоэза, наблюдаемые при воздействии суммарной РНК мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2018; 2(26): 31-5.
14. Wei H., Zhang J., Tan K. et al. Benzene-induced aberrant miRNA expression profile in hematopoietic progenitor cells in C57BL/6 mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(11): 27058-71.
15. Dore L.C., Amigo J.D., Dos Santos C.J. et al. A GATA-1-regulated MicroRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105(9): 3333-8.
16. Svasti S., Masaki S., Penglong T. et al. Expression of MicroRNA-451 in normal and thalassemic erythropoiesis. *Ann. Hematol.* 2010; 89(10): 953-8.
17. Kouhkan F., Soleimani M., Daliri M. et al. miR-451 up-regulation, induce erythroid differentiation of CD133+ cells independent of cytokine cocktails. *Iran. J. Basic. Med. Sci.* 2013; 16(6): 756-63.
18. Тишевская Н.В., Болотов А.А., Лебедева Я.Е. Динамика эритропоэза в эритробластических островках костного мозга при экспериментальной бензолной анемии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(3): 362-5.
19. Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Влияние гуморальных факторов на фагоцитарную активность центральных макрофагов в культуре эритробластических островков. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2002; 88(9): 1191-8.
20. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. *О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах*. Москва. «Группа МДВ»; 2016.

## References

1. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Komarova I.A. Effect of preparations of spleen lymphoid cell total RNA on erythropoiesis in vitro. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2014; 4(12): 35-9. (In Russian)
2. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Komarova I.A. Influence of preparations of spleen lymphoid cell total RNA on erythropoiesis in culture of erythroblast islets of polycythemic animals. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2014; 4(12): 40-3. (In Russian)
3. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Babaeva A.G., Zakharov Y.M., Kozlova N.I., Bolotov A.A. Influence of the spleen lymphoid cell total RNA on erythropoiesis in experimental polycythemia. *Rossiyskiy fiziologicheskii Zhurnal im. I.M.Sechenova*. 2015; 101(4): 451-61. (In Russian)
4. 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. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 161(5): 670-3. (In Russian)
5. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zakharov Y.M. Correction of post-radiation disorders of erythropoiesis with the total RNA of bone marrow and thymus cells. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2017; 57(4): 1-7. (In Russian)
6. Mihajlova I.V., Smoljagina A.I., Krasikov S.I., Karaulov A.V. Influence of benzene on the immune system and some mechanisms of its action. *Immunologiya*. 2014; 35(1): 51-5. (In Russian)
7. Zakharov Y.M., Karaulov A.V., Sokolov V.V., Frash V.N. *Changes in the blood system when exposed to radiation and benzene. [Izmeneniya sistemy krovi pri vozdeystvii radiatsii i benzola]*. Novosibirsk; Nauka. 1990. (In Russian)
8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-9.
9. Zakharov Y.M., Mel'nikov I.Y., Rassokhin A.G. Influence of extreme factors on the homing of multipotent mesenchymal stromal cells. *Arhiv anatomii, gistologii i embriologii*. 1990; 5: 38-42. (In Russian)
10. Tishevskaya N.V., Zakharov Y.M., Golubotovskij E.V., Kolesnikov O.L., Trofimova N.V., Arhipenko Ju.V., Sazontova T.G. The nature of the effect of fullereneol C60 (OH) 24 on erythropoiesis in vitro. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2014; 157(1): 57-60. (In Russian)
11. Tishevskaya N.V., Zakharov Y.M., Arhipenko Ju.V., Sazontova T.G. The maximum single dose of silver colloidal preparation negatively affects erythropoiesis in vitro. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2015; 78(7): 32-5. (In Russian)
12. Maklakova I.Ju., Grebnev D.Ju., Jastrebov A.P. Influence of extreme factors on the homing of multipotent mesenchymal stromal cells.

- Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59(4): 82-6. (In Russian)
13. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. Morphofunctional features of *in vitro* erythropoiesis observed under the influence of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cell total RNA. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2018; 2(26): 31-5. (In Russian)
  14. Wei H., Zhang J., Tan K. et al. Benzene-induced aberrant miRNA expression profile in hematopoietic progenitor cells in C57BL/6 mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(11): 27058-71.
  15. Dore L.C., Amigo J.D., Dos Santos C.J. et al. A GATA-1-regulated MicroRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105(9): 3333-38.
  16. Svasti S., Masaki S., Penglong T. et al. Expression of MicroRNA-451 in normal and thalassemic erythropoiesis. *Ann. Hematol.* 2010; 89(10): 953-8.
  17. Kouhkan F., Soleimani M., Daliri M. et al. miR-451 up-regulation, induce erythroid differentiation of CD133+ cells independent of cytokine cocktails. *Iran. J. Basic. Med. Sci.* 2013; 16(6): 756-63.
  18. Tishevskaya N.V., Bolotov A.A., Lebedeva Ja.E. Dynamics of erythropoiesis in erythroblastic islets of the bone marrow during experimental benzene anemia. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 161(3): 362-5. (In Russian)
  19. Tishevskaya N.V., Shevjakov S.A., Zakharov Y.M. The influence of humoral factors on the phagocytic activity of central macrophages in the culture of erythroblastic islets. *Rossiyskiy fiziologicheskij Zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2002; 88(9): 1191-8. (In Russian)
  20. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. *About the morphogenetic properties of RNA of lymphoid and stem cells during regenerative processes*. Moscow: «Gruppa MDV». 2016. (In Russian)

**Сведения об авторах:**

**Бабеева А.Г.** академик РАЕН, доктор мед. наук, консультант лаб. роста и развития ФГБНУ «НИИ морфологии человека»;

**Тишевская Наталья Викторовна**, доктор мед. наук, проф. каф. нормальной физиологии Южно-Уральского государственного медицинского университета;

**Геворкян Нина Михайловна**, науч. лаб. биосинтеза белков НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, e-mail: gevorgiann@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092.18

Порядин Г.В.<sup>1</sup>, Власов А.П.<sup>2</sup>, Власова Т.И.<sup>2</sup>, Болотских В.А.<sup>3</sup>, Мышкина Н.А.<sup>2</sup>, Шейранов Н.С.<sup>2</sup>, Васильев В.В.<sup>4</sup>

## Роль модификаций липидов тканей печени в патогенезе хирургического эндотоксикоза

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», г. Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1;

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия, ул. Большевикская, д. 68;

<sup>3</sup> ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Россия, ул. Студенческая, д. 10;

<sup>4</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», г. Москва, Россия, ул. Щепкина, д. 61/2, корпус 1

**Цель.** Оценка роли модификаций липидов тканей печени в ее детоксикационной способности при остром перитоните.

**Методика.** В эксперименте у собак моделировали острый перитонит различной степени тяжести. Степень эндогенной интоксикации оценивали по уровню токсических продуктов гидрофильной и гидрофобной природы. Представлен новый способ оценки детоксикационной функции печени на основе определения уровня токсических продуктов в крови, притекающей к органу и оттекающей от него. Для характеристики качественного и количественного состава липидов из биопсийного материала печени выделяли липиды, осуществляли их фракционирование и денситометрию. Оценивали интенсивность перекисного окисления липидов, активность фосфолипазы A<sub>2</sub> и супероксиддисмутазы.

**Результаты.** Показано, что функциональное состояние печени при хирургическом эндотоксикозе коррелирует с модификацией липидов ее тканевых структур, проявлением чего были существенные изменения состава основных липидов и резкое увеличение хаотропных фракций. Установлена сопряженность изменений состава липидов тканей печени со степенью тяжести патологического процесса. Одними из значимых триггерных механизмов липиддестабилизирующих явлений в тканевых структурах печени являются оксидативный стресс и высокая фосфолипазная активность. При тяжелом течении острого перитонита высока вероятность такого нарушения функционально-метаболического состояния печени, при котором она приобретает самостоятельное патогенетическое значение в продукции токсических субстанций.

**Заключение.** В патогенезе синдрома эндогенной интоксикации при остром перитоните важную патофизиологическую значимость имеет модификация липидов тканей печени, которая является основой острой печеночной недостаточности и формирования нового состояния органа – источника токсинов. Полученные данные определяют векторы патогенетической терапии по предупреждению необратимых повреждений печени с высоким риском неблагоприятного исхода.

**Ключевые слова:** липидный состав тканей печени, детоксикационная функция печени, эндогенная интоксикация, острый перитонит.

**Для цитирования:** Порядин Г.В., Власов А.П., Власова Т.И., Болотских В.А., Мышкина Н.А., Шейранов Н.С., Васильев В.В. Роль модификаций липидов тканей печени в патогенезе хирургического эндотоксикоза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 65-71.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 65-71

**Для корреспонденции:** Власов Алексей Петрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. факультетской хирургии,

**e-mail:** vap.61@yandex.ru

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

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

**Поступила** 20.02.2019

Poryadin G.V.<sup>1</sup>, Vlasov A.P.<sup>2</sup>, Vlasova T.I.<sup>2</sup>, Bolotskikh V.A.<sup>3</sup>, Myshkina N.A.<sup>2</sup>, Sheyranov N.S.<sup>2</sup>, Vasilyev V.V.<sup>4</sup>

## The role of hepatic lipid modifications in the pathogenesis of surgical endogenous intoxication

<sup>1</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanova Str. 1, Moscow;

<sup>2</sup>N.P. Ogarev National Research Mordovian State University, Bolshevitskaya Str. 68, Saransk;

<sup>3</sup>N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, Studencheskaya Str. 10, Voronezh;

<sup>4</sup>M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Shchepkina Str. 61/2, Bld. 1, Moscow

**Background.** Despite the interest to the issue of surgical endogenous intoxication, mechanisms of impaired hepatic detoxification function in endogenous intoxication induced by acute peritonitis are studied insufficiently. **Aim.** To elucidate the role of modifications in membrane lipids of liver cells in impairing its detoxification ability in acute peritonitis. **Methods.** Acute peritonitis of different severity was modeled in dogs. The authors presented a new method for evaluating the liver detoxification function based on measuring concentrations of toxic products in the blood inflowing to and outflowing from the liver. Hepatic lipids were separated, fractionated and studied by densitometry. The qualitative and quantitative composition of liver lipids, intensity of lipid peroxidation, and activities of phospholipase A2 and superoxide dismutase were measured in liver tissue in the dynamics of experimental peritonitis. **Results.** In surgical endogenous intoxication, the liver function correlated with the modifications of tissue lipids evident as considerable changes in the composition of major membrane-forming lipids and an increase in chaotropic fractions (fatty acids, lysophospholipids). Changes in the tissue lipid composition correlated with severity of the pathological process. Significant triggering mechanisms for the hepatic lipid modification were oxidative stress and a high phospholipase activity. **Conclusion.** In severe acute peritonitis, there is a high probability of profound functional and metabolic disorders in the liver so that it acquires an independent pathogenetic significance as a producer of toxic substances.

**Keywords:** liver lipid composition, liver detoxification function, endogenous intoxication, acute peritonitis.

**For citation:** Poryadin G.V., Vlasov A.P., Vlasova T.I., Bolotskikh V.A., Myshkina N.A., Sheyranov N.S., Vasilyev V.V. The role of liver lipid modifications in the pathogenesis of surgical endogenous intoxication. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 65-71. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.65-71

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

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

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

**Information about authors:**

Vlasov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-4731-2952>

Vlasova T.I., <http://orcid.org/0000-0002-2624-6450>

Bolotskikh V.A., <http://orcid.org/0000-0001-6097-6361>

Myshkina N.A., <https://orcid.org/0000-0003-4622-9444>

Sheyranov N.S., <http://orcid.org/0000-0001-8153-1660>

Vasilyev V.V., <https://orcid.org/0000-0003-2539-0159>

**Received** 20.02.2019

## Введение

Новые методы интенсивной терапии позволяют достаточно эффективно бороться с воспалительными процессами в брюшной полости, однако летальность при этом остается высокой – колеблется в диапазоне от 9 до 67 %, в ряде случаев приближается к 100 % [1, 2]. Известно, что одним из основных патогенетических звеньев острого перитонита является эндогенная интоксикация [3]. Прогрессирование данного синдрома определяется быстрым накоплением промежуточных и конечных продуктов метаболизма в связи с активацией катаболических процессов при снижении эндогенной детоксикации [4-7]. Показано, что развитие эндогенной интоксикации практически всегда сочетается с гибелью гепатоцитов и печеночной недостаточностью с утратой детоксикационной функции, что определяет негативный прогноз [8, 9]. Несмотря на интерес исследователей к данной проблеме, до настоящего времени недостаточно изученной остается роль мембранодестабилизирующих процессов в ухудшении функционально-метаболического состояния печени

вплоть до критического уровня, при котором печень теряет детоксикационную способность.

Цель – оценка роли модификаций липидов тканей печени в ее детоксикационной способности при остром перитоните.

## 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 ФГБОУ ВО «Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова».

Эксперименты выполнены на 24 взрослых беспородных половозрелых собаках обоего пола массой от 9,1 до 12,3 кг. Первая группа ( $n=12$ ) – моделирование острого серозного перитонита; вторая группа ( $n=12$ ) – моделирование острого гнойно-фибринозного перитонита.

Острый перитонит воспроизводили по способу А.П. Власова под общим обезболиванием (тиопентал-натрий 0,04 мг/кг). В брюшную полость вводили 20 процентную каловую взвесь (0,5 мл/кг массы). Выполняли релапаротомию с оценкой патологических изменений и последующей санацией брюшной полости в I группе – через 1 сут, во II группе – через 2 сут после моделирования.

В послеоперационном периоде животные получали внутривенную инфузионную терапию (0,89 % раствора хлорида натрия и 5 % раствора глюкозы из расчета 50 мл/кг массы животного). В контрольные сроки (1-е, 3-и и 5-е сут) проводили забор крови, брали биоптаты тканей печени.

*Особенности забора крови для оценки метаболических процессов в печени.* Притекающая к печени кровь включает кровь портальной вены (70 %) и печеночной артерии (30 %). Забор крови из портальной вены производили путем венопункции, артериальной крови – из бедренной артерии артериопункцией.

Разработана специальная методика, позволяющая производить забор крови, оттекающей от печени. Из интубационной трубки был сконструирован катетер, на котором выше манжетки делали несколько отверстий, а основное отверстие запаивали. Катетер вводили в нижнюю (каудальную) полую вену выше впадения печеночных вен, манжетку раздували, тем самым создавали замкнутое пространство, из которого и осуществлялся забор крови, оттекающей от печени.

Для эффективной оценки метаболических процессов в органе проводили расчет приточно-отточной разницы (ПОР) с учетом объемного кровотока в печени по разработанной формуле:

$$\text{ПОР} = 0,45 \times (\text{Т}_0 - \text{Т}_\text{п} \times 0,32 + \text{Т}_\text{а} \times 0,130,45)$$

где  $\text{Т}_0$  – уровень исследуемого токсического продукта в оттекающей от органа крови (v. hepaticae);  $\text{Т}_\text{п}$  – уровень исследуемого токсического продукта в притекающей крови через портальную вену (v. portae);  $\text{Т}_\text{а}$  – уровень исследуемого токсического продукта в притекающей артериальной крови (a. hepaticarportia); 0,45 – объемный кровоток печени в литрах в минуту; 0,32 – объемный кровоток в литрах в минуту через портальную систему; 0,13 – объемный кровоток в литрах в минуту через артериальную систему.

По показателям гидрофильных (молекулы средней массы) [10] и гидрофобных (индекс токсичности плазмы крови и резерв связывания альбумина) [11] маркеров эндотоксикоза в притекающей и оттекающей крови от печени с расчетом приточно-отточной разницы оценивали детоксикационную функцию органа.

В динамике заболевания наряду с оценкой степени эндогенной интоксикации на организмном и ор-

ганном уровнях в тканях печени оценивали качественный и количественный состав липидов, интенсивность перекисного окисления липидов, активность фосфолипазы  $\text{A}_2$  и активность супероксиддисмутазы.

Методы исследования: определяли уровни молекул средней массы, общей и эффективной концентрации альбумина, диеновых и триеновых конъюгатов, малонового диальдегида, активности фосфолипазы  $\text{A}_2$ , активности супероксиддисмутазы [12–14]; экстракцию липидов из тромбоцитов проводили хлороформ-метанольной смесью, суммарный препарат липидов фракционировали способом тонкослойной хроматографии тонкослойная хроматография на силикагелевых пластинах фирмы Merck. Количественное определение (процентный состав) липидов проводили на хроматограммах после их проявления денситометрическим методом (денситометр Model GS-670 (BIO-RAD, США), программное обеспечение Phosphor Analyst/ PS Sotware).

Полученные цифровые данные обрабатывали общепринятыми методами статистики с определением статистической значимости различий между данными в опытных и контрольной группах на основе расчета критерия Стьюдента (данные имели нормальное распределение). В каждой серии определяли статистическую значимость различия по отношению к исходному или контрольному уровню ( $p$ ). Устанавливали корреляционные связи между различными показателями по коэффициенту корреляции ( $r$ ). Выявленные закономерности и связи изучаемых параметров между группами и признаками считали значимыми при вероятности безошибочного прогноза  $p=95\%$  и более.

## Результаты и обсуждение

Оценка детоксикационной функции печени показала, что при серозном перитоните нарушения функциональной активности печени были незначительны, содержание токсических продуктов в крови печеночных вен с учетом величины объемного кровотока было статистически значимо ниже, чем в притекающей крови: индекс токсичности плазмы крови по альбумину и содержание гидрофильных маркеров эндотоксикоза существенно снижались уже на 3-и сут эксперимента (табл. 1).

При гнойно-фибринозном перитоните отмечался прогрессивный рост уровней гидрофильных и гидрофобных токсических продуктов в плазме крови (табл. 2, рис. 1).

В 1-е сут наблюдения в крови, поступающей в печень по портальной вене и печеночной артерии, средний расчетный показатель эффективной концентрации и резерв связывания альбумина уменьшались на 57,1 и 50,0 % соответственно ( $p<0,05$ ). Индекс токсич-

ности плазмы увеличивался на 512,8 % ( $p < 0,05$ ) относительно нормы. Показатели водорастворимых токсических продуктов, молекулы средней массы, значительно возрастали и превосходили норму на 109,5 и 153,5 % ( $p < 0,05$ ) соответственно для  $\lambda = 254$  и 280 нм. Изучение показателей эндогенной интоксикации в

плазме крови печеночных вен выявило аналогичную динамику, уже в 1-е сут гнойно-фибринозного перитонита эффективная концентрация альбумина уменьшалась относительно нормы на 59,4 % ( $p < 0,05$ ). Резерв связывания альбумина снижался на 51,4 % ( $p < 0,05$ ). Индекс токсичности плазмы увеличивался на 479,5 %

Таблица 1

**Показатели эндогенной интоксикации в плазме крови, притекающей и оттекающей от печени, при серозном перитоните, М±m**

Показатель	Группа	Исходные данные	Серозный перитонит (n=12)		
			1-е сут	3-и сут	5-е сут
Приток					
ОКА, г/л	I	40,48±0,97	36,50±0,64*	36,01±0,94*	38,49±1,20
ЭКА, г/л	I	29,18±1,10	10,76±0,58*	15,72±0,77*	17,73±0,74*
РСА, усл. ед.	I	0,72±0,03	0,29±0,01*	0,44±0,02*	0,46±0,04*
ИТ, усл. ед.	I	0,39±0,02	1,83±0,02*	1,29±0,06*	1,17±0,07*
МСМ, усл. ед. (254 нм)	I	0,410±0,011	0,771±0,020*	0,735±0,024*	0,652±0,031*
МСМ, усл. ед. (280 нм)	I	0,342±0,024	0,828±0,031*	0,630±0,045*	0,475±0,023*
Отток					
ОКА, г/л	I	41,69±0,92	35,11±0,68*	<b>37,96±0,95*</b>	39,01±1,26
ЭКА, г/л	I	30,61±1,06	11,45±0,54*	<b>16,12±0,73*</b>	18,05±0,69*
РСА, усл. ед.	I	0,74±0,03	0,34±0,01*	0,48±0,02*	0,51±0,04*
ИТ, усл. ед.	I	0,38±0,01	1,76±0,02*	<b>1,11±0,06*</b>	<b>1,05±0,07*</b>
МСМ, усл. ед. (254 нм)	I	0,391±0,017	0,762±0,045*	<b>0,694±0,018*</b>	0,632±0,015*
МСМ, усл. ед. (280 нм)	I	0,330±0,024	<b>0,804±0,053*</b>	0,625±0,024*	0,471±0,023*

**Примечание.** Здесь и в табл. 2 ОКА – общая концентрация альбумина, ЭКА – эффективная концентрация альбумина, РСА – резерв связывания альбумина, ИТ – индекс токсичности, МСМ – молекулы средней массы; \* - статистически значимые отличия от исходных показателей ( $p < 0,05$ ); жирный шрифт – значимые отличия показателей «отток» относительно показателей «приток» ( $p < 0,05$ ) с учетом пересчета на объем минутного кровотока.

Таблица 2

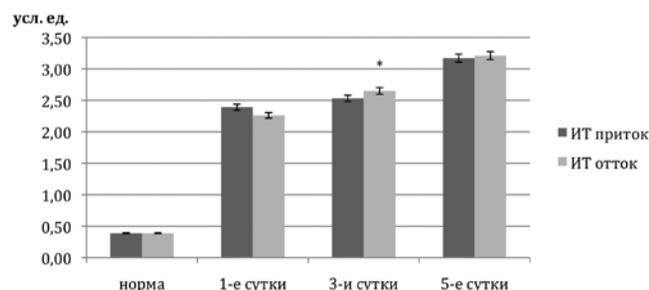
**Показатели эндогенной интоксикации в плазме крови, притекающей и оттекающей от печени, при гнойно-фибринозном перитоните, М±m**

Показатель	Группа	Исходные данные	Гнойно-фибринозный перитонит (n=12)		
			1-е сут	3-и сут	5-е сут
Приток					
ОКА, г/л	II	40,48±0,97	34,57±0,76*	31,16±1,16*	25,30±1,03*
ЭКА, г/л	II	29,18±1,10	12,52±0,72*	8,82±0,71*	7,27±0,40*
РСА, усл. ед.	II	0,72±0,03	0,36±0,01*	0,28±0,01*	0,24±0,01*
ИТ, усл. ед.	II	0,39±0,02	2,39±0,12*	2,53±0,03*	3,17±0,03*
МСМ, усл. ед. (254 нм)	II	0,41±0,01	0,859±0,026*	1,341±0,064*	1,655±0,079*
МСМ, усл. ед. (280 нм)	II	0,34±0,02	0,867±0,027*	1,628±0,041*	1,853±0,053*
Отток					
ОКА, г/л	II	41,69±0,92	32,88±0,77*	30,66±1,07*	29,48±0,99*
ЭКА, г/л	II	28,61±1,06	11,62±0,70*	8,03±0,69*	7,18±0,41*
РСА, усл. ед.	II	0,72±0,03	0,35±0,01*	<b>0,25±0,01*</b>	0,24±0,01*
ИТ, усл. ед.	II	0,39±0,02	2,26±0,11*	<b>2,65±0,03*</b>	3,21±0,03*
МСМ, усл. ед. (254 нм)	II	0,39±0,01	0,924±0,026*	<b>1,460±0,060*</b>	1,700±0,072*
МСМ, усл. ед. (280 нм)	II	0,33±0,02	0,984±0,025*	1,568±0,037*	1,801±0,050*

( $p < 0,05$ ) по сравнению с нормой. Уровень молекул средней массы также существенно возрастал и был выше нормы на 133,9 и 194,6 % ( $p < 0,05$ ) соответственно для  $\lambda = 254$  и 280 нм.

При пересчете показателей на объем минутного кровотока в органе и оценке ПОР было установлено, что в 1-е сут эксперимента данный показатель приближался к нулю, что свидетельствовало об отсутствии снижения токсических продуктов в крови при ее прохождении через печень, а следовательно о нарушении детоксикационной функции органа. На последующих этапах показатель ПОР приобретал отрицательные значения, что свидетельствовало об увеличении уровня токсинов в оттекающей крови относительно притока.

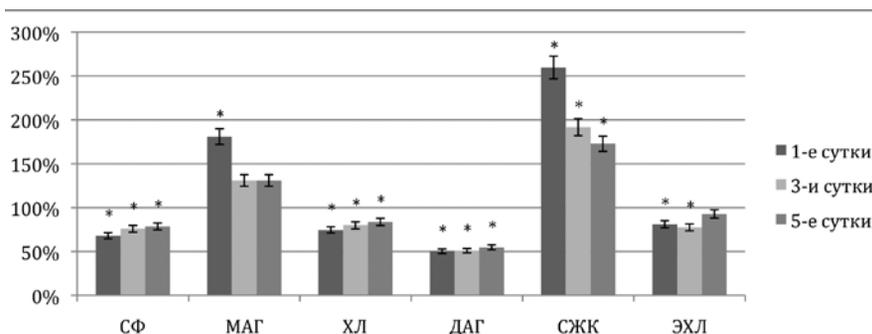
Таким образом, при оценке уровня токсических продуктов в крови приносящих и выносящих сосудов печени был исследован уникальный феномен: уровень токсинов в крови при ее прохождении через орган не только не снижается, но и возрастает, что указывает на формирование острой печеночной недостаточности, когда печень сама становится источником токсических продуктов.



**Рис. 1.** Индекс токсичности (ИТ) по альбумину плазмы крови, притекающей и оттекающей от печени, при гнойно-фибринозном перитоните, \* - статистически значимые отличия «оттока» относительно «притока» ( $p < 0,05$ )

С целью расшифровки механизмов увеличения содержания токсинов в крови при ее прохождении через печень был исследован липидный состав клеточных структур органа. Было выявлено, что дисфункциональные явления в печени сопровождались патологическими изменениями спектра липидов клеточных структур органа. У животных 1-й группы (модель серозного перитонита) выраженность модификаций липидов клеток печени была не велика, на 5-е сут наблюдения ряд исследованных показателей был сопоставим с нормой (**рис. 2**).

Во 2-й группе (модель гнойно-фибринозного перитонита) модификации липидного состава клеточных структур печени были значительны. Уровень моноацилглицеролов уменьшался относительно нормы на 23,5 – 38,4 % ( $p < 0,05$ ). Содержание холестерина было выше нормы на 16,4 – 17,8 % ( $p < 0,05$ ). Удельный вес диацилглицеролов уменьшался на 56,6 – 65,4 % ( $p < 0,05$ ). Показатель свободных жирных кислот как хаотропной фракции липидов возрастал относительно нормальных данных на 189,8 – 246,9 % ( $p < 0,05$ ). Уровень триацилглицеролов уменьшался на 38,7 – 46,5 % ( $p < 0,05$ ). Эстерифицированный холестерол превышал норму на 12,8 – 16,7 % ( $p < 0,05$ ). Показатель суммарных фосфолипидов мембранных структур печени был ниже исходного показателя на 32,5 – 44,0 % ( $p < 0,05$ ). Фракционный состав фосфолипидов также изменялся с увеличением хаотропных нестабильных форм. Содержание лизофосфолипидов превышало норму на 1256,7 – 1574,2 % ( $p < 0,05$ ). Уровень сфингомиелина уменьшался на 60,2 – 61,4 % ( $p < 0,05$ ). Показатель фосфатидилхолина также снижался относительно нормы на 37,8 – 51,0 % ( $p < 0,05$ ). Фосфатидилсерин возрастал по сравнению с нормой на 116,0 – 143,7 % ( $p < 0,05$ ). Содержание фосфатидилинозита уменьшалось на 40,1 – 53,8 % ( $p < 0,05$ ). Удельный вес фосфатидилэтанол-



**Рис. 2.** Состав липидов в тканях печени при серозном перитоните (СФ – суммарные фосфолипиды; МАГ – моноацилглицеролы; ХЛ – холестерол; ДАГ – диацилглицеролы; СЖК – свободные жирные кислоты; ЭХЛ – эфиры холестерола; данные нормы приняты за 100 %; \* - статистическая значимость отличий относительно нормы ( $p < 0,05$ )).

ламина повышался на 73,9 – 87,6 % ( $p < 0,05$ ) относительно нормы.

Исследование основных триггерных механизмов модификации мембранных липидов (интенсивность процессов оксидативного стресса, активность клеточных фосфолипаз) выявило, что в ткани печени при серозном перитоните более значимые изменения исследуемых показателей (за весь период наблюдения) регистрировались в 1-е сут эксперимента, когда уровни первичных и вторичных продуктов липопероксидации увеличивались относительно нормы на 215,1 и 148,6 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Активность фосфолипазы  $A_2$  возрастала на 153,5 % ( $p < 0,05$ ). Активность фермента-антиоксиданта супероксиддисмутазы в ткани печени уменьшалась на 47,6 % ( $p < 0,05$ ) относительно нормы. В дальнейшем отмечалась положительная динамика исследованных показателей.

При гнойно-фибринозном перитоните регистрировали прогрессивное возрастание содержания продуктов ПОЛ и активности фосфолипазы  $A_2$ , максимальные изменения (за весь период наблюдения) были выявлены на 5-е сут. Так, показатели диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в ткани печени возрастали на 210,0 и 388,9 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Активность фосфолипазы  $A_2$  увеличивалась на 215,2 % ( $p < 0,05$ ). Регистрировалась депрессия антиоксидантной активности супероксиддисмутазы относительно нормы на 59,9 % ( $p < 0,05$ ).

Исследованиями установлено, что при остром перитоните прогрессирование синдрома эндогенной интоксикации сопровождается нарушением детоксикационной функции печени, что находит свое подтверждение в литературе [5–7]. Предложенный способ оценки детоксикационной функции печени по регистрации уровня токсических продуктов в единице объема крови при ее прохождении через печень дает возможность объективно оценить роль данного органа в патогенезе интоксикационного синдрома и выявить новый механизм прогрессирования эндотоксикоза, когда главный орган системы детоксикации при тяжелом течении воспалительного процесса в брюшной полости становится дополнительным источником токсических продуктов.

Изучение процессов липидного метаболизма в ткани печени в аспекте определения фракционного состава мембранных липидов ее тканевых структур и выраженности основных процессов мембранного повреждения дало возможность установить наиболее значимые детерминирующие факторы, которые приводят к негативным изменениям со стороны главного органа системы детоксикации.

Во-первых, прогрессирование эндогенной интоксикации при остром перитоните сопровождается модификацией основных мембранообразующих липидов ткани печени с увеличением в них хаотропных форм (свободных жирных кислот, лизофосфолипидов), что, согласно данным литературы [14], свидетельствует о дестабилизирующих, вплоть до деструктивных процессов в органе.

Во-вторых, модификации липидного спектра клеточных структур печени корреляционно зависимы от выраженности липопероокисления и активности клеточных фосфолипаз. При серозном перитоните интенсивность данных мембранодестабилизирующих процессов возрастала в меньшей степени, чем при гнойно-фибринозном перитоните.

Результаты исследования расширяют представления о патогенезе синдрома эндогенной интоксикации при остром перитоните, определяя патофизиологическую значимость модификаций липидов ткани печени в патогенезе острой печеночной недостаточности и формировании нового состояния органа – источника токсинов. Полученные данные определяют векторы патогенетической терапии по предупреждению необратимых повреждений печени с высоким риском неблагоприятного исхода.

## Литература

1. Костюченко К.В., Рыбачков В.В. Принципы определения хирургической тактики лечения распространенного перитонита. *Хирургия*. 2005; 4: 9-13.
2. Савельев В.С., Петухов В.А. *Перитонит и эндотоксическая агрессия*. М.; Медицина; 2012.
3. Кирьянов Н.А., Иванова Г.С., Баженов Е.Л., Митрюков В.В. Пато- и морфогенез синдрома эндогенной интоксикации при экспериментальном перитоните. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2014; 5: 24-6.
4. Костюченко М.В. Современная концепция профилактики прогрессирования эндотоксикоза и нарушений функции печени и почек в неотложной хирургии. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2013; 9: 113-4.
5. Ahmetagic A., Numanovic F., Ahmetagic S., Rakovac-Tupkovic L., Porobic-Jahic H. Etiology of peritonitis. *Med. Arh*. 2013; 67(4): 278-81.
6. Косинец В.А., Сачек М.Г., Кондратенко Г.Г. Применение препарата реамберин в комплексной терапии распространенного гнойного перитонита. *Хирургия*. 2010; 1: 59-63.
7. Мехтиев Н.М., Тимербулатов М.В., Мананов Р.А. Лечебная тактика при послеоперационном перитоните. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2013; 6: 86-8.
8. Гасанов Ф.Д. Принципы гепаринотерапии при тромбозе мезентериального синдрома у хирургических больных. *Анестезиология и реаниматология*. 2012; 2: 61-4.
9. Чернов В.Н. Очаги внедрения инфекции и печеночная недостаточность при распространенной абдоминальной инфек-

- ции. Кубанский научный медицинский вестник. 2013; 138 (3): 135-8.
10. ПолUTOва Н.В., Затеев Д.В., Шинтаев Т.К. Определение содержания молекул средней массы в крови как интегративный показатель оценки степени аутоинтоксикации в динамике развития ожоговой болезни. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2014; 11: 1226.
  11. Грызунов Ю.А., Добрецов Г.Е. *Альбумины сыворотки крови в клинической медицине*. М.; 1994.
  12. Ганстон Ф.Д., Ноулс П.Ф., Хаф Л. *Липиды, углеводы, макромолекулы, биосинтез. В кн.: Общая органическая химия*. М.; Химия. 1986; 11: 734.
  13. Гуревич В.С., Контрорщикова К.Н., Шатилина Л.В. Сравнительный анализ двух методов определения активности супероксиддисмутазы. *Лабораторное дело*. 1990; 4: 44-7.
  14. Власов А.П., Трофимов В.А., Крылов В.Г. *Системный липидный дистресс-синдром в хирургии*. М.; Наука. 2009.

### References

1. Kostjuchenko K.V., Rybachkov V.V. Principles of determination of surgical tactics of treatment of common peritonitis. *Khirurgiya*. 2005; 4: 9-13. (in Russian)
2. Savel'ev V.S., Petuhov V.A. *Peritonitis and endotoxin aggression*. Moscow; Meditsina; 2012. (in Russian)
3. Kir'janov N.A., Ivanova G.S., Bazhenov E.L., Mitrjukov V.V. Pathogenesis and morphogenesis of the syndrome of endogenous intoxication in experimental peritonitis. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2014; 5: 24-6. (in Russian)
4. Kostjuchenko M.V. The modern concept of prevention of the progression of endotoxicosis and disorders of the liver and kidneys in emergency surgery. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2013; 9: 113-4. (in Russian)
5. Ahmetagic A., Numanovic F., Ahmetagic S., Rakovac-Tupkovic L., Porobic-Jahic H. Etiology of peritonitis. *Med. Arh*. 2013; 67(4): 278-81.
6. Kosinec V.A., Sachek M.G., Kondratenko G.G. Use of Reamberin in the complex therapy of common purulent peritonitis. *Khirurgiya*. 2010; 1: 59-63. (in Russian)
7. Mehtiev N.M., Timerbulatov M.V., Mananov R.A. Medical treatment in postoperative peritonitis. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2013; 6: 86-8. (in Russian)
8. Gasanov F.D. Principles of heparin therapy for thrombohemorrhagic syndrome in surgical patients. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2012; 2: 61-4. (in Russian)
9. Chernov V.N. Foci of infection and liver failure with common abdominal infections. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik*. 2013; 3 (138): 135-8. (in Russian)
10. Polutova N.V., Zateev D.V., Shintaev T.K. Determination of the content of medium-weight molecules in the blood as an integrative indicator for assessing the degree of autointoxication in the dynamics of burn disease. *Byulleten' meditsinskikh internet-konferentsiy*. 2014; 11: 1226. (in Russian)
11. Gryzunov Ju.A., Dobrecov G.E. *Serum albumin in clinical medicine*. Moscow; 1994. (in Russian)
12. Gunston F.D., Knowles P.F., Hough L. *Lipids, carbohydrates, macromolecules, biosynthesis. In: General Organic Chemistry*. Moscow, Chemistry. 1986; 11: 734. (in Russian)
13. Gurevich V.S., Kontorshhikova K.N., Shatilina L.V. Comparative analysis of two methods for determining the activity of superoxide dismutase. *Laboratornoe delo*. 1990; 4: 44-7. (in Russian)
14. Vlasov A.P., Trofimov V.A., Krylov V.G. *Systemic lipid distress syndrome in surgery*. Moscow; Nauka. 2009. (in Russian)

### Сведения об авторах:

**Порядин Геннадий Васильевич**, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, проф., каф. патофизиологии лечебного факультета;  
**Власов Алексей Петрович**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. факультетской хирургии, e-mail: var.61@yandex.ru;  
**Власова Татьяна Ивановна**, доктор мед. наук, доцент, проф., каф. нормальной и патологической физиологии;  
**Болотских Виктор Александрович**, канд. мед. наук, доцент, каф. оперативной хирургии с топографической анатомией;  
**Мышкина Нина Алексеевна**, ассистент каф. госпитальной терапии;  
**Шейранов Никита Сергеевич**, канд. мед. наук, соискатель каф. факультетской хирургии;  
**Васильев Владимир Владимирович**, канд. мед. наук, доцент каф. скорой и неотложной помощи.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-001.17

Осиков М.В.<sup>1</sup>, Симонян Е.В.<sup>1</sup>, Башарова О.Т.<sup>2</sup>

## Влияние трансдермальной пленки с эритропоэтином на гибель лимфоцитов и процессы свободнорадикального окисления в крови при экспериментальной термической травме у крыс

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

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

<sup>2</sup>ООО «Завод Медсинтез»,

620144, Свердловская область, г. Екатеринбург, Россия, ул. 8 Марта, д. 90А

**Цель** – изучение влияния эритропоэтина в составе трансдермальной пленки на характер гибели лимфоцитов и процессы свободнорадикального окисления в крови при экспериментальной термической травме у крыс.

**Методика.** Эксперименты выполнены на 90 белых нелинейных крысах-самцах массой 220±20 г. Животные были случайным образом разделены на 3 группы: группа 1 (n=10) – интактный контроль, группа 2 (n=40) – термическая травма с наложением на область ожога асептической повязки, группа 3 (n=40) – термическая травма с наложением на область ожога трансдермальной пленки с эритропоэтином. Термическую травму IIIA степени (площадь 3,5% поверхности) воспроизвели под общим наркозом погружением межлопаточной области кожи в очищенную воду (t= 98-99 °C). Эритропоэтин (42 МЕ/см<sup>2</sup>) в составе трансдермальной пленки (площадь 12 см<sup>2</sup>) наносили ежедневно сразу после травмы. Исследование крови проводили на 3-и, 5-е, 8-е и 14-е сут. Гибель лимфоцитов, выделенных из крови на градиенте плотности фиколл-верографин (1,077), оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флюорохромом аннексином V и 7-аминоактиномицином D. Дифференцировали интактные клетки, клетки с ранними признаками апоптоза, клетки с поздними признаками апоптоза и частично некротизированные клетки. Содержание продуктов ПОЛ оценивали спектрофотометрически, определяли активность супероксиддисмутазы в плазме, каталазы в плазме крови и эритроцитах.

**Результаты.** Показано, что при термической травме увеличивается количество лимфоцитов в крови с ранними и поздними признаками апоптоза и некроза, содержание диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов, оснований Шиффа в липидных экстрактах плазмы и лимфоцитов, возрастает также активность каталазы в плазме и эритроцитах, активность супероксиддисмутазы в плазме крови снижается. В условиях применения эритропоэтина в составе трансдермальной пленки наблюдается уменьшение количества лимфоцитов с ранними и поздними признаками гибели, снижается активность процессов ПОЛ в плазме и лимфоцитах, а также активность каталазы в плазме и эритроцитах и возрастает активность супероксиддисмутазы в плазме крови.

**Заключение.** Использование эритропоэтина в составе трансдермальной пленки при термической травме снижает выраженность гибели лимфоцитов, активность процессов ПОЛ, повышает активность супероксиддисмутазы в плазме крови по сравнению с группой животных с термической травмой без применения эритропоэтина.

**Ключевые слова:** термическая травма; эритропоэтин; трансдермальная пленка; гибель лимфоцитов; перекисное окисление липидов; супероксиддисмутаза; каталаза.

**Для цитирования:** Осиков М.В., Симонян Е.В., Башарова О.Т. Влияние трансдермальной пленки с эритропоэтином на гибель лимфоцитов и процессы свободнорадикального окисления в крови при экспериментальной термической травме у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 72-79 .

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.72-79

**Для корреспонденции:** Башарова Оксана Тагировна, канд. биол. наук, инженер хроматографист, e-mail: osaedgalina@mail.ru  
**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

Поступила 08.12.2018

Osikov M. V.<sup>1</sup>, Simonyan E. V.<sup>1</sup>, Basharova O.T.<sup>2</sup>

## EFFECT OF A TRANSDERMAL FILM WITH ERYTHROPOIETIN ON LYMPHOCYTE DEATH AND FREE RADICAL OXIDATION IN BLOOD OF RATS WITH EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

<sup>1</sup> South Ural State Medical University, Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk 454092;

<sup>2</sup> OOO Zavod Medsintez, 8 Marta Str. 90a, Yekaterinburg 620144

**Aim.** Studying the effect of erythropoietin (EPO) as a component of the transdermal film (TDF) on lymphocyte apoptotic death and free radical oxidation in blood of rats with experimental thermal injury (TI) (trauma).

**Methods.** Experiments were performed on 90 white mongrel male rats weighing 220±20 g. The IIIA grade TI with a burn area of 3.5% body surface was induced under general anesthesia by immersing the interscapular region of the skin in purified water at 98-99°C. EPO (42 IU/cm<sup>2</sup>) as a component of the 12 cm<sup>2</sup> TDF was applied daily, immediately after the TI. The animals were randomized to three groups: group 1 (n=10), intact control; group 2 (n=40), TI with application of an aseptic dressing to the burn area; group 3 (n=40), TI with application of the EPO-containing TDF to the burn area. The study was conducted at days 3, 5, 8, and 14 after TI. Lymphocytes were isolated from blood using the ficoll-verographin density gradient (1.077) and their apoptosis was evaluated by staining the cells with fluorochrome-conjugated Annexin V (Annexin-5-FITC) and 7-aminoactinomycin D (7-AAD). The cells were differentiated into intact cells, cells with early apoptosis signs, cells with late apoptosis signs, and partially necrotized cells. Concentration of lipid peroxidation (LP) products was measured spectrophotometrically; superoxide dismutase (SOD) activity was measured in plasma and catalase activity was measured in plasma and red blood cells.

**Results.** TI increased the count of lymphocytes of the Annexin-5-FITC+/7-AAD (early apoptosis signs) and Annexin-5-FITC+/7-AAD+ (late apoptosis or necrosis signs) phenotypes, and concentrations of dienic conjugates, ketodienes, conjugated trienes, and Schiff bases in heptanol and isopropanol phases of plasma and lymphocyte lipid extracts. Plasma and red cell catalase activities were increased whereas plasma SOD activity was decreased. Application of EPO as a component of the TDF decreased the amount of lymphocytes with early and late apoptosis signs and the contents of dienic conjugates, conjugated ketodienes and trienes, Schiff bases in plasma and lymphocytes, and catalase activity in plasma and erythrocytes, and increased the plasma activity of SOD.

**Conclusion.** The use of EPO as a component of TDF in TI reduced lymphocyte apoptosis, activity of LP processes, and increased the plasma activity of SOD compared to the group of animals with TI without the EPO treatment.

**Keywords:** thermal injury; erythropoietin; transdermal film; lymphocyte death; lipid peroxidation; superoxide dismutase; catalase.

**For citation:** Osikov M.V., Simonyan E.V., Basharova O.T. Effect of transdermal film with erythropoietin on lymphocytes death and free radical oxidation in blood of rats with experimental thermal injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 72-79. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 72-79

**For correspondence:** *Basharova Oxana Tagirovna*, Candidate of Biological Sciences, engineer of chromatography, e-mail: osaedgalina@mail.ru

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

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

**Received** 08.12.2018

## Введение

Ежегодно более 1 млн человек в мире страдают от ожогов различной степени тяжести. Более 90% ожогов приходится на долю термической травмы (ТТ) [1-3]. Одной из причин развития осложнений при ТТ является активация лейкоцитов, эндотелиоцитов и тромбоцитов в очаге ТТ, что может стать причиной «респираторного взрыва», инициирования процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), гибели лимфоцитов, лимфоцитопении, депрессии адаптивного иммунитета и дисрегуляции иммунного ответа [4, 5]. В связи с этим, патогенетически обоснованным может быть локальное применение эритропоэтина (ЭПО). Ранее при различной патологии нами были продемонстрированы плейотропные эффекты ЭПО,

включающие нефроцитопротекторное, нейропротекторное, иммунотропное действие [6, 7]. ЭПО привлекает внимание своими репаративными эффектами и антиоксидантными свойствами, которые при ТТ могут способствовать ограничению зоны вторичной алтерации [8, 9]. Цель работы – изучить влияние эритропоэтина в составе трансдермальной пленки на гибель лимфоцитов и процессы свободнорадикального окисления в крови при экспериментальной термической травме у крыс.

## Методика

Исследования выполнены в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных живот-

ных (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург) и рекомендациями Директивы 2010/63/EU от 22.09.10 по охране животных, используемых в научных целях. Работа была одобрена локальным этическим комитетом университета. Эксперименты выполнены на 90 белых нелинейных крысах-самцах массой  $220 \pm 20$  г. Животные были случайным образом разделены на 3 группы: группа 1-я ( $n=10$ ) – интактный контроль, 2-я ( $n=40$ ) – ТТ с наложением на область ожога асептической повязки (группа ТТ), 3-я ( $n=40$ ) – ТТ с наложением на область ожога трансдермальной пленки (ТДП) с ЭПО (группа ТТ+ТДП с ЭПО). Моделирование термической травмы IIIA степени (СТ IIIA) площадью 3,5% поверхности тела осуществляли под общей анестезией (Золетил «VirbacSanteAnimale», Франция) погружением участка межлопаточной области спины животного в горячую очищенную воду с температурой 98–99 °C на 12 с. Через 24 ч после моделирования ТТ проводили иссечение некротизированных участков раны. Глубину поражения верифицировали морфологическими методами. Пленку с ЭПО животным 3-й группы наносили сразу после ТТ, меняя ежедневно и закрепляя асептической повязкой. Асептическую повязку у животных в 2-й и 3-й группах меняли ежедневно.

*Состав трансдермальной пленки с эритропоетином.* В предварительных исследованиях был разработан состав ТДП на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы, в который был включен с концентрацией 42 МЕ/см<sup>2</sup> ЭПО («Эпокрин», ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА, Россия), и проведена ее оценка в соответствии с фармакотехнологическими параметрами: органолептические показатели (внешний вид, цвет, прозрачность, эластичность, наличие посторонних примесей и микротрещин под микроскопом), адгезивная способность, механическая прочность на разрыв, толщина. По результатам проведенных исследований получен патент на изобретение.

*Оценка гибели лимфоцитов крови.* Исследования проводили на 3-и, 5-е, 8-е и 14-е сут ТТ. Забор крови осуществлялся под общим наркозом после вскрытия грудной клетки пункцией сердца в области левого желудочка. Гибель лимфоцитов, выделенных из крови на градиенте плотности фиколл-верографин (1,077), оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флюорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) из набора «Annexin 5 - FITC/7-AADkit» («BeckmanCoulter», США) на точном цитофлуориметре «Navios» («BeckmanCoulter», США). Дифференцировали интактные клетки (Annexin-5-FITC–/7-AAD–), клетки с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD–), клетки с поздними признаками апоптоза и частично не-

кротизированные клетки (Annexin-5-FITC+/7-AAD+). Результат выражали в % от общего числа подсчитанных клеток. Содержание продуктов ПОЛ оценивали спектрофотометрически в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта лимфоцитов и плазмы по методу Волчегорского И.А. и соавт [10], определяли E232/E220 (первичные продукты ПОЛ – диеновые конъюгаты (ДК), E278/E220 (вторичные продукты ПОЛ – кетодиены и сопряженные триены (КД и СТ) и E400/E220 (конечные продукты ПОЛ – Шиффовы основания (ШО)). Результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.) Активность супероксиддисмутазы (СОД) в плазме оценивали по методу Чевари С., Чаба И., Секей И [11], результат выражали в условных единицах на 1 мл сыворотки (ЕД/мл). Активность каталазы в плазме и в эритроцитах оценивали по методу Королюка М.А. и соавторов в модификации Коробейниковой Э.Н. [12, 13]. Результат выражали в мкат/л.

*Статистическая обработка результатов.* Результаты обрабатывали с использованием программы «Statistica 6.0». Характеристика выборки представлена в формате  $Me (Q_{25}-Q_{75})$ . Для оценки значимости различий между группами применяли критерии Манна – Уитни, Вальда – Вольфовитца, Краскела-Уоллиса, для корреляционного анализа использовали коэффициент Спирмена. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

*Оценка гибели лимфоцитов в крови.* При экспериментальной ТТ на 3-и, 5-е и 8-е сут количество лимфоцитов с ранними признаками апоптоза в крови увеличивалось на 51%, 108% и 172% соответственно, а количество клеток с поздними признаками апоптоза и признаками некроза – на 850%, 900% и 4500% соответственно. На 14-е сут количество клеток с ранними и поздними признаками апоптоза и/или некроза статистически значимо не отличалось от группы интактных животных (табл. 1). Количество интактных лимфоцитов снижается на 5-е и 8-е сут ТТ на 10,6% и 18,2% соответственно и статистически значимо не изменяется на 3-и и 14-е сут по сравнению с интактными.

При оценке влияния ТДП с ЭПО при ТТ на показатели гибели лимфоцитов в крови установлено, что количество клеток с ранними признаками апоптоза статистически значимо не изменялось на 3-и и 8-е сут, и снижалось на 5-е, 14-е сут на 61,5% и 92,6% соответственно относительно группы крыс с ТТ, достигая при этом значений в группе интактных животных (табл. 1). Количество в крови лимфоцитов с поздними призна-

ками апоптоза и/или некроза статистически значимо не изменялось на 3-и и 5-е сут, снижалось на 8-е и 14-е сут на 65,6% и 50% соответственно, достигая на 14-е сут значений в группе интактных животных. Количество интактных лимфоцитов в крови статистически значимо не изменялось относительно группы с ТТ на 3-и и 8-е сут применения ТДП с ЭПО при ТТ и увеличивалось на 5-е и 14-е сут, на 8,5% и 6,3%, достигая значений в группе интактных животных.

*Содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме и лимфоцитах.* Данные по содержанию продуктов ПОЛ в плазме и лимфоцитах представлены в таблице 2. Установлено, что при ТТ в гептановой фазе липидного экстракта плазмы содержание диеновых конъюгатов увеличивалось на 3-и сут на 32,5% и снижалось на 5-е сут на 32% относительно группы интактных животных (табл. 2). На 8-е и 14-е сут содержание первичных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось. Содержание кетодиенов и сопряженных триенов статистически значимо не изменялось на 3-и, 5-е, 8-е и 14-е сут ТТ. Содержание оснований Шиффа увеличивалось на 3-и, 5-е и 14-е сут ТТ на 100%, 150% и 250% соответственно и статистически значимо не изменялось на 8-е сут относительно группы интактных животных.

В изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось на 3-и,

5-е, 8-е и 14-е сут ТТ, содержание конечных продуктов ПОЛ увеличивалось на 3-и, 5-е и 8-е сут ТТ на 450%, 800% и 2400% соответственно и статистически значимо не изменялось на 14-е сут (табл. 2).

При местном применении ТДП с ЭПО при ТТ в гептановой фазе липидного экстракта плазмы содержание диеновых конъюгатов статистически значимо снижалось на 3-и, 8-е и 14-е сут на 91,2%, 14,3%, 30% соответственно, на 5-е сут статистически значимо не изменялись. Содержание кетодиенов и сопряженных триенов снижалось на 80%, 73%, 75,8% и 80% на 3-и, 5-е, 8-е и 14-е сут соответственно, а содержание оснований Шиффа значимо снижалось (на 100%) на 8-е сут, изменения на 3-и, 5-е и 14-е сут статистически не были значимы (табл. 2).

В изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы в условиях применения ТДП с ЭПО в содержании первичных продуктов ПОЛ статистически значимых изменений не выявлено (табл. 2). Содержание вторичных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось на 3-и, 5-е и 8-е сут и снижалось (на 25,9%) на 14-е сут. Содержание оснований Шиффа снижалось на 8-е сут на 100%, а изменения на 3-и, 5-е и 14-е сут были статистически не значимы.

В гептановой фазе липидного экстракта лимфоцитов отмечалось увеличение содержания диеновых конъюгатов на 25,4%, 239% и 26,8% на 3-и, 5-е и 8-е сут соответственно, кетодиенов и сопряженных трие-

Таблица 1

**Влияние трансдермальной пленки с эритропозтином на показатели гибели лимфоцитов в крови при экспериментальной термической травме (Me (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>))**

Показатели (% клеток от общего числа)	Группы животных								
	Интактные	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО
		3-и сут		5-е сут		8-е сут		14-е сут	
Annexin-5-FITC-/7-AAD-, (интактные клетки)	91,90 (81,80-93,10)	90,20 (84,00-93,90)	86,40 (85,10-87,05)	82,10 (80,00-84,8)*	89,15 (81,50-92,35)\$	75,15 (69,15-79,65)*	75,80 (73,60-83,70)	93,45 (89,35-96,90)	99,30 (99,20-99,40)@
Annexin-5-FITC+/7-AAD-, (ранние признаки апоптоза)	7,85 (7,25-8,35)	11,90 (7,30-17,65)*	12,45 (11,10-14,00)	16,40 (14,70-18,80)*	6,30 (4,90-13,90)\$	21,40 (19,00-26,90)*	22,60 (15,55-24,25)	8,10 (4,20-11,40)	0,60 (0,35-0,70)@
Annexin-5-FITC+/7-AAD+, (поздние признаки апоптоза)	0,10 (0,10-0,30)	0,95 (0,55-1,40)*	0,95 (0,75-1,50)	1,00 (0,75-1,25)*	1,50 (0,00-2,20)	4,65 (2,50-7,40)*	1,60 (0,75-2,15)&	0,10 (0,10-0,40)	0,05 (0,00-0,10)@

**Примечание.** \* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой интактных животных; # – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой ТТ на 3-и сутки; \$ – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой ТТ на 5-е сутки; & – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой ТТ на 8-е сут; @ – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой ТТ на 14-е сут

нов на 30,7% и 80,7% на 3-и и 5-е сут ТТ соответственно. Содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось на 8-е и 14-е сут (табл. 2). Изменений в содержании оснований Шиффа при ТТ не отмечалось.

Содержание диеновых конъюгатов в изопропанольной фазе липидного экстракта лимфоцитов при ТТ на 3-и, 5-е и 8-е сут возрастало на 22,7%, 9,1% и 21,6%, еще более существенно возрастал уровень кетодиенов и сопряженных триенов на 187,5%, 250% и 162,5% соответственно. На 14-е сут ТТ содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось (табл. 2). Содержание основа-

ний Шиффа статистически значимо не изменялось на 3-и, 5-е и 14-е сут и возрастало на 8-е сут (на 133,3%) относительно группы интактных животных.

В условиях применения ТДП с ЭПО в гептановой фазе липидного экстракта лимфоцитов содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось относительно показателей группы с ТТ (табл. 2). В изопропанольной фазе содержание диеновых конъюгатов значимо снижалось только на 3-и сут (на 24%), достигая значений в группе интактных животных. Содержание кетодиенов и сопряженных триенов значимо снижалось только на 3-и и 8-е сут на 91,3% и 47,6% соответственно.

Таблица 2

**Влияние трансдермальной пленки с эритропозтином на содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме и лимфоцитах при экспериментальной термической травме (Me (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>))**

Показатели	Группы животных								
	Интактные	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО
		3-и сут			5-е сут		8-е сут		14-е сут
Плазма									
ДК, е.и.о. (г)	0,43 (0,43-0,45)	0,57 (0,40-0,75)*	0,05 (0,05-0,13)#	0,29 (0,25-0,31)*	0,39 (0,25-0,40)	0,42 (0,36-0,44)	0,36 (0,00-0,37)&	0,3 (0,34-0,69)	0,21 (0,11-0,21)@
КД и СТ, е.и.о. (г)	0,15 (0,13-0,16)	0,15 (0,08-0,25)	0,03 (0,01-0,06)#	0,26 (0,11-0,51)	0,07 (0,05-0,19)\$	0,29 (0,14-0,35)	0,07 (0,07-0,09)&	0,15 (0,08-0,26)	0,03 (0,02-0,03)@
ШО, е.и.о. (г)	0,02 (0,00-0,03)	0,04 (0,03-0,08)*	0,04 (0,03-0,06)	0,05 (0,03-0,13)*	0,05 (0,03-0,09)	0,03 (0,00-0,06)	0,00 (0,00-0,01)&	0,07 (0,02-0,11)*	0,06 (0,02-0,08)
ДК, е.и.о. (и)	0,35 (0,33-0,36)	0,37 (0,31-0,46)	0,24 (0,15-0,37)	0,40 (0,31-0,40)	0,40 (0,39-0,44)	0,39 (0,39-0,40)	0,38 (0,37-0,39)	0,37 (0,35-0,47)	0,33 (0,22-0,46)
КД и СТ, е.и.о. (и)	0,24 (0,23-0,25)	0,22 (0,19-0,23)	0,24 (0,19-0,27)	0,240 (0,24-0,24)	0,28 (0,25-0,31)	0,22 (0,19-0,22)	0,19 (0,19-0,22)	0,27 (0,21-0,28)	0,20 (0,20-0,22)@
ШО, е.и.о. (и)	0,002 (0,000-0,008)	0,011 (0,006-0,020)*	0,030 (0,010-0,060)	0,018 (0,012-0,028)*	0,010 (0,010-0,040)	0,050 (0,020-0,060)*	0,000 (0,000-0,010)&	0,009 (0,000-0,040)	0,030 (0,010-0,070)
Лимфоциты									
ДК, е.и.о. (г)	0,59 (0,55-0,67)	0,74 (0,72-0,81)*	0,45 (0,00-0,90)	2,00 (0,00-3,75)*	0,43 (0,40-0,78)	0,55 (0,28-0,85)*	0,70 (0,60-1,00)	0,36 (0,20-0,52)	0,29 (0,00-0,90)
КД и СТ, е.и.о. (г)	0,26 (0,25-0,28)	0,34 (0,26-0,38)*	0,43 (0,00-0,53)	0,47 (0,25-1,17)*	0,47 (0,00-0,61)	0,14 (0,04-0,45)	0,30 (0,05-0,33)	0,35 (0,19-0,52)	0,60 (0,00-0,82)
ШО, е.и.о. (г)	0,10 (0,07-0,13)	0,22 (0,22-0,32)	0,17 (0,10-0,33)	0,25 (0,00-0,33)	0,27 (0,17-0,39)	0,15 (0,00-0,33)	0,10 (0,07-0,33)	0,12 (0,00-0,21)	0,14 (0,10-0,18)
ДК, е.и.о. (и)	0,88 (0,66-1,02)	1,08 (1,06-1,12)*	0,82 (0,38-0,92)#	0,96 (0,89-1,52)*	0,80 (0,76-1,40)	1,07 (0,89-1,14)*	1,00 (0,71-1,10)	0,95 (0,77-1,05)	0,92 (0,90-0,92)
КД и СТ, е.и.о. (и)	0,08 (0,00-0,37)	0,23 (0,14-0,45)*	0,02 (0,00-0,17)#	0,28 (0,21-0,36)*	0,22 (0,10-0,25)	0,21 (0,19-0,25)*	0,11 (0,10-0,13)&	0,23 (0,12-0,30)	0,21 (0,18-0,27)
ШО, е.и.о. (и)	0,03 (0,02-0,06)	0,07 (0,03-0,11)	0,03 (0,00-0,03)	0,10 (0,02-0,13)	0,10 (0,06-0,16)	0,07 (0,05-0,09)*	0,03 (0,03-0,04)&	0,05 (0,02-0,08)	0,08 (0,03-0,11)

**Примечание.** \* – статистически значимые различия (p<0,05) с группой интактных животных; # – статистически значимые различия (p<0,05) с группой ТТ на 3-и сут; \$ – статистически значимые различия (p<0,05) с группой ТТ на 5-е сут; & – статистически значимые различия (p<0,05) с группой ТТ на 8-е сут; @ – статистически значимые различия (p<0,05) с группой ТТ на 14-е сут; г - гептановая, и - изопропанольная.

Содержание оснований Шиффа на 8-е сут снижалось до уровня интактных животных.

*Активность ферментов антиоксидантной системы в крови при экспериментальной термической травме.* Активность СОД в плазме при ТТ на 3-и, 8-е и 14-е сут снижалась на 38,6%, 41,7% и 87,7% соответственно, на 5-е сут статистически значимо не изменялась (табл. 3). Активность каталазы в плазме возрастала на 5-е и 8-е сут ТТ на 51,2% и 39,3% соответственно и статистически значимо не изменялась на 3-и и 14-е сут. Активность каталазы в эритроцитах увеличивалась на 5-е, 8-е и 14-е сут ТТ относительно группы интактных животных на 87,1%, 368% и 92,6% соответственно.

При ТТ в условиях местного применения пленки с ЭПО активность СОД в плазме увеличивалась на 3-и, 8-е и 14-е сут на 25,1%, 89,5% и 82,2% соответственно. Изменений на 5-е сут не отмечалось. При этом на 8-е и 14-е сут показатели активности достигали значений интактных животных (табл. 3). Активность каталазы в плазме снижалась на 5-е и 8-е сут на 36,7% и 33,5%, достигая значений животных интактной группы. Изменений на 3-и и 14-е сут выявлено не было. Активность каталазы в эритроцитах возрастала на 3-и сут (на 5%) и снижалась на 5-е, 8-е и 14-е сут (на 68%, 84,2% и 33% соответственно). Отметим, что на 5-е и 8-е сут активность каталазы достигала значений интактных животных.

Мы считаем, что увеличение количества лимфоцитов в крови с признаками апоптоза и/или некроза при ТТ может быть связано с увеличением concentra-

ции в крови проапоптогенных цитокинов, например ФНО- $\alpha$ , свободных радикалов и другими факторами [14, 15]. При проведении корреляционного анализа установлена прямая статистически значимая сильная связь между содержанием лимфоцитов в крови с ранними признаками апоптоза и содержанием оснований Шиффа в изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы (на 8-е сут  $R=0,96; p<0,05$ ), содержанием кетодиенов и сопряженных триенов в изопропанольной фазе липидного экстракта лимфоцитов (на 5-е сут  $R=0,95; p<0,05$ ) и содержанием диеновых конъюгатов в изопропанольной фазе липидного экстракта лимфоцитов (на 8-е сут  $R=0,79; p<0,05$ ).

Как известно, продукты ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта плазмы и лимфоцитов содержат основную часть триацилглицеридов (резервных липидов), а продукты ПОЛ в изопропанольной фазе — основную часть фосфолипидов. По данным ряда исследователей [16] накопление продуктов ПОЛ зависит от глубины и площади повреждения: при поверхностных ожоговых повреждениях в большей степени увеличивается содержание конечных продуктов ПОЛ, в частности малонового диальдегида, а при глубоких повреждениях — содержание первичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов). Увеличение содержания диеновых конъюгатов связано с активацией биосинтеза простагландинов, лейкотриенов и цитокинов — факторов хемотаксиса лейкоцитов, которым в качестве субстрата необходимы полиненасыщенные жирные кислоты с сопряженными связями [16]. Активация при

Таблица 3

**Влияние трансдермальной пленки с эритропоэтином на активность ферментов антиоксидантной защиты в крови при экспериментальной термической травме (Me (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>))**

Показатели	Группа								
	Интактные	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО
		3 сут		5 сут		8 сут		14 сут	
СОД плазмы, Ед/мл	1,63 (1,39-1,78)	1,00 (1,00- 1,14)*	1,22 (1,20- 1,25)#	1,15 (0,75- 1,55)	1,07 (1,05-1,15)	0,95 (0,90- 1,40)*	1,80 (1,80- 1,80)&	0,20 (0,15- 0,90)*	1,54 (1,52- 1,57)@
Каталаза плазмы, мкат/л	21,10 (20,50- 22,20)	18,30 (15,80- 25,70)	25,60 (16,80- 25,80)	31,90 (28,60- 37,40)*	20,20 (18,50- 24,60)\$	29,40 (26,2- 49,4)*	19,55 (14,85- 25,10)&	22,90 (20,10- 26,10)	16,40 (16,40- 39,70)
Каталаза эритро- цитов, мкат/л	6,36 (5,60-6,70)	6,20 (4,30- 6,40)	6,52 (5,98- 7,20)#	11,90 (10,60- 12,00)*	3,80 (2,70- 4,80)\$	29,80 (28,50- 30,60)*	4,70 (3,70-4, 80)&	12,25 (12,00- 14,10)*	8,20 (7,50- 8,60)@

**Примечание.** \* — статистически значимые различия ( $p<0,05$ ) с группой интактных животных; # — статистически значимые различия ( $p<0,05$ ) с группой ТТ на 3 сут; \$ — статистически значимые различия ( $p<0,05$ ) с группой ТТ на 5 сут; & — статистически значимые различия ( $p<0,05$ ) с группой ТТ на 8 сут; @ — статистически значимые различия ( $p<0,05$ ) с группой ТТ на 14 сут.

ТТ некоторых ферментов антиоксидантной защиты, в частности каталазы в крови может быть связана с высвобождением ее из поврежденных тканей в ответ на разрушение эритроцитов, которые, как известно, могут стать причиной инициации процессов свободно-радикального окисления. Вероятно, снижение активности СОД в плазме обусловлено не только активацией продукции АФК нейтрофилами, но также разрушением эритроцитов при ТТ [17].

Одним из механизмов прямого и/или опосредованного действия ЭПО в составе ТДП при ТТ может быть изменение процессов свободно-радикального окисления, активности некоторых ферментов антиоксидантной защиты в крови. Так, нами установлена сильная отрицательная статистически значимая корреляция между активностью СОД в крови и содержанием первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидного экстракта лимфоцитов на 3-и сут применения ТДП с ЭПО при ТТ ( $R = -0,98$ ;  $R = -0,73$ ;  $R = -0,91$ ,  $p < 0,05$  соответственно).

По данным литературы, при подкожном введении ЭПО в разовой дозе 500 МЕ/кг мышам с повреждениями кожи на 7 сут снижается содержание в крови малонового диальдегида, преимущественно за счет снижения выработки активных форм кислорода и медиаторов воспаления [18]. Положительный эффект эритропоэтина отмечался и при других патологических процессах [19].

### Выводы

1. При экспериментальной термической травме по сравнению с интактными животными в крови увеличивается количество лимфоцитов с ранними и поздними признаками апоптоза и/или признаками некроза, содержание продуктов перекисного окисления липидов в гептановой и изопропанольной фазах липидных экстрактов плазмы и лимфоцитов, активность каталазы в плазме и эритроцитах, снижается активность супероксиддисмутазы в плазме крови.

2. В условиях применения трансдермальной пленки с эритропоэтином при экспериментальной термической травме наблюдается снижение количества лимфоцитов в крови с ранними и поздними признаками апоптоза и/или признаками некроза, содержания продуктов перекисного окисления липидов в плазме и лимфоцитах, активности каталазы в плазме и эритроцитах, увеличение активности супероксиддисмутазы в плазме крови относительно группы животных с термической травмой.

### Литература

1. Алексеев А.А., Бобровников А.Э., Крутиков М.Г., Тюрников Ю.И., Богданов С.Б. Местное консервативное лечение ран на этапах оказания помощи пострадавшим от ожогов: клинические рекомендации. *Общероссийская общественная организация «Объединение комбустиологов «Мир без ожогов»*. 2014: 1-17.
2. Ожоги. Информационный бюллетень № 365 от 2016 г. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/ru/>
3. Rani M., Schwacha M.G. Aging and the pathogenic response to burn. *Aging dis.* 2012; 3(2): 171–80.
4. Shalom A., Kramer E., Westreich M. Protective effect of human recombinant copper–zinc superoxide dismutase on zone of stasis survival in burns in rats. *Ann plasturg.* 2011; 66(6): 607–9.
5. Дубинина Е.Е. *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение)*. Санкт–Петербург; Мед. прессы; 2006.
6. Осиков М.В., Григорьев Т.А. Влияние эритропоэтина на активность системы плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности. *Бюл. экспериментальной биологии и медицины*. 2012, 153(1): 27–30.
7. Осиков М.В., Ахматов В.Ю., Телешева Л.Ф., Федосов А.А., Агеев Ю.И., Суровяткина Л.Г. Плейотропные эффекты эритропоэтина при хронической почечной недостаточности. *Фундаментальные исследования*. 2013; 7(1): 218–24. Available at: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=31817>.
8. Tobalem M., Harder Y., Rezaeian F., Wettstein R. Secondary burn progression decreased by erythropoietin. *Crit Care Med.* 2013; 41(4): 963–71.
9. Giri P., Ebert S., Braumann U.D., Kremer M., Giri S., Machens H.G., Bader A. Skin regeneration in deep second-degree scald injuries either by infusion pumping or topical application of recombinant human erythropoietin gel. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 2565–79.
10. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*. Челябинск; Изд-во ЧелГПУ; 2000.
11. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. *Лабораторное дело*. 1985; 11: 678–81.
12. Коралюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Определение активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16–9.
13. Коробейникова Э.Н., Зурочка А.В., Евдокимова Е.В. *Показатели липидного обмена в сыворотке крови практически здорового населения, проживающего в Южно–Уральском регионе в условиях адаптации к климатическим и техногенным воздействиям: методические указания*. Челябинск; Изд-во ЧелГМА; 2002.
14. Deveci M., Eski M., Sengezer M., Kisa U. Effects of cerium nitrate bathing and prompt burn wound excision on IL–6 and TNF– $\alpha$  levels in burned rats. *Burns*. 2000, 26(1): 41–5.
15. Kawakami M., Kaneko N., Anada H., Terai C., Okada Y. Measurement of interleukin–6, interleukin–10, and tumor necrosis factor– $\alpha$  levels in tissues and plasma after thermal injury in mice. *Surgery*. 1997; 121 (4): 440–8.
16. Николаев В.М., Алексеев С.Н., Алексеев Р.З. Перекисное окисление липидов у больных с холодовой травмой разной степени тяжести. *Наука и образование*. 2006; 2: 140–4.

17. Leff J.A., Burton L.K., Berger E.M., Anderson B.O., Wilke C.P., Repine J.E. Increased serum catalase activity in rats subjected to thermal skin injury. *Inflammation*. 1993; 17(2): 199–204.
18. Sayan H., Ozacmak V.H., Guven A., Aktas R. G., Ozacmak I.D. Erythropoietin stimulates wound healing and angiogenesis in mice. *J. of investigative surgery*. 2006; 19: 163–73.
8. Tobalem M., Harder Y., Rezaeian F., Wettstein R. Secondary burn progression decreased by erythropoietin. *Crit Care Med*. 2013; 41(4): 963–71.
9. Giri P., Ebert S., Braumann U.D., Kremer M., Giri S., Machens H.G., Bader A. Skin regeneration in deep second-degree scald injuries either by infusion pumping or topical application of recombinant human erythropoietin gel. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9: 2565–79.
10. Volchegorskiy I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Tseylikman V.Eh., Tishevskaya N.V. *Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the organism*. Chelyabinsk; Izd-vo CHELGPU; 2000. (in Russian)

### References

1. Alekseev A.A., Bobrovnikov A.Eh., Krutikov M.G., Tyurnikov Yu.I., Bogdanov S.B. Mast conservative treatment of wounds at the stages of rendering assistance to victims of burns: Clinic recommendations [*Mestnoe konservativnoe lechenie ran na etapakh okazaniya pomoshchi postradavshim ot ozhogov: klinicheskie rekomendatsii.*] *Obshcherossiyskaya obshchestvennaya organizatsiya «Ob"edinenie kombustologov «Mir bez ozhogov»*. 2014: 1–17. (in Russian)
2. Burns. *Informatsionnyy byulleten' № 365* of 2016 g. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/ru/> (Accessed 25 May 2018)
3. Rani M., Schwacha M.G. Aging and the pathogenic response to burn. *Aging dis*. 2012; 3(2): 171–80.
4. Shalom A., Kramer E., Westreich M. Protective effect of human recombinant copper–zinc superoxide dismutase on zone of stasis survival in burns in rats. *Ann plasturg*. 2011; 66(6): 607–9.
5. Dubinina E.E. *Products of oxygen metabolism in the functional activity of cells (life and death, song and destruction)* [*Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noy aktivnosti kletok (zhizn' i smert', sozidanie i razrushenie)*]. Sankt–Peterburg; Med. pressa; 2006. (in Russian)
6. Osikov M.V., Grigor'ev T.A. Influence of the retina on the activity of the plasma system in experimental high position to distract. *Byul. ehksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2012, 153(1): 27–30. (in Russian)
7. Osikov M.V., Ahmatov V.Yu., Telesheva L.F., Fedosov A. A., Ageev Yu. I., Surovyatkina L.G. Pleiotropic effects of erythropoietin in chronic renal failure. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013; 7(1): 218–24. Available at: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=31817>. (Accessed 25 May 2018) (in Russian)
11. CHEvari S., CHaba I., Sekej I. The role of superoxide dismutase in kill cell process and the method of determining it in biological materials. *Laboratornoe delo*. 1985; 11: 678–81. (in Russian)
12. Koralyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V. E. Determination of catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16–9. (in Russian)
13. Korobeynikova Eh.N., Zurochka A.V., Evdokimova E.V. *Indicators of lipid metabolism in blood serum of healthy population living in the South Ural region in the conditions of adaptation to climatic and man-made impacts: guidelines*. Chelyabinsk; Izd-vo CHELGMA; 2002. (in Russian)
14. Deveci M., Eski M., Sengezer M., Kisa U. Effects of cerium nitrate bathing and prompt burn wound excision on IL–6 and TNF– $\alpha$  levels in burned rats. *Burns*. 2000, 26(1): 41–5.
15. Kawakami M., Kaneko N., Anada H., Terai C., Okada Y. Measurement of interleukin–6, interleukin–10, and tumor necrosis factor– $\alpha$  levels in tissues and plasma after thermal injury in mice. *Surgery*. 1997; 121(4): 440–8.
16. Nikolaev V.M., Alekseev S.N., Alekseev R.Z. Lipid peroxidation in patients with cold injury of varying severity. *Nauka i obrazovanie*. 2006, 2: 140–4. (in Russian)
17. Leff J.A., Burton L.K., Berger E.M., Anderson B. O., Wilke C. P., Repine J. E. Increased serum catalase activity in rats subjected to thermal skin injury. *Inflammation*. 1993; 17(2): 199–204.
18. Sayan H., Ozacmak V.H., Guven A., Aktas R. G., Ozacmak I. D. Erythropoietin stimulates wound healing and angiogenesis in mice. *J. of investigative surgery*. 2006, 19: 163–73.

### Сведения об авторах:

**Осиков Михаил Владимирович**, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, доктор мед. наук, проф.;

**Симонян Елена Владимировна**, зав. каф. фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, канд. фарм. наук, доцент;

**Башарова Оксана Тагировна**, канд. биол. наук, инженер-хроматографист ООО «Завод Медсинтез».

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Миронов А.В., Кривкина Е.О., Барбараш О.Л.

## Сравнение токсического действия сферических и игольчатых кальций-фосфатных бионов на поврежденную интиму брюшной аорты крыс

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ), 650002, г. Кемерово, Россия, Сосновый бульвар, д. 6

**Цель исследования** – оценка токсического действия сферических кальций-фосфатных бионов и игольчатых кальций-фосфатных бионов на предварительно поврежденную интиму аорты крыс.

**Методика.** Токсическое действие сферических кальций-фосфатных бионов и игольчатых кальций-фосфатных бионов на поврежденную интиму брюшной аорты крыс линии Wistar ( $n = 10$  на группу) оценивали путем их однократного внутривенного введения после баллонной ангиопластики с эксплантацией поврежденного участка аорты через 5 нед. Биоптаты анализировали: 1) классическими гистологическими методами (окрашивание гематоксилин-эозином, ализариновым красным, по Вейгерту-ван Гизону и по Расселлу-Мовату); 2) иммунофлуоресцентным окрашиванием криосрезов (сочетанное окрашивание на CD31 и CD34, на CD31 и  $\alpha$ -гладкомышечный актин ( $\alpha$ -ГМА), на виментин и  $\alpha$ -ГМА, на коллаген IV типа и  $\alpha$ -ГМА). Для оценки влияния системного воспаления на КФБ-индуцированную эндотелиотоксичность определяли содержание моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1/CCL2) и церулоплазмينا в сыворотке крови прооперированных крыс посредством иммуноферментного анализа.

**Результаты.** Сферические кальций-фосфатные бионы и игольчатые кальций-фосфатные бионы вызывали выраженную гипертрофию интимы брюшной аорты в 90% (9 из 10 крыс) и 80% случаев (8 из 10 крыс) соответственно, в то время как частота гипертрофии в группе контрольных крыс составила лишь 10% (1 из 10 крыс). Неинтима при экспозиции интимы брюшной аорты обоим типам бионов характеризовалась переходом фенотипа клеток мезенхимального ряда с контрактильного ( $\alpha$ -ГМА-положительные и виментин-отрицательные гладкомышечные клетки) и неактивного ( $\alpha$ -ГМА-отрицательные и виментин-положительные фибробласты) на активный синтетический ( $\alpha$ -ГМА- и виментин-положительные клетки), что приводило к формированию значительных количеств экстрацеллюлярного матрикса. Внутривенное введение сферических кальций-фосфатных бионов и игольчатых кальций-фосфатных бионов не приводило к изменению уровней MCP-1/CCL2 и церулоплазмينا в сыворотке крови, что свидетельствовало об отсутствии их возможного влияния на развитие системного воспалительного ответа.

**Заключение.** Внутривенное введение кальций-фосфатных бионов после повреждения интимы брюшной аорты крыс путем баллонной ангиопластики вызывает развитие гипертрофии интимы, частота и выраженность которой не зависит от формы кальций-фосфатных бионов и которая характеризуется переходом фенотипа клеток мезенхимального ряда из контрактильного/неактивного на активный синтетический. При этом эндотелиотоксическое действие кальций-фосфатных бионов обусловлено их непосредственным воздействием на эндотелий, а не развитием системного воспаления.

**Ключевые слова:** атеросклероз; бионы; наночастицы; фосфат кальция; токсичность; эндотелий; гипертрофия интимы; системное воспаление.

**Для цитирования:** Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Миронов А.В., Кривкина Е.О., Барбараш О.Л. Сравнение токсического действия сферических и игольчатых кальций-фосфатных бионов на поврежденную интиму брюшной аорты крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 80-88.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.80-88

**Для корреспонденции:** Кутихин Антон Геннадьевич, зав. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза ФГБНУ НИИ КПССЗ, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

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

**Поступила** 09.10.2018

Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Mironov A.V., Krivkina E.O., Barbarash O.L.

## TOXICITY OF SPHERICAL AND NEEDLE-SHAPED CALCIUM PHOSPHATE BIONS TO INJURED INTIMA OF THE RAT ABDOMINAL AORTA

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Sosnovy Blvd 6, Kemerovo 650002, Russia

**Purpose.** To compare toxicity of spherical calcium phosphate bions (SCPB) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPB) to injured intima of rat aortas.

**Methods.** Toxicity of SCPB and NCPB to injured abdominal aortas of Wistar rats (n = 10 per group) was evaluated using intravenous administration of the bions after balloon angioplasty. Rats were sacrificed five weeks postoperation, and an injured aortic segment was excised. Tissue preparations were stained with hematoxylin and eosin, alizarin red S, Weigert-van Gieson, and Movat's pentachrome stains. Selected tissue samples were then examined using combined immunofluorescence staining (CD31/CD34, CD31/ $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA),  $\alpha$ -SMA/vimentin, and  $\alpha$ -SMA/collagen IV). Possible influence of systemic inflammation on CPB-induced endothelial toxicity was assessed by measuring monocyte chemoattractant protein-1 and ceruloplasmin in rat serum using the enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results.** Intravenous administration of SCPB or NCPB provoked intimal hyperplasia in 90% (9 of 10) and 80% (8 of 10) of rats vs. 10% (1 of 10) in the control group. The neointima was characterized by a phenotypic switch of mesenchymal cells, i.e. transition of a contractile ( $\alpha$ -SMA-positive, vimentin-negative vascular smooth muscle cells) and quiescent ( $\alpha$ -SMA-negative vimentin-positive fibroblasts) to an active synthetic phenotype (double-positive cells), which resulted in deposition of the extracellular matrix. Neither SCPB nor NCPB changed serum levels of pro-inflammatory molecules, MCP-1/CCL2, and ceruloplasmin.

**Conclusions.** Intravenous administration of CPB upon balloon-induced vascular injury caused intimal hyperplasia regardless of the CPB shape. Hyperplasia foci were characterized by a switch of mesenchymal cells from a contractile/quiescent to an active synthetic phenotype. Endothelial toxicity of CPBs was defined by their direct cytotoxic action rather than induction of systemic inflammation.

**Keywords:** atherosclerosis; bions; nanoparticles; calcium phosphate; toxicity; endothelium; intimal hyperplasia; systemic inflammation.

**For citation:** Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Mironov A.V., Krivkina E.O., Barbarash O.L. Toxicity of spherical and needle-shaped calcium phosphate bions for injured intima of abdominal aorta. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 80-88. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 80-88

**For correspondence:** Anton G. Kutikhin, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

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

**Acknowledgements.** This study was supported by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases # 0546-2015-0011 Pathogenetic Basis for the Development of Cardiovascular Implants from Biocompatible Materials Using Patient-Oriented Approach, Mathematical Modeling, Tissue Engineering, and Genomic Predictors.

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

### Information about authors:

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

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

Barbarash O.L., <http://orcid.org/0000-0002-4642-3610>

**Received** 09.10.2018

## Введение

Из клинко-эпидемиологических исследований достаточно давно известно, что повышенный уровень ионов кальция и фосфора в крови ассоциирован с атеросклерозом и его клиническими проявлениями — ишемической болезнью сердца и острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу [1, 2]. Известно также, что сниженный уровень ингибиторов эктопической кальцификации фетуина-А и альбумина в крови также ассоциирован с повышенным риском развития ишемической болезни сердца [3, 4].

В то же время свободные ионы кальция и фосфора могут приводить к прямой кальцификации средней оболочки сосудов без признаков атеросклеротического поражения [5, 6]. Ингибирование кальцификации меди осуществляется за счет функционирования ряда белков с различными механизмами связывания кальция — альбумином, остеоонектином и фетуином-А [7]. Альбумин связывает ионизированный кальций посредством множественных отрицательно заряженных аминокислот на своей поверхности, остеоонектин — при помощи EF-руки, специфического белкового домена [7]. Связывание кальция фетуином-А обусловлено от-

рицательными зарядами  $\beta$ -слоя домена D1, которые занимают места фосфатных групп в кристаллах гидроксиапатита [7]. Таким образом, альбумин и остеоонектин связывают свободный кальций с низкой и высокой аффинностью соответственно, а фетуин-А отвечает за высокоаффинное связывание фосфата кальция [7].

В свою очередь, связывание фосфата кальция фетуином-А также осуществляется двумя различными механизмами [8]. Первым из них является стабилизация мономерами фетуина-А субнаноразмерных кластеров фосфата кальция [8]. Несмотря на теоретическую возможность их визуализации методами высококоразрешающей электронной микроскопии и элементного анализа, на данный момент изучение роли таких кластеров в патогенезе различных видов решения задач патологической физиологии технически затруднительно вследствие их чрезвычайно малой размерности. Другим механизмом связывания фетуином-А фосфата кальция является формирование кальций-фосфатных бионов (КФБ) – кристаллических частиц гидроксиапатита и карбонат-гидроксиапатита (80–500 нм в диаметре), имеющих губчатую структуру и включающих в себя еще ряд белков сыворотки крови [8–10]. При избытке ионов кальция и фосфора или нарушении их выведения КФБ способны накапливаться в крови человека [9, 10].

Поскольку, являясь фактором риска развития атеросклероза, повышенный уровень ионов кальция и фосфора в крови также приводит к формированию КФБ, нами была *выдвинута гипотеза* о триггерной роли КФБ в развитии атеросклероза вследствие повреждения ими эндотелия [10, 11]. Было обнаружено, что КФБ интернализируются эндотелиальными клетками, индуцируя секрецию провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8, запуская процесс апоптоза по внутреннему пути и вызывая развитие гипертрофии интимы брюшной аорты крыс [10]. Показано, что КФБ выделяются из 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека [10]. КФБ могут быть также синтезированы искусственно, что может быть использовано при моделировании эндотелиотоксичности [9, 10].

Клиническая значимость феномена образования КФБ в крови обусловлена предрасположенностью сыворотки крови пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью (ХПН) и больных артериальной гипертензией к формированию КФБ по сравнению с условно здоровыми донорами крови [12]. Кроме того, предрасположенность сыворотки крови к формированию КФБ ассоциирована с неблагоприятным прогнозом у пациентов с хронической болезнью почек

3-й и 4-й стадией [13], а также у больных терминальной ХПН, включая пациентов, перенесших трансплантацию почки. При этом у всех пациентов со склонностью к формированию КФБ повышен риск летального исхода, в том числе и от сердечно-сосудистых причин [14–16]. С научной и клинической точки зрения представляется чрезвычайно важным детальное изучение механизмов патогенного и, в частности, эндотелиотоксического действия КФБ.

Проведенные ранее эксперименты позволили предположить, что при умеренном перенасыщении крови ионами кальция и фосфора могут образовываться КФБ сферической формы (СКФБ), а при тяжелом перенасыщении – КФБ игольчатой формы (ИКФБ) [17]. При этом известно, что форма наночастиц является одним из основных факторов, определяющих их патогенность, в частности, наночастицы игольчатой формы значительно опаснее сферических [18–20]. Цель исследования – сравнение эндотелиотоксического действия СКФБ и ИКФБ на предварительно поврежденную интиму брюшной аорты крыс.

## Методика

**Приготовление СКФБ и ИКФБ.** Искусственный синтез СКФБ осуществляли путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5М  $\text{CaCl}_2$  (Sigma-Aldrich) и 21,5 мкл 0,2М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich) в 1319 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Gibco), содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. ИКФБ были синтезированы при помощи последовательного добавления 16,5 мкл 0,5М  $\text{CaCl}_2$  (Sigma-Aldrich) и 37,5 мкл 0,2М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich) к 936 мкл среды DMEM, содержащей 10 мкл (1% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. Контроль pH осуществляли путем предварительного добавления 5 мл буфера HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфокислота, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid, Gibco) к 495 мл культуральной среды DMEM (конечная 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 °С, 5%  $\text{CO}_2$  и 90% влажности (МСО-18А1С, Sanyo) в течение 24 ч с дальнейшим центрифугированием при 200,000 g и 4 °С в течение 1 ч (Optima MAX-XP, Beckman Coulter). С целью получения рабочей суспензии для инъекции осадок СКФБ растворяли в 300 мкл, а осадок ИКФБ – в 1500 мкл 0,9% раствора NaCl, что позволяло достичь мутности суспензии в 0,5 стандарта Мак-

Фарланда (МкФ), эквивалентной оптической плотности на длине волны 650 нм 0,08-0,10. Данные значения соответствуют минимально измеримой и патофизиологически релевантной концентрации бионов в растворе. Все вышеуказанные процедуры проводились в стерильных условиях.

*Эксперименты на животных.* 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 НИИ КПССЗ. Эксперименты выполнены на самцах крыс линии Wistar ( $n = 30$ ) массой 200–300 г, на модели повреждения интимы брюшной аорты баллоном для коронарной ангиопластики. Все животные получали ингаляционную анестезию в течение всей операции. Животное фиксировали в положении на спине, обрабатывали операционное поле 70% этанолом. Затем выполняли полную срединную лапаротомию. После изолирования полости брюшины салфетками, петли кишечника отводили вправо и заворачивали в предварительно увлажненную и согретую салфетку. Вдоль корня брыжейки вскрывали задний листок брюшины и выделяли аорту от уровня почечных артерий до бифуркации. На аорту дистальнее почечных артерий и на уровне бифуркации накладывали 2 сосудистых зажима типа «бульдог». При этом одновременно пережимали аорту и нижнюю полую вену. На 3 мм проксимальнее бифуркации аорты аорту пунктировали в проксимальном направлении иглой 21G и в просвет сосуда заводили баллон для коронарной баллонной ангиопластики. Затем проводили ангиопластику давлением 6 атм в течении 30 с. После этого баллон извлекали, просвет аорты промывали 0,9% NaCl, накладывали П-образный шов (Prolene 8-0). Место повреждения эндотелия после проведения ангиопластики находилось на 4 мм проксимальнее П-образного шва. Петли кишечника возвращали в брюшную полость, переднюю брюшную стенку послойно ушивали непрерывным обвивным швом (Лавсан 4-0). Непосредственно перед ушиванием брюшную полость заполняли подогретым до 37 °C 0,9% NaCl. Для изучения токсического действия бионов на интиму аорты крыс суспензию СКФБ или ИКФБ (900 мкл, 0,5 МкФ) или такой же объем стерильного 0,9% NaCl (контроль) однократно вводили в хвостовую вену (по 10 животных на группу). Все процедуры проводились в стерильных условиях. После операции животных помещали в клетку на теплую подстилку. Осмотр крыс проводился ежедневно.

Через 5 нед под наркозом забирали поврежденный участок брюшной аорты, который разрезали на два равных сегмента – один фиксировали в 10% нейтральном

забуференном формалине в течение 24 ч при 4 °C с последующей заливкой в парафин, а второй замораживали при -140 °C. Для изучения аорт готовили циркулярные срезы толщиной 8 мкм (12 серийных срезов, равномерно распределенных по всей длине соответствующего сегмента аорты, на стекло). Для анализа использовали: 1) классические гистологические методы (окрашивание гематоксилин-эозином, ализариновым красным, по Вейгерту-ван Гизону и по Расселлу-Мовату); 2) иммунофлюоресцентное окрашивание криосрезов (использованы сочетанные окраски а) на маркер зрелых эндотелиальных клеток CD31 и маркер эндотелиальных прогениторных клеток CD34, б) на CD31 и маркер сосудистых гладкомышечных клеток  $\alpha$ -гладкомышечный актин ( $\alpha$ -ГМА), в) на маркер фибробластов виментин и  $\alpha$ -ГМА, г) на маркер экстрацеллюлярного матрикса коллаген IV типа и  $\alpha$ -ГМА, после всех окрасок докрашивали ядерным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) с последующей конфокальной лазерной сканирующей микроскопией (LSM 700, Carl Zeiss). Оценивали наличие или отсутствие гипертрофии интимы, а также отношение утолщенного участка интимы к наиболее тонкому (для количественной оценки гипертрофии интимы) в программе ImageJ. У всех животных брали кровь для определения в сыворотке концентрации провоспалительных молекул моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1/CCL2) и церулоплазмينا посредством иммуноферментного анализа (наборы ab100777 и ab108820, Abcam).

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

Через 5 нед после введения бионов в хвостовую вену крыс в предварительно поврежденных баллоном участках брюшных аорт при окрашивании гематоксилин-эозином выявлена гипертрофия интимы в группах крыс с введением СКФБ (9 из 10 крыс) и ИКФБ (8 из 10 крыс) (рис. 1, а). В то же время в контроле частота гипертрофии интимы была кратно ниже (1 из 10 крыс) (рис. 1, а). При оценке выраженности гипертрофии интимы отсутствовали статистически значимые

различия между группами животных, которым вводили СКФБ и ИКФБ (рис. 1, б).

Репрезентативные микрофотографии окрашенных гематоксилин-эозином срезов брюшных аорт представлены на рис. 2, а. Окрашивание ализариновым красным показало полное отсутствие признаков кальцификации сосудистой ткани во всех образцах (рис. 2, б).

Окрашивание на коллаген и эластин (по Вейгерту-ван Гизону) позволило визуализировать внутреннюю эластическую мембрану, отделяющую интиму от меди. У крыс, которым внутривенно вводились СКФБ и ИКФБ, отчетливо визуализировалась гипертрофия интимы брюшной аорты (рис. 3, а). Пентахромное окрашивание на фибрин и все компоненты сосудистой

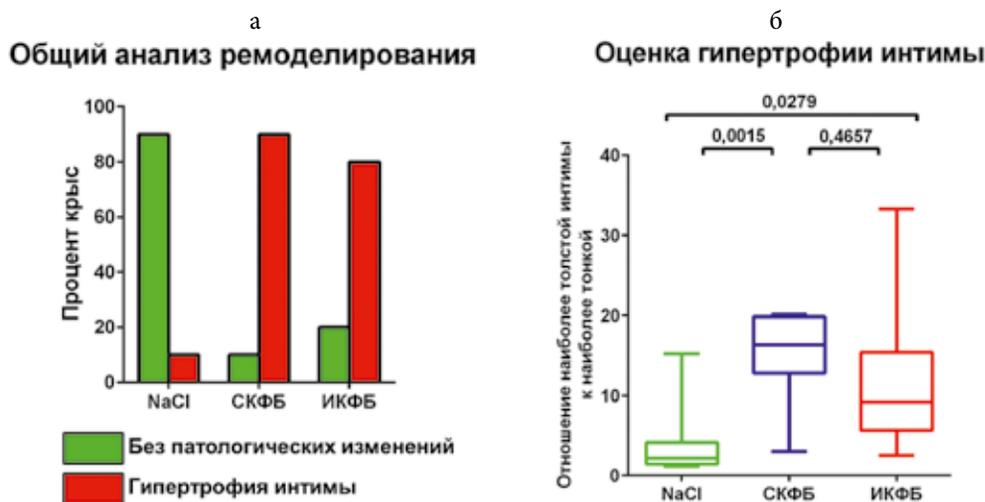


Рис. 1. Анализ а) частоты и б) выраженности гипертрофии интимы брюшной аорты крыс после проведения баллонной ангиопластики и однократного внутривенного введения 0,9% раствора NaCl, сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) или игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ).



Рис. 2. Брюшная аорта крыс после проведения баллонной ангиопластики и однократного внутривенного введения 0,9% раствора NaCl, сферических кальций-фосфатных бионов или игольчатых кальций-фосфатных бионов. а) окрашивание гематоксилин-эозином и б) окрашивание ализариновым красным (увеличение  $\times 50$ , вставки в левом нижнем углу –  $\times 200$ ).

ткани (коллаген, эластин, гладкую мышечную ткань и основное вещество) по Расселлу-Мовату позволило оценить эластическую мембрану и состояние всех компонентов сосудистой стенки в отдельности (рис. 3, б).

При сочетанном окрашивании на маркер зрелых эндотелиальных клеток CD31 и маркер эндотелиальных прогениторных клеток CD34 был обнаружен монослой CD31<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> клеток (рис. 4), свидетельствующий о процессе реэндотелизации брюшной аорты крыс после ангиопластики и последующего введения бионов. Реэндотелизация осуществляется по механизму миграции и пролиферации зрелых эндотелиальных клеток из неповрежденного эндотелия, а не по механизму адгезии и дифференцировки эндотелиальных прогениторных клеток из кровотока. Сочетанное окрашивание на CD31 и маркер сосудистых гладкомышечных клеток  $\alpha$ -ГМА выявило значительное количество CD31<sup>-</sup> $\alpha$ -ГМА<sup>+</sup> клеток в неоинтимае (рис. 4), что указывает на участие механизма миграции и пролиферации гладкомышечных клеток из меди в формировании неоинтимы. В свою очередь, сочетанное окрашивание на маркер фибробластов виментин и  $\alpha$ -ГМА также показало присутствие в неоинтимае виментин<sup>+</sup> $\alpha$ -ГМА<sup>+</sup> клеток (рис. 4), предположительно образовавшихся в результате активации местных фибробластов и фибро-

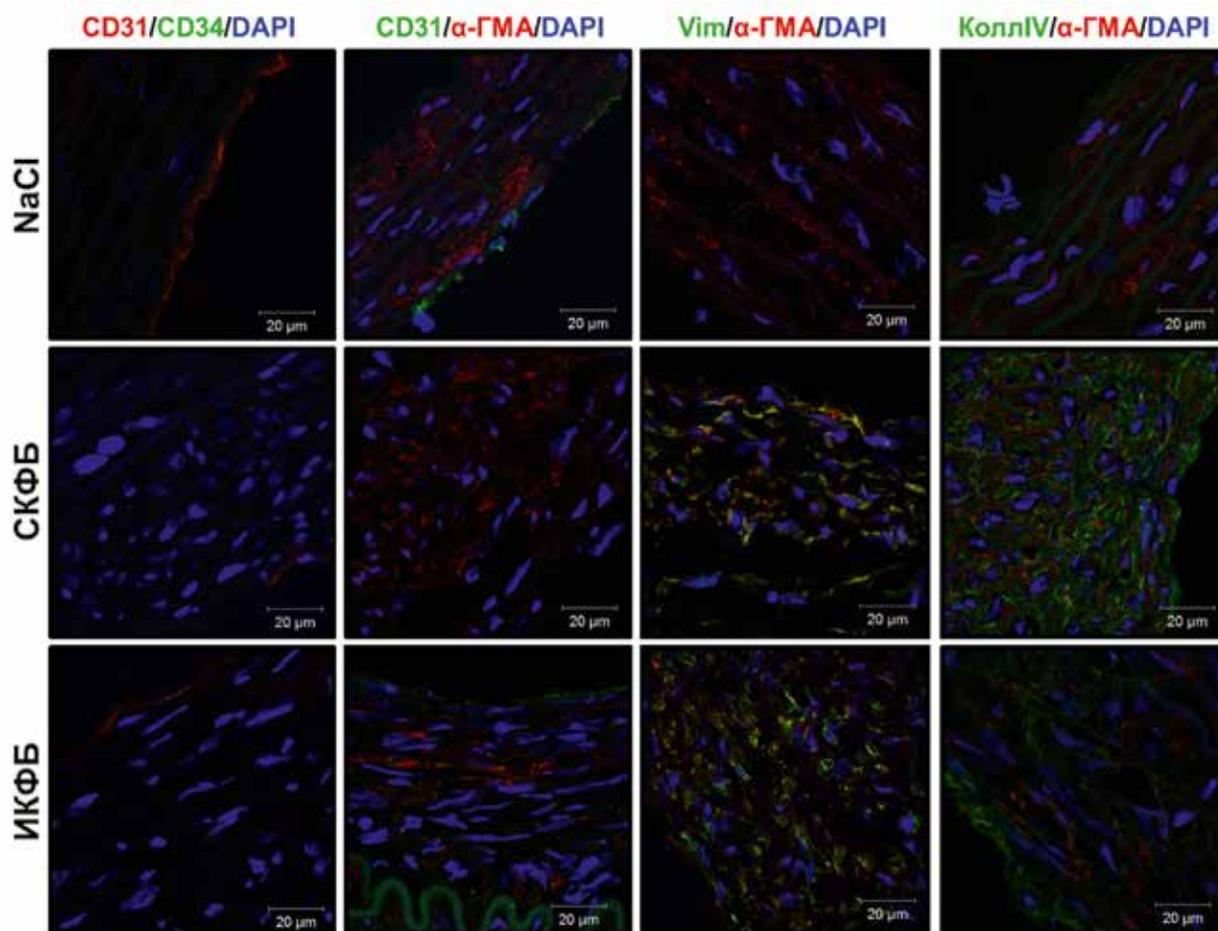
бластов мигрировавших из адвентиции. При сочетанном окрашивании на маркер экстрацеллюлярного матрикса (коллаген IV типа и  $\alpha$ -ГМА) обнаружено в неоинтимае большое количество коллагена IV типа, локализованного в экстрацеллюлярном матриксе вокруг клеток мезенхимального ряда (гладкомышечных клеток и фибробластов), что свидетельствует об их синтетической активности (рис. 4).

Измерение уровня провоспалительных молекул моноцитарного хемоаттрактанта/хемотаксического белка-1 (monocyte chemoattractant protein 1, monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1/CCL2) и церулоплазмينا в сыворотке крови прооперированных крыс методом иммуноферментного анализа выявило отсутствие повышения их концентрации при внутривенном введении СКФБ и ИКФБ, что показывает отсутствие индукции КФБ системного воспалительного ответа (рис. 5).

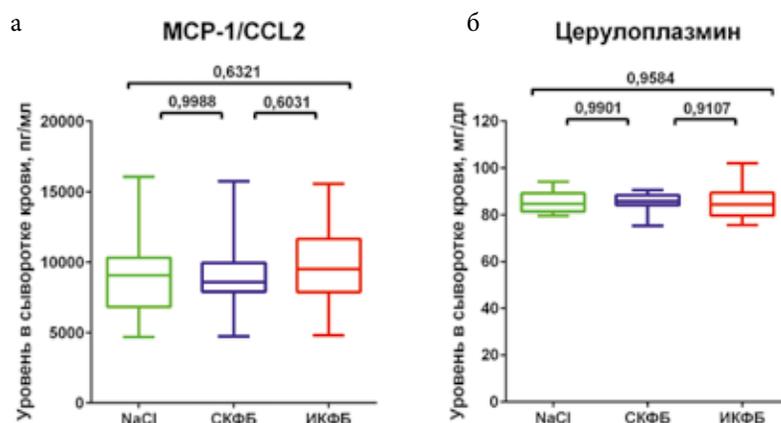
Целостность и функциональная активность эндотелия играют ключевую роль в его устойчивости к атерогенезу [11]. Повреждение эндотелия инициируется при сочетании турбулентного кровотока и различных факторов сердечно-сосудистого риска (артериальной гипертензии, дислипидемии, гипергликемии и системного воспаления); происходит инфильтрация интимы моноцитами, впоследствии дифференцирующимися в



Рис. 3. Брюшная аорта крыс после проведения баллонной ангиопластики в контроле и при введении сферических кальций-фосфатных бионов или игольчатых кальций-фосфатных бионов. а) окрашивание по Вейгерту-ван-Гизону и б) окрашивание по Расселлу-Мовату (увеличение  $\times 50$ , вставки в левом нижнем углу –  $\times 200$ ).



**Рис. 4.** Иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов брюшной аорты крыс после баллонной ангиопластики и однократного внутривенного введения 0,9% раствора NaCl, сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) или игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ). CD31 – маркер зрелых эндотелиальных клеток, CD34 – маркер эндотелиальных прогениторных клеток, α-гладкомышечный актин (α-ГМА) – маркер гладкомышечных клеток, Vim (виментин) – маркер фибробластов, коллаген IV типа – маркер экстрацеллюлярного матрикса, DAPI – ядерный краситель 4,6-диамидино-2-фенилиндол.



**Рис. 5.** Уровни провоспалительных цитокинов А) моноцитарного хемоаттрактантного/хемотаксического белка-1 (MCP-1/CCL2) и Б) церулоплазмина в сыворотке крови крыс при внутривенном введении сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) или игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ).

макрофаги, которые поглощают окисленные липопротеины низкой плотности, образуя пенистые клетки [11]. В дальнейшем происходит деградация базальной мембраны вследствие действия матриксдеградирующих ферментов; поврежденные эндотелий и макрофаги синтезируют множество хемокинов и факторов роста, которые индуцируют миграцию гладкомышечных клеток из меди и фибробластов из адвентиции в интиму с их дальнейшей пролиферацией и постепенным переходом на синтетический фенотип, сопровождающийся активным синтезом белков экстрацеллюлярного матрикса, что в конечном счете приводит к образованию неоинтимы [11]. Наибольший объем неоинтимы составляют белки экстрацеллюлярного матрикса [11].

Поскольку КФБ рассматриваются в качестве потенциального триггера развития атеросклероза [11], в данной работе было изучено влияние формы искусственно синтезированных КФБ на токсичность для эндотелия после предварительного повреждения брюшной аорты баллоном во время ангиопластики. Такое повреждение аорты в сочетании с внутривенным введением СКФБ и ИКФБ приводило к высокой частоте и выраженности формирования неоинтимы, в которой было выявлено большое количество гладкомышечных клеток, фибробластов и локализованного вокруг них коллагена IV типа, указывающего на активный синтетический фенотип этих клеток. Это свидетельствует о характерных для атерогенеза процессах, которые были вызваны экспозицией КФБ, при этом существенных различий в частоте и выраженности формирования неоинтимы, а также в ее гистоморфологических характеристиках при воздействии СКФБ и ИКФБ выявлено не было.

В ряде работ была показана роль эндотелиальных прогениторных клеток в регенерации функционально активного эндотелия после повреждения [21, 22]. Данная популяция клеток циркулирует в крови и способна прикрепляться к поврежденным участкам эндотелия и дифференцироваться в зрелые эндотелиальные клетки [21, 22]. В то же время, по наблюдениям других авторов, процесс восстановления поврежденного эндотелия осуществляется посредством миграции и пролиферации зрелых эндотелиальных клеток с соседних участков здорового эндотелия [23, 24]. В нашем исследовании было показано, что процесс реэндотелизации брюшной аорты происходит именно по этому механизму, поскольку методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии при эндотелизации неоинтимы был выявлен монослой зрелых (CD31<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>) эндотелиальных клеток при полном отсутствии эндотелиальных прогениторных (CD31<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>) клеток или эндотелиальных клеток с переходным фенотипом (CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>).

Известно, что циркулирующие в периферической крови молекулы системного воспаления также способствуют нарушению эндотелиального гомеостаза и развитию дисфункции эндотелия [25]. При внутривенном введении как СКФБ, так и ИКФБ не было выявлено повышения концентраций молекул системного воспаления MCP-1/CCL2 и церулоплазмينا в сыворотке крови прооперированных крыс, что свидетельствует о прямом эндотелиотоксическом действии исследованных типов бионосов.

Таким образом, внутривенное введение КФБ после повреждения интимы брюшной аорты крыс вызывает развитие гипертрофии интимы, частота и выраженность которой не зависит от формы КФБ и которая характеризуется переходом фенотипа клеток мезенхимального ряда (гладкомышечных клеток и фибробластов) с контрактильного/неактивного на активный синтетический фенотип. При этом эндотелиотоксическое действие КФБ обусловлено их непосредственным воздействием на эндотелий, а не развитием системного воспаления.

### Литература/References

1. 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.
2. 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.
3. Danesh J., Whincup P., Walker M., Lennon L., Thomson A., Appleby P. et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ.* 2000; 321(7255): 199-204. doi: 10.1136/bmj.321.7255.199.
4. 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.
5. El-Abbadi M.M., Pai A.S., Leaf E.M., Yang H.Y., Bartley B.A., Quan K.K. et al. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney. Int.* 2009; 75(12): 1297-307. doi: 10.1038/ki.2009.83.
6. Sonou T., Ohya M., Yashiro M., Masumoto A., Nakashima Y., Ito T. et al. Mineral Composition of Phosphate-Induced Calcification in a Rat Aortic Tissue Culture Model. *J. Atheroscler. Thromb.* 2015; 22(11): 1197-206. doi: 10.5551/jat.28647.
7. Heiss A., DuChesne A., Denecke B., Grötzinger J., Yamamoto K., Renné T. et al. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(15): 13333-41. doi: 10.1074/jbc.M210868200.
8. Heiss A., Pipich V., Jahnhen-Dechent W., Schwahn D. Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new

- insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition. *Biophys. J.* 2010; 99(12): 3986-95. doi: 10.1016/j.bpj.2010.10.030.
9. 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.
  10. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov 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.
  11. Gimbrone M.A. Jr., García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016; 118(4): 620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
  12. Pruijm M., Lu Y., Megdiche F., Piskunowicz M., Milani B., Stuber M. et al. Serum calcification propensity is associated with renal tissue oxygenation and resistive index in patients with arterial hypertension or chronic kidney disease. *J. Hypertens.* 2017; 35(10): 2044-52. doi: 10.1097/HJH.0000000000001406.
  13. Smith E.R., Ford M.L., Tomlinson L.A., Bodenham E., McMahon L.P., Farese S. et al. Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014; 25(2): 339-48. doi: 10.1681/ASN.2013060635.
  14. Pasch A., Block G.A., Bachtler M., Smith E.R., Jahnhen-Dechent W., Arampatzis S. et al. Blood Calcification Propensity, Cardiovascular Events, and Survival in Patients Receiving Hemodialysis in the EVOLVE Trial. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2017; 12(2): 315-22. doi: 10.2215/CJN.04720416.
  15. Keyzer C.A., de Borst M.H., van den Berg E., Jahnhen-Dechent W., Arampatzis S., Farese S. et al. Calcification Propensity and Survival among Renal Transplant Recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 27(1): 239-48. doi: 10.1681/ASN.2014070670.
  16. Dahle D.O., Åsberg A., Hartmann A., Holdaas H., Bachtler M., Jenssen T.G. et al. Serum Calcification Propensity Is a Strong and Independent Determinant of Cardiac and All-Cause Mortality in Kidney Transplant Recipients. *Am. J. Transplant.* 2016; 16(1): 204-12. doi: 10.1111/ajt.13443.
  17. 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/sml.201202270.
  18. Zhao X., Ng S., Heng B.C., Guo J., Ma L., Tan T.T. et al. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent. *Arch. Toxicol.* 2013; 87(6): 1037-52. doi: 10.1007/s00204-012-0827-1.
  19. Zhang B., Sai Lung P., Zhao S., Chu Z., Chrzanowski W., Li Q. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 7315. doi: 10.1038/s41598-017-07588-9.
  20. Lebre F., Sridharan R., Sawkins M.J., Kelly D.J., O'Brien F.J., Lavelle E.C. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 2922. doi: 10.1038/s41598-017-03086-0.
  21. Hristov M., Erl W., Linder S., Weber P.C. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.* 2004; 104(9): 2761-6. doi: 10.1182/blood-2003-10-3614.
  22. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005; 111(22): 2981-7. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.504340.
  23. Hagensen M.K., Shim J., Falk E., Bentzon J.F. Flanking recipient vasculature, not circulating progenitor cells, contributes to endothelium and smooth muscle in murine allograft vasculopathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31: 808-13. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.221184.
  24. Hagensen M.K., Raarup M.K., Mortensen M.B., Thim T., Nvengaard J.R., Falk E. et al. Circulating endothelial progenitor cells do not contribute to regeneration of endothelium after murine arterial injury. *Cardiovasc. Res.* 2012; 93(2): 211-2. doi: 10.1093/cvr/cvr342.
  25. Ramji D.P., Davies T.S. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26(6): 673-85. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003.

#### Сведения об авторах:

**Кутихин Антон Геннадьевич**, зав. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза НИИ КПССЗ, e-mail: antonkutikhin@gmail.com;

**Шишкова Дарья Кирилловна**, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза 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;

**Миронов Андрей Владимирович**, мл. науч. сотр. лаб. клеточных технологий отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: a.mir.80@mail.ru;

**Кривкина Евгения Олеговна**, мл. науч. сотр. лаб. клеточных технологий отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: leonora92@mail.ru;

**Барбараш Ольга Леопольдовна**, доктор мед. наук, проф., чл.-кор. РАН, директор НИИ КПССЗ, e-mail: barbol@kemcardio.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.24-006.6:615.277.3]-092.9

**Филимонова М.В., Южаков В.В., Филимонов А.С., Макаrchук В.М.,  
Бандурко Л.Н., Корнеева Т.С., Самсонова А.С., Цыганова М.Г.,  
Шевченко Л.И., Севаньякаева Л.Е., Фомина Н.К., Ингель И.Э., Яковлева Н.Д.**

## Сравнительное исследование влияния ингибитора NOS T1023 и бевацизумаба на рост и морфологию карциномы легких Льюис

Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, 249036, Калужская область, г. Обнинск, Россия, ул. Королева, д. 4

**Цель исследования** – изучение механизмов противоопухолевой активности ингибитора NOS T1023 и оценка перспективности его дальнейшей разработки.

**Методика.** В качестве опухолевой модели использована эпидермоидная КЛЛ, штамм которой получен из банка опухолевых материалов ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина и поддерживался на самцах мышей  $C_{57}BL_{6j}$ . КЛЛ трансплантировали самцам мышей  $F_1$  ( $CBA \times C_{57}BL_{6j}$ ) путем подкожного введения  $1,5 \times 10^6$  клеток карциномы в 0,1 мл суспензии на основе среды 199 в область латеральной поверхности правого бедра. Для сравнительной оценки противоопухолевой эффективности использовали ингибитор NOS под шифром T1023, синтезированный в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба, и VEGF-ингибитор бевацизумаб (БВ3). Животным первой опытной группы ежедневно, со 2 по 20 сутки вводили соединение T1023 (60 мг/кг, в/б); второй опытной группы – трижды, на 2, 5 и 10 сут вводили БВ3 (12 мг/кг, в/б); третьей опытной группы – по этим схемам и в таких же дозах вводили и T1023, и БВ3 (при комбинированном применении T1023 вводили через 4 ч после введения БВ3). Контрольным животным в качестве плацебо со 2 по 20 сутки вводили 0,9% раствор натрия хлорида (0,2 мл, в/б). Противоопухолевые эффекты оценивали, сравнивая размеры опухолевых узлов, длительность задержки роста и индекс торможения роста опухоли у контрольных и опытных животных. Гистологические методы исследования включали иммуноокрашивание на PCNA, CD31, пимонидазол и морфометрический анализ микроскопических изображений.

**Результаты** сравнительных исследований показали, что соединение T1023 и VEGF-ингибитор бевацизумаб (БВ3) оказывают однонаправленное влияние на карциному легких Льюис (КЛЛ), сопровождающееся торможением роста и подавлением метастазирования неоплазии. Воздействие и T1023, и БВ3 вызывало снижение содержания сосудов в перитуморальных зонах и в «горячих точках» ангиогенеза, усиливало гипоксию паренхимы КЛЛ и стимулировало апоптоз опухолевых клеток. При комбинированном применении T1023 и БВ3 их антинеопластическая эффективность в отношении ингибирования ангиогенеза и девитализации опухолевых клеток соответствовала аддитивному действию.

**Заключение.** Результаты позволяют предполагать, что основой противоопухолевой активности T1023 является антиангиогенное действие и свидетельствуют о перспективности применения ингибиторов NOS в ангиостатической терапии солидных злокачественных новообразований в сочетании с имеющимися антинеоваскулярными средствами.

**Ключевые слова:** производные изотиомочевин; ингибиторы NOS; антиангиогенное действие; противоопухолевое действие.

**Для цитирования:** Филимонова М.В., Южаков В.В., Филимонов А.С., Макаrchук В.М., Бандурко Л.Н., Корнеева Т.С., Самсонова А.С., Цыганова М.Г., Шевченко Л.И., Севаньякаева Л.Е., Фомина Н.К., Ингель И.Э., Яковлева Н.Д. Сравнительное исследование влияния ингибитора NOS T1023 и бевацизумаба на рост и морфологию карциномы легких Льюис. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 89-98.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.89-98

**Для корреспонденции:** Филимонова Марина Владимировна, доктор биол. наук, зав. лаб. радиационной фармакологии, e-mail: mari\_fil@mail.ru

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

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

**Поступила** 14.03.2018

Filimonova M.V., Yuzhakov V.V., Filimonov A.S., Makarchuk V.M., Bandurko L.N., Korneeva T.S., Samsonova A.S., Tsyganova M.G., Shevchenko L.I., Sevankaeva L.E., Fomina N.K., Ingel I.E., Yakovleva N.D.

## COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTS OF NOS INHIBITOR T1023 AND BEVACIZUMABUM ON GROWTH AND MORPHOLOGY OF LEWIS LUNG CARCINOMA

A.Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of Russia; 4, Korolev st., Obninsk, Kaluga region, 249036, Russia

**The aim.** Study of mechanisms of NOS inhibitor T1023 antitumor activity and estimation of its prospects for further development.

**Methods.** Epidermoid Lewis lung carcinoma (LLC) from N.N. Blokhin NMRCO bank of tumor materials was used as a tumor model. Maintenance of tumor cell culture was provided by intramuscular injection of tumor cells suspension to C57BL6j mice every 14 days. Then LLC cells were transplanted to male F1 mice (CBA`C57BL6j) by subcutaneous injection of  $1,5 \times 10^6$  cells in 0,1 ml of 199 medium into the lateral surface of the right hip. Comparative studies of antitumor efficacy were carried out using NOS inhibitor T1023, synthesized in the laboratory of radiation pharmacology of A.F. Tsyb MRRC, and VEGF inhibitor Bevacizumab (BVZ). Mice from the first experimental group were injected intraperitoneally (ip) with compound T1023 at dose 60 mg / kg from day 2 to 20; animals from the second experimental group were treated with BVZ at dose 12 mg / kg ip at days 2, 5 and 10; the third experimental group received T1023 in combination with BVZ according to these schemes and at the same doses (T1023 was administered 4 hours after administration of BVZ). Mice from the control group received 0,9% sodium chloride solution (0,2 ml, ip) as a placebo daily from 2 to 20 days. Antitumor effects were assessed by comparing the tumor size, duration of tumor growth delay and the index of tumor growth inhibition in control and experimental groups. Histological examination methods included immunostaining on PCNA, CD31, pimonidazole and morphometric analysis of microscopic images. **Results.** Comparative studies have shown that compound T1023 and VEGF inhibitor Bevacizumab (BVZ) have unidirectional effects on Lewis lung carcinoma (LLC), accompanied by growth inhibition and suppression of metastasis of neoplasia. The effect of both T1023 and BVZ caused a decrease in vascular content in the peritumoral zones and in the "hot spots" of angiogenesis, increased the hypoxia in the LLC parenchyma, and stimulated apoptosis of tumor cells. The combined use of T1023 and BVZ, caused the antineoplastic efficacy against inhibition of angiogenesis and devitalization of tumor cells which was estimated as additive effect. **Conclusion.** The results suggest that the basis of antitumor activity of T1023 is the anti-angiogenic effect and indicate the prospects of using NOS inhibitors in the angiostatic therapy of solid malignant neoplasms in combination with available anti-neovascular agents.

**Keywords:** isothiourea derivatives; inhibitors of NOS; antiangiogenic action; antitumor activity.

**For citation:** Filimonova M.V., Yuzhakov V.V., Filimonov A.S., Makarchuk V.M., Bandurko L.N., Korneeva T.S., Samsonova A.S., Tsyganova M.G., Shevchenko L.I., Sevankaeva L.E., Fomina N.K., Ingel I.E., Yakovleva N.D. Comparative study of the effects of inhibitor NOS T1023 and bevacizumabum on growth and morphology of Lewis lung carcinoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 89-98. (in Russian)

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 89-98

**For correspondence:** Marina V. Filimonova, Doctor of Biological Science, Head of Laboratory of Radiation Pharmacology of A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of Russia; 4, Korolev st., Obninsk, Kaluga region, 249036, Russian Federation, e-mail: mari\_fil@mail.ru

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

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

### Information about authors:

Filimonova M. V., <https://orcid.org/0000-0002-9690-4746>

Filimonov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-4398-1764>

Makarchuk V.M., <https://orcid.org/0000-0001-6066-1415>

Korneeva T.S., <https://orcid.org/0000-0001-6398-7947>

Samsonova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-7703-0393>

**Received** 14.03.2018

## Введение

По современным представлениям, в регуляции неопластической васкуляризации способны принимать участие многие проангиогенные факторы (VEGF, FGF-2, PIGF, PDGF, IL-8, TGF $\beta$ , Angs и др.) и эндогенные ингибиторы ангиогенеза (TSP-1, ангиостатин, эндостатин и др.), которые выделяются опухолевыми или стромальными клетками, или мобилизуются из

внеклеточного матрикса [1, 2]. Такая организация опухолевого ангиогенеза предоставляет значительное число мишеней для терапии, но, в то же время, множественность ангиогенных путей расширяет возможности адаптации неоплазий к ангиостатическим воздействиям [3, 4]. Развитие резистентности опухолей наблюдается не только к селективным антиангио-

генным препаратам. Блокирующие сразу несколько ангиогенных рецепторов ингибиторы тирозинкиназы также далеко не всегда позволяют достичь значимой старваии опухоли и длительной ремиссии [5, 6].

В таких условиях перспективным может быть применение ангиостатических средств, направленных на общие участки проангиогенных путей различных факторов. Авторы исследований опухолевого ангиогенеза среди множества модуляторов особую роль отводят эндогенному оксиду азота [7-9]. Действие большинства опухолевых проангиогенных факторов вызывает повышение активности NOS/cGMP-пути в клетках эндотелия, вследствие стимуляции экспрессии и каталитической активности eNOS, что инициирует нисходящий каскад процессов, ведущих к снижению тонуса и росту проницаемости сосудов, стимуляции пролиферации и миграции клеток эндотелия, обеспечивающих формирование новой сосудистой сети. В этой связи неспецифическое антинеоваскулярное действие, по нашему мнению, можно достичь при подавлении эндогенного синтеза NO ингибиторами NOS.

В лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба в последние годы получен ряд оригинальных N,S-замещённых изотиомочевин (ИТМ), являющихся конкурентными ингибиторами NOS, среди которых выделяется производное T1023 (гидробромид 1-изобутаноил-2-изопропил-ИТМ), обладающее селективностью к eNOS и iNOS (ИК<sub>50</sub> nNOS/iNOS/eNOS – 47,5/3,2/5,1 мкмоль)<sup>1</sup>. В первом исследовании противоопухолевой активности этого соединения нами было показано, что T1023 при субхроническом введении в дозе 60 мг/кг (~1/4 ЛД<sub>10</sub>) вызывает значительное (на 45–75%) торможение роста и подавление (на 45–80%) процессов метастазирования карциномы лёгких Льюис (КЛЛ), сопровождающееся 3-кратным повышением индекса апоптоза опухолевых клеток [10]. В данной работе, которая выполнена в рамках тем государственного задания МРНЦ им. А.Ф. Цыба за 2015-2017 гг. [11], с целью изучения механизмов противоопухолевой активности соединения T1023 и оценки перспективности его дальнейшей разработки проведено сравнительное исследование влияния на рост, метастазирование и функциональную морфологию КЛЛ этого ингибитора NOS и VEGF-ингибитора бевацизумаба (БВЗ).

<sup>1</sup>Проскуряков С.Я., Верховский Ю.Г., Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Мандругин А.А., Трофимова Т.П. и др. Антигипотензивное средство. Патент на изобретение RUS 2353614. 06.11.2007. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Макачук В.М., Шевчук А.С., Южаков В.В., Цыб А.Ф. Противоопухолевое средство. Патент на изобретение RUS 2503450. 19.04.2012.

## Методика

*Лабораторные животные.* Исследования проведены на самцах мышей-гибридов F<sub>1</sub> (СВА'С<sub>57</sub>BL<sub>6j</sub>) в возрасте 1,5-2 мес с массой тела 19-22 г, полученных из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Содержались животные в виварии МРНЦ им. А.Ф. Цыба в соответствии с требованиями ГОСТ 33044-2014: в клетках Т-3, в условиях естественного освещения с принудительной 10-кратной вентиляцией, при температуре 18-20 °С и относительной влажности воздуха 40-70%, на подстилке из простерилизованных древесных стружек, со свободным доступом к питьевой воде и брикетированному корму ПК-120-1 (ООО Лабораторснаб, РФ). Все работы с животными были выполнены по стандартным операционным процедурам, принятым в МРНЦ им. А.Ф. Цыба, которые соответствуют правилам Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных целей.

*Опухолевая модель.* Использована эпидермоидная КЛЛ, штамм которой получен из банка опухолевых материалов ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина и поддерживался на самцах мышей С<sub>57</sub>BL<sub>6j</sub>. Трансплантировали КЛЛ самцам мышей F<sub>1</sub> (СВА'С<sub>57</sub>BL<sub>6j</sub>) путем подкожного введения 1,5×10<sup>6</sup> клеток карциномы в 0,1 мл суспензии на основе среды 199 (ООО Пан-Эко, РФ) в область латеральной поверхности правого бедра.

*Соединения.* T1023 – водорастворимое, умеренно токсичное соединение (ЛД<sub>10</sub> и ЛД<sub>50</sub> – 260 и 410 мг/кг), синтезированное в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ; в работе использовали в виде 0,6% раствора, изготовленного на основе 0,9% раствора натрия хлорида (ОАО Дальхимфарм, РФ). БВЗ – антиангиогенное средство на основе моноклональных антител к VEGF; в работе использовали в виде 0,12% раствора, изготовленного на основе 0,9% раствора натрия хлорида из фармакопейного концентрата (авастин; Hoffmann–La Roche, Швейцария).

*Экспериментальные группы, схемы воздействий.* На 2-е сут после перевивки КЛЛ 88 мышей-опухоленосителей были распределены в 4 группы – контрольную и три опытные, по 22 особи в каждой. Животным первой опытной группы ежедневно, со 2 по 20 сут вводили соединение T1023 (60 мг/кг, в/б); второй опытной группы – трижды, на 2, 5 и 10 сут вводили БВЗ (12 мг/кг, в/б); третьей опытной группы – по этим схемам и в таких же дозах вводили и T1023, и БВЗ (при комбинированном применении T1023 вводили через 4 ч после введения БВЗ). Контрольным животным со 2 по 20 сутки вводили 0,9% раствор натрия хлорида (0,2 мл, в/б).

*Оценка противоопухолевых эффектов.* С 7-х сут после перевивки КЛЛ у всех животных каждые 3-4 сут из-

меряли калипером максимальный ( $L$ ) и минимальный ( $W$ ) диаметры опухолей и рассчитывали их объемы в приближении  $V=(L \times W^2) \times (\pi/6)$ . Влияние на рост КЛЛ оценивали по межгрупповым различиям объемов узлов, длительности задержки роста и индексу торможения роста опухоли (ТРО) [12]. На 21-е сут животных выводили из опыта путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом (ОАО Медхимпром, РФ; 10 об. %), извлекали легкие, фиксировали их 24 ч в жидкости Буэна и под микроскопом CX21 (Olympus Corp., Япония) проводили подсчет числа лёгочных метастазов. Влияние на метастазирование оценивали по межгрупповым различиям числа метастазов и индексу ингибирования метастазирования (ИИМ) [12].

*Гистологические методы исследования* включали окрашивание срезов гематоксилином и эозином (рис. 1, А), иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание: на PCNA (рис. 1, Б), CD31 (рис. 1, В) и пимонидазол (рис. 1, Г), определение митотической активности и апоптотической гибели опухолевых клеток, а также компьютерный анализ микроскопических изображений.

Для изучения морфологии КЛЛ по 7 мышей из каждой группы выводили из опыта на 11-е сут после перевивки в экспоненциальной стадии роста опухолей. Опухолевые узлы выделяли под тиопенталовым наркозом (ОАО Синтез, РФ; 60 мг/кг, в/б). Ткань опухоли фиксировали 24 ч в кислой жидкости Буэна, обезжировали и заливали в «Гистомикс». ИГХ исследования на серийных срезах проводили методом биотин-стрептавидин-пероксидазного комплекса с использованием моноклональных мышиных антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток — PCNA (PC10, Dako, 1:400) и поликлональных кроличьих антител к маркеру эндотелия — PECAM-1 (CD31, M-20-R, Santa Cruz, 1:20) согласно ранее описанным нами методам [10].

Для выявления гипоксических клеток в опухолевой ткани использовали набор Нурухупробе-1 Omni Kit (Нурухупробе, Inc.; США), включающий гидрохлорид пимонидазола и кроличьи антитела PAb2627AP к белковым аддуктам пимонидазола. На 11 сутки роста КЛЛ всем особям из контрольной и опытных групп за 30 мин до эвтаназии пимонидазол вводили внутрибрюшинно из расчета 60 мг/кг массы тела. Иммуноокрашивание пимонидазола выполнено с помощью биотинилированных козьих антител к кроличьим IgG (Sigma, 1:800) и экстравидин-пероксидазного комплекса (Sigma, 1:250). До нанесения антител к пимонидазолу депарафинированные срезы, погруженные в восстанавливающий раствор (Dako, S1699), прогревали в микроволновой печи (15 мин, 180 Вт). В растворе первых антител препараты инкубировали в течение 90 мин при

комнатной температуре. На всех этапах ИГХ в промыточный буфер добавляли 0,2% Brij 35.

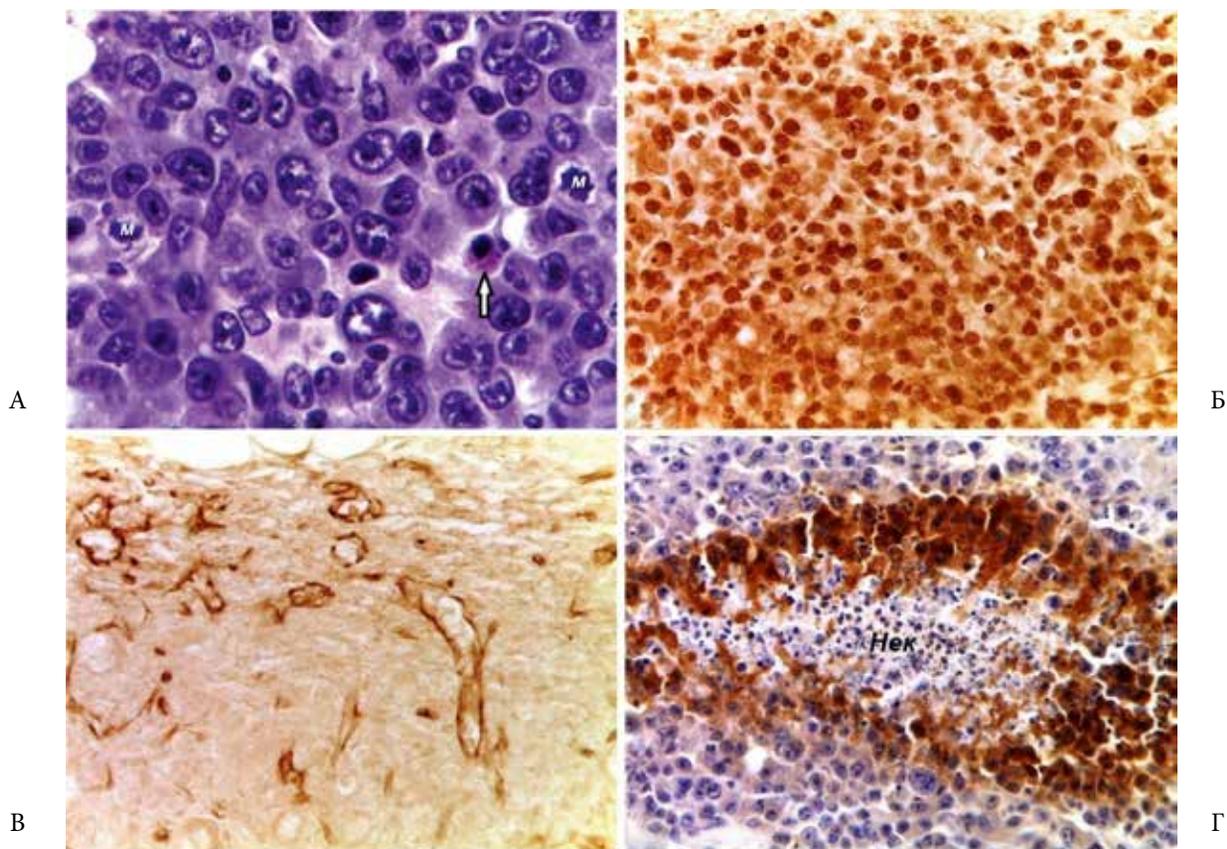
Субстратную пероксидазу выявляли с использованием диаминобензидина (Liquid DAB+, Dako). При необходимости ядра клеток докрашивали гематоксилином.

Гистологические препараты изучали в микроскопе Leica DM 1000 с микрофото съемкой на цифровую камеру Leica ICC50 HD. Интегральные показатели, включающие объемное содержание паренхимы с реакцией ядер опухолевых клеток на PCNA, гипоксических клеток в паренхиме и зон некроза, а также количественные характеристики сосудов рассчитывали с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений с применением программы AnalySIS 5.0 (Soft Imaging System GmbH, Германия). Ангиоархитектуру КЛЛ при иммуноокрашивании на CD31 оценивали согласно принципам, описанным в работах [13, 14], в перитуморальной области и в «горячих точках» (“hot spots”), представляющих зоны солидного строения паренхимы опухоли, содержащие наибольшее количество капилляров и мелких венул. Перитуморальная область включала периферический край опухолей и окружающую их соединительную ткань. Количественную плотность опухолевых клеток по числу сечений их ядер на 1 мм<sup>2</sup> площади среза (клеточность), митотический индекс и индекс апоптоза в зонах роста опухолевых узлов определяли по стандартной методике при иммерсионном увеличении микроскопа при подсчете не менее 3000 ядер клеток [15].

*Статистическая обработка.* Значимость межгрупповых различий оценивали путем рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с применением критерия множественного сравнения Даннета и Данна.

## Результаты и обсуждение

Анализ динамики роста КЛЛ показал, что при всех вариантах воздействия Т1023 и БВ3 отмечалось сходное влияние на развитие карциномы, проявлявшееся статистически значимым в течение всего срока наблюдения противоопухолевым эффектом (табл. 1). При раздельном воздействии Т1023 и БВ3 наблюдалась начальная задержка роста опухолевых узлов на 2-2,3 сут, и в дальнейшем торможение роста КЛЛ сохранялось на стабильном уровне: индекс ТРО находился в пределах 45-60% для БВ3, и в пределах 50-65% для Т1023. Хотя между опытными группами статистически значимых различий в динамике роста КЛЛ не наблюдалось, у мышей с комбинированным применением Т1023 и БВ3 в исследованном периоде отмечалась устойчивая тенденция ( $p = 0,07-0,11$ ) к усилению противоопухолевого эффекта.



**Рис. 1.** Гистология карциномы легких Льюис в контроле на 11 сутки после трансплантации. А – окрашивание гематоксилином и эозином, м – митозы, стрелкой показан апоптоз опухолевой клетки; Б — иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; В - иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в зоне роста опухоли; Г – иммуногистохимическая реакция гипоксических опухолевых клеток с антителами к аддуктам пимонидазола, Нек – некроз опухоли. Увеличение:  $\times 625$  (А);  $\times 250$  (Б—Г).

Таблица 1

**Влияние соединения T1023 и бевацизумаба на динамику роста КЛЛ**

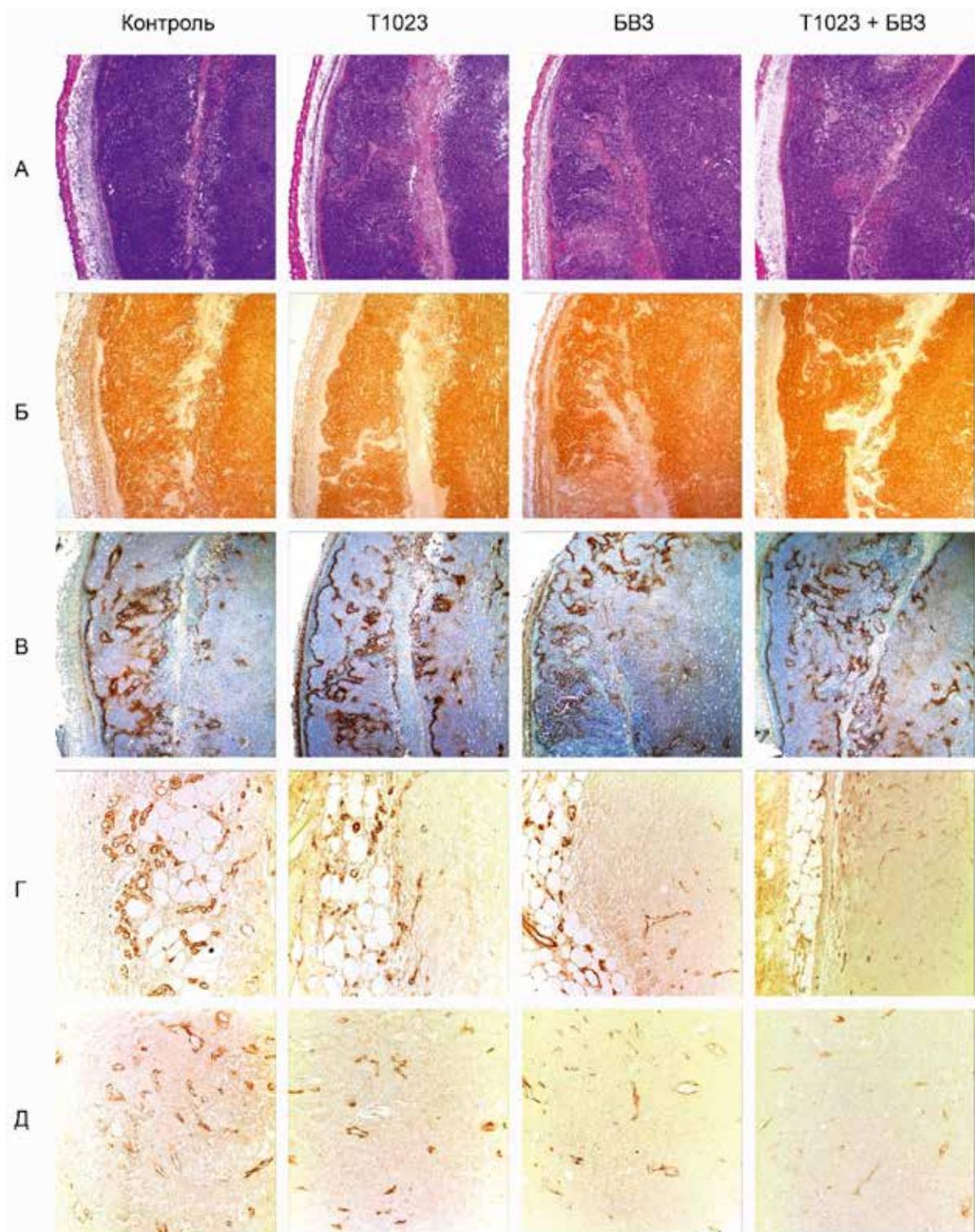
Время, сутки	Средний объем опухоли (V), см <sup>3</sup> (M±SD); Индекс ТРО, %						
	Контроль V	T1023		БВ3		T1023 + БВ3	
		V	ТРО	V	ТРО	V	ТРО
7	0,14±0,05	0,06±0,03 <sup>1</sup>	57	0,07±0,03 <sup>1</sup>	52	0,05±0,02 <sup>1</sup>	64
10	0,41±0,13	0,18±0,09 <sup>1</sup>	64	0,20±0,10 <sup>1</sup>	58	0,13±0,08 <sup>1</sup>	74
14	1,46±0,34	0,63±0,27 <sup>1</sup>	57	0,72±0,26 <sup>1</sup>	51	0,46±0,23 <sup>1</sup>	68
17	2,53±0,49	1,12±0,37 <sup>1</sup>	56	1,29±0,41 <sup>1</sup>	49	0,94±0,30 <sup>1</sup>	63
21	4,63±0,71	2,29±0,58 <sup>1</sup>	51	2,53±0,64 <sup>1</sup>	45	1,92±0,61 <sup>1</sup>	59

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: <sup>1</sup> – статистически значимое различие ( $p < 0,05$ ) по критерию Даннета с контрольной группой (в группах  $n = 15$ ).

Таблица 2

**Влияние соединения T1023 и бевацизумаба на метастазирование КЛЛ**

Показатель	Среднее число метастазов на 21 сутки (M±SD); ИИМ, %			
	Контроль	T1023	БВ3	T1023 + БВ3
Крупные метастазы	0,9±0,6	0,8±0,5	0,5±0,4	0,4±0,3
Малые метастазы	24,8±4,7	12,8±4,3 <sup>1</sup>	10,3±4,2 <sup>1</sup>	8,9±3,6 <sup>1</sup>
Все метастазы	25,8±5,0	13,6±4,5 <sup>1</sup>	10,8±4,4 <sup>1</sup>	9,3±3,7 <sup>1</sup>
ИИМ	-	47	60	64



**Рис. 2.** Морфофункциональные характеристики карциномы лёгких Льюис на 11 сутки после перевивки в контроле, при раздельном и комбинированном воздействии соединения Т1023 и бевацизумаба. А—Г – серийные срезы; А – окрашивание гематоксилином и эозином (x8); Б — иммуноокрашивание на PCNA (x8); В — иммуноокрашивание на пимонидазол, ядра клеток докрашены гематоксилином (x8); Г, Д — иммуноокрашивание на CD31 в перитуморальной зоне (Г) и «горячих точках» паренхимы (Д) (x64).

В этом случае начальная задержка роста опухолевых узлов увеличилась до 3,2 сут, и в дальнейшем индекс ТРО находился на уровне 60—75%.

Аналогичная картина наблюдалась и по антиметастатическому действию — при всех вариантах воздействия число легочных метастазов на 21 сут роста КЛЛ снижалось статистически достоверно в 1,9-2,4 раза (табл. 2), и в группе, получавшей сочетанное воздействие, также присутствовала тенденция ( $p = 0,08$ ) к усилению эффекта.

По данным гистологических исследований, у контрольных мышей опухолевые узлы на 11-е сут роста имели солидный тип строения (рис. 1, А). В центральных и периферических отделах опухолей располагались узкие оксифильные поля спонтанного некроза, представленные клеточным детритом (рис. 2, А). В участках солидного строения паренхимы была представлена полями плотно упакованных опухолевых клеток. В полях зрения наблюдались относительно многочисленные фигуры митоза и единичные клетки, погибающие путем апоптоза. В периферических зонах роста опухолевые клетки вытянутой или неправильной формы были диссоциированы друг от друга. Зоны инвазии КЛЛ в здоровую ткань формировались отдельными клетками или их скоплениями в виде тяжей, между которыми располагались врастающие в паренхиму кровеносные сосуды.

Жизнеспособная паренхима КЛЛ с пролиферирующими опухолевыми клетками отчетливо контурировалась при ИГХ окрашивании на PCNA (рис. 1, Б; 2, Б). Клетки карциномы с интенсивной окраской ядер на этот циклин располагались, преимущественно, в локусах инвазивного роста и по периферии узлов, концентрируясь вокруг сосудов. Сосуды, врастающие в паренхиму КЛЛ, выстланы уплощенным эндотелием с реакцией их ядер на PCNA.

ИГХ окрашивание на пимонидазол носило зональный характер. Судя по интенсивности положительной реакции, опухолевые клетки в состоянии глубокой гипоксии ( $pO_2 < 10$  мм Hg) располагались преимущественно на границе с некрозом в виде узких перинекротических ободков шириной 20-50 мкм (рис. 1, Г; 2, В). Реакция на маркер гипоксии не определялась в области некроза и практически отсутствовала в участках высокой пролиферативной активности опухолевых клеток.

При иммуноокрашивании срезов на CD31 определялась характерная неоднородность распределения в КЛЛ кровеносных сосудов. Так, относительно васкуляризованы зоны паренхимы, прилегающие к подкожной клетчатке. В перитуморальной зоне микроциркуляторное русло было представлено многочисленными тонкостенными сосудами (рис. 1, В; 2, Г). От венул, расположенных в здоровых тканях, ответвлялись короткие капиллярные петли, врастающие в паренхиму опухоли. Сосуды, расположенные в толще солидной зоны паренхимы (рис. 2, Д), местами расширены, выстланы уплощенным или умеренно набухшим эндотелием.

Соединение Т1023 и БВ3 при их раздельном применении оказывали однонаправленное действие на КЛЛ, и к 11 суткам роста вызывало сходные изменения в паренхиме неоплазии. Наблюдалось статистически значимое снижение (в 1,4—1,6 раза) объема опухолей (табл. 3). На обзорных препаратах гистологический рисунок опухолевых узлов выглядел без существенных изменений. Однако обращало на себя внимание увеличение содержания в периферических участках опухолей, особенно со стороны подкожной клетчатки, разветвлённых прослоек некроза (рис. 2, А), окружённых ободками гипоксических клеток (рис. 2, В). Нередко в этих зонах визуально снижалась интен-

Таблица 3

## Морфометрические показатели тканей КЛЛ на 11-е сут роста в контроле и при воздействии соединения Т1023 и бевацизумаба (M±SD)

Показатель	Контроль	Т1023	БВ3	Т1023 + БВ3
Объем опухолей, см <sup>3</sup>	0,25±0,05	0,16±0,05 <sup>1</sup>	0,18±0,04 <sup>1</sup>	0,15±0,07 <sup>1</sup>
Объемное содержание зон некроза, %	18,0±3,9	19,2±8,6	14,1±6,0	19,8±7,2
Объемное содержание паренхимы (окраска на PCNA), %	68,1±7,4	65,9±6,9	67,2±4,9	64,0±9,2
Фракция гипоксических клеток в паренхиме, %	11,7±3,3	14,7±6,1	17,3±4,0 <sup>1</sup>	23,7±6,6 <sup>1,2,3</sup>
Количественная плотность опухолевых клеток, 10 <sup>3</sup> /мм <sup>2</sup>	5,89±0,12	5,68±0,20	6,05±0,25	5,42±0,33 <sup>1,3</sup>
Митотический индекс, %	1,66±0,25	1,70±0,08	1,46±0,07	1,59±0,26
Индекс апоптоза, %	0,44±0,08	0,76±0,10 <sup>1</sup>	0,78±0,20 <sup>1</sup>	0,93±0,08 <sup>1,2,3</sup>

**Примечание.** Здесь и в табл. 4: статистически достоверное различие ( $p < 0,05$ ) по критерию Данна: <sup>1</sup> — с контрольной группой; <sup>2</sup> — с группой, получавшей Т1023; <sup>3</sup> — с группой, получавшей БВ3 (в группах  $n = 7$ ).

сивность иммуноокрашивания паренхимы на PCNA (рис. 2, Б).

При микроскопическом исследовании наблюдалось усиление полиморфизма ангиоархитектоники КЛЛ, отёк и дистрофические изменения в паренхиме, которые сопровождались цитолитической деструкцией и усилением апоптотической гибели опухолевых клеток. Отмечалось сращивание эндотелия в крупных сосудах с плазматическим пропитыванием их стенок. Иногда выявлялись плазморрагия и микрокровоизлияния. На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, ядра эндотелия сосудов выглядели уплощёнными и гиперхромными, некоторые из них были пикнотичными. Появлялись морфологические признаки усиления гипоксии паренхимы опухолей с характерным уменьшением в этих зонах размеров опухолевых клеток и снижением интенсивности иммуноокрашивания их ядер на PCNA. Реже, чем в контроле, выявлялись и PCNA-положительные ядра эндотелиальных клеток. При окрашивании на CD31 визуально выявлялось снижение содержания сосудов в перитуморальной зоне (рис. 2, Г) и в зонах солидного строения паренхимы, где большая часть капилляров имела щелевидную форму (рис. 2, Д).

По данным морфометрии (табл. 3, 4), наиболее выраженное снижение содержания сосудов под влиянием T1023 и БВ3 наблюдалось в «горячих точках» опухолевой ткани (в 1,3-1,5 раза), что коррелировало с увеличением фракции гипоксических клеток в паренхиме (в 1,3-1,5 раза) и ростом гибели опухолевых клеток путем апоптоза (в 1,8 раза).

Сходство морфофункциональных изменений в КЛЛ, развивающихся при воздействии ингибитора NOS и VEGF-ингибитора, позволяет предполагать, что основой противоопухолевых эффектов соединения T1023 является антиангиогенное действие. Это согласуется с результатами ряда работ, в которых показано, что некоторые известные ингибиторы NOS (L-NMMA, L-NAME, аминоксантидин, кавтрин, 1400W) так-

же вызывают нарушения васкуляризации и торможение роста экспериментальных неоплазий [16-19].

Различие молекулярных мишеней, через которые T1023 и БВ3 реализуют свое действие, потенциально создает возможности для усиления ангиостатического влияния при их сочетанном применении. И, если по влиянию на рост и метастазирование КЛЛ такое взаимодействие T1023 и БВ3 оставалось в пределах статистической тенденции (табл. 1, 2), то при гистологических исследованиях оно проявилось более отчетливо. В опухолях животных, получавших комбинированное воздействие, к 11 сут роста развивались аналогичные морфологические изменения, как и при раздельном воздействии этих соединений, но с более выраженным снижением содержания кровеносных сосудов в опухолевых узлах, усилением гипоксии паренхимы и апоптотической девитализации клеток карциномы.

В некоторых опухолевых узлах отмечалось расширение зон центрального некроза, которые в отдельных местах захватывали значительную часть неопластической ткани. Периферические очаги некроза с локальными кровоизлияниями также выглядели более обширными и разветвленными (рис. 2, А). Визуально снижалась интенсивность иммуноокрашивания на PCNA (рис. 2, Б). Наряду с перинекротическими ободками гипоксических клеток в зонах солидного строения паренхимы появлялись многочисленные диффузные очаги с неравномерной интенсивностью окрашивания опухолевых клеток на маркер гипоксии (рис. 2, В). При окрашивании на CD31 отчетливо выявлялось снижение количества сосудов в перитуморальной зоне (рис. 2, Г) и капилляров в «горячих точках» паренхимы (рис. 2, Д). По данным морфометрии (табл. 3, 4), при комбинированном воздействии объемное содержание сосудов в перитуморальной зоне снизилось относительно контроля в 1,4 раза, а в «горячих точках» паренхимы – в 1,6 раза, что сопровождалось увеличением фракции гипоксических клеток и усилением апоптотической гибели опухолевых клеток в 2 раза. Эти количествен-

Таблица 4

Морфометрические показатели сосудистой сети КЛЛ на 11-е сут роста в контроле и при воздействии соединения T1023 и бевацизумаба (M±SD)

Показатель	Локализация	Контроль	T1023	БВ3	T1023 + БВ3
Объемное содержание сосудов, %	Перитумор. обл.	4,6±1,6	4,1±0,5	3,7±0,5	3,2±0,5 <sup>1</sup>
	Горячие точки	2,8±0,6	2,1±0,3 <sup>1</sup>	1,9±0,3 <sup>1</sup>	1,7±0,3 <sup>1</sup>
Количественная плотность сосудов, /мм <sup>2</sup>	Перитумор. обл.	105±14	111±17	96±21	93±13
	Горячие точки	170±54	125±9 <sup>1</sup>	139±49	114±25 <sup>1</sup>
Средняя площадь сечения сосудов, мкм <sup>2</sup>	Перитумор. обл.	488±130	352±93	439±151	430±69
	Горячие точки	195±57	148±21	155±21	157±42

ные характеристики были близки к уровню аддитивного действия T1023 и БВЗ.

### Заключение

Полученные данные свидетельствуют, что ингибитор NOS T1023 и бевацизумаб оказывают однонаправленное противоопухолевое действие на КЛЛ, сопровождающееся торможением роста и подавлением метастазирования неоплазии. Согласно результатам количественного анализа, при комбинированном применении их антинеопластическая эффективность была близка к уровню аддитивного действия T1023 и БВЗ. Эти результаты позволяют предполагать, что основой противоопухолевой активности соединения T1023 является антиангиогенное действие и свидетельствуют о перспективности применения ингибиторов NOS в комбинированной ангиостатической терапии солидных злокачественных опухолей в сочетании с имеющимися *антинеоваскулярными* средствами.

### Литература

1. Welti J., Loges S., Dimmeler S., Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest.* 2013; 123(8): 190-200.
2. Rao N., Lee Y.F., Ge R. Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin.* 2015; 36(10): 1177-90.
3. Bergers G., Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(8): 592-603.
4. Arbab A.S. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma. *Histol Histopathol.* 2012; 27(5): 549-57.
5. Grothey A., Van Cutsem E., Sobrero A., Siena S., Falcone A., Ychou M. et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicenter, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2013; 381(9863): 303-12.
6. Frandsen S., Kopp S., Wehland M., Pietsch J., Infanger M., Grimm D. Latest results for anti-angiogenic drugs in cancer treatment. *Curr Pharm Des.* 2016; 22(39): 5927-42.
7. Ziche M., Morbidelli L. Molecular regulation of tumor angiogenesis by nitric oxide. *Eur Cytokine Netw.* 2009; 20(4): 164-70.
8. Bian K., Murad F. What is next in nitric oxide? From cardiovascular system to cancer biology. *Nitric Oxide.* 2014. 43: 3-7.
9. Rabender C.S., Alam A., Sundaresan G., Cardnell R.J., Yakovlev V.A., Mukhopadhyay N.D. et al. The role of nitric oxide synthase uncoupling in tumor progression. *Mol Cancer Res.* 2015; 13(6): 1034-43.
10. Филимонова М.В., Южаков В.В., Шевченко Л.И., Бандурко Л.Н., Севаньякаева Л.Е., Макачук В.М. и др. Экспериментальное исследование противоопухолевой активности нового ингибитора синтаза оксида азота T1023. *Молекулярная медицина.* 2015; (1): 61-4.
11. Каприн А.Д., Галкин В.Н., Жаворонков Л.П., Иванов В.К., Иванов С.А., Романко Ю.С. Синтез фундаментальных и при-

кладных исследований - основа обеспечения высокого уровня научных результатов и внедрения их в медицинскую практику. *Радиация и риск.* 2017; 26(2): 26-40.

12. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.* М.; Гриф и К, 2012.
13. Al-Najar A., Al-Sanabani S., Korda J.B., Hegele A., Bolenz C., Herbst H. et al. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2012; 30(3): 325-9.
14. Di Ieva A. Angioarchitectural morphometrics of brain tumors: are there any potential histopathological biomarkers? *Microvasc Res.* 2010; 80(3): 522-33.
15. Южаков В.В., Севаньякаева Л.Е., Ульяненко С.Е., Яковлева Н.Д., Кузнецова М.Н., Цыганова М.Г. и др. Эффективность фракционированного воздействия  $\gamma$ -излучения и быстрых нейтронов на саркому М-1. *Радиационная биология. Радиационная биология.* 2013; 53(3): 267-79.
16. Kashiwagi S., Izumi Y., Gohongi T., Demou Z.N., Xu L., Huang P.L. et al. NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineering blood vessels. *J Clin Invest.* 2005; 115(7): 1816-27.
17. Mohamad N.A., Cricco G.P., Sambuco L.A., Croci M., Medina V.A., Gutierrez A.S. et al. Aminoguanidine impedes human pancreatic tumor growth and metastasis development in nude mice. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(9): 1065-71.
18. Lampson B.L., Kendall S.D., Ancrile B.B., Morrison M.M., Shealy M.J., Barrientos K.S. et al. Targeting eNOS in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2012; 72(17): 4472-82.
19. Janakiram N.B., Rao C.V. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress. *Future Med Chem.* 2012; 4(17): 2193-204.

### References

1. Welti J., Loges S., Dimmeler S., Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest.* 2013; 123(8): 190-200.
2. Rao N., Lee Y.F., Ge R. Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin.* 2015; 36(10): 1177-90.
3. Bergers G., Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(8): 592-603.
4. Arbab A.S. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma. *Histol Histopathol.* 2012; 27(5): 549-57.
5. Grothey A., Van Cutsem E., Sobrero A., Siena S., Falcone A., Ychou M. et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicenter, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2013; 381(9863): 303-12.
6. Frandsen S., Kopp S., Wehland M., Pietsch J., Infanger M., Grimm D. Latest results for anti-angiogenic drugs in cancer treatment. *Curr Pharm Des.* 2016; 22(39): 5927-42.
7. Ziche M., Morbidelli L. Molecular regulation of tumor angiogenesis by nitric oxide. *Eur Cytokine Netw.* 2009; 20(4): 164-70.
8. Bian K., Murad F. What is next in nitric oxide? From cardiovascular system to cancer biology. *Nitric Oxide.* 2014. 43: 3-7.
9. Rabender C.S., Alam A., Sundaresan G., Cardnell R.J., Yakovlev V.A., Mukhopadhyay N.D. et al. The role of nitric oxide synthase uncoupling in tumor progression. *Mol Cancer Res.* 2015; 13(6): 1034-43.

10. Filimonova M.V., Yuzhakov V.V., Shevchenko L.I., Bandurko L.N., Sevankaeva L.E., Makarchuk V.M. et al. Experimental study of antitumor activity of new nitric oxide synthase inhibitor T1023. *Molekulyarnaya meditsina*. 2015; (1): 61-4. (in Russian)
11. Kaprin A.D., Galkin V.N., Zhavoronkov L.P., Ivanov V.K. etc. Synthesis of fundamental and applied research is the basis for ensuring a high level of scientific results and their introduction into medical practice. *Radiatsiya i Risk*. 2017; 26(2): 26-40. (in Russian)
12. *A guide to preclinical drug research. Part one [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya]*. Moscow; Grif I K, 2012. (in Russian)
13. Al-Najar A., Al-Sanabani S., Korda J.B., Hegele A., Bolenz C., Herbst H. et al. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2012; 30(3): 325-9.
14. Di Ieva A. Angioarchitectural morphometrics of brain tumors: are there any potential histopathological biomarkers? *Microvasc Res*. 2010; 80(3): 522-33.
15. Yuzhakov V.V., Sevankaeva V.V., Ulyanenko S.E., Yakovleva S.A., Kuznetsova M.N., Tsyganova M.N. et al. Effectiveness of fractionated action of g-radiation and fast neutrons on M-1 sarcoma. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2013; 53(3): 267-79. (in Russian)
16. Kashiwagi S., Izumi Y., Gohongi T., Demou Z.N., Xu L., Huang P.L. et al. NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineering blood vessels. *J Clin Invest*. 2005; 115(7): 1816-27.
17. Mohamad N.A., Cricco G.P., Sambuco L.A., Croci M., Medina V.A., Gutierrez A.S. et al. Aminoguanidine impedes human pancreatic tumor growth and metastasis development in nude mice. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(9): 1065-71.
18. Lampson B.L., Kendall S.D., Ancrile B.B., Morrison M.M., Shealy M.J., Barrientos K.S. et al. Targeting eNOS in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2012; 72(17): 4472-82.
19. Janakiram N.B., Rao C.V. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress. *Future Med Chem*. 2012; 4(17): 2193-204.

**Сведения об авторах:**

**Филимонова Марина Владимировна**, доктор биол. наук, зав. лаб. радиационной фармакологии, e-mail: mari\_fil@mail.ru

**Южаков Вадим Васильевич**, канд. мед. наук, руководитель лаб. радиационной патоморфологии;

**Филимонов Александр Сергеевич**, науч. сотр. лаб. радиопатологии

**Макарчук Виктория Михайловна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. радиационной фармакологии;

**Бандурко Любовь Николаевна**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии;

**Корнеева Татьяна Сергеевна**, мл. науч. сотр. лаб. радиационной фармакологии;

**Самсонова Алина Сергеевна**, мл. науч. сотр. лаб. радиационной фармакологии;

**Цыганова Марина Геннадьевна**, науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии;

**Шевченко Людмила Ивановна**, канд. химич. наук, вед. науч. сотр. лаб. радиационной фармакологии;

**Севанькаева Лариса Евгеньевна**, ст. науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии;

**Фомина Наталья Константиновна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии;

**Ингель Ирина Эдуардовна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии;

**Яковлева Нина Дмитриевна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 618.14-007.44

Оразов М.Р.<sup>1</sup>, Радзинский В.Е.<sup>1</sup>, Локшин В.Н.<sup>2</sup>, Хамошина М.Б.<sup>1</sup>, Гаспаров А.С.<sup>1</sup>, Дубинская Е.Д.<sup>1</sup>,  
Костин И.Н.<sup>1</sup>, Демяшкин Г.А.<sup>3,4</sup>, Токтар Л.Р.<sup>1</sup>, Лебедева М.Г.<sup>1</sup>, Токаева Э.С.<sup>1</sup>, Читанова Ю.С.<sup>1</sup>, Минаева А.В.<sup>1</sup>

## Роль рецепторов к окситоцину и вазопрессину в патогенезе тазовой боли, обусловленной аденомиозом

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,  
117198, г. Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

<sup>2</sup> Международный клинический центр репродуктологии «PERSONA»,  
050060, г. Алматы, Казахстан, ул. Утепова, д. 32а;

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет),  
119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8

Механизмы, лежащие в основе развития аденомиоз-ассоциированной тазовой боли, на сегодняшний день до конца не раскрыты. Необходим комплексный подход к решению этой проблемы для разработки наиболее эффективных методов диагностики и персонализированной терапии.

**Цель исследования** – изучить роль рецепторов к окситоцину и вазопрессину в патогенезе тазовой боли при аденомиозе.

**Методика.** Изучено 30 образцов ткани после гистерэктомий у женщин с диффузным аденомиозом II-III степени, сопровождающимся болевым синдромом выраженной степени тяжести, и не получавших ранее гормональную терапию. Группа морфологического контроля — 30 биоптатов женщин с аденомиозом, без болевого синдрома, прооперированных по поводу аномальных маточных кровотечений. Эти пациентки также не получали гормональную терапию. Образцы, включавшие эндометрий и миометрий, подвергали стандартным гистологическим процедурам, готовили парафиновые срезы (5 мкм). Общую морфологическую оценку проводили при окраске срезов гематоксилином и эозином. Визуализацию клеточ осуществляли после иммуногистохимического окрашивания с использованием моноклональных антител к рецепторам окситоцина и поликлональные антитела к рецепторам вазопрессина.

**Результаты.** По данным морфометрического анализа эпителиальной выстилки эндометриоидных гетеротопий статистически значимых различий в высоте клеток железистого эпителия, диаметре желез и их плотности на единицу площади между исследуемыми группами не установлено. Суммарная плотность иммунологически маркированных рецепторов к окситоцину в очагах аденомиотического поражения составила  $73.7 \pm 1.8\%$ , в группе морфологического контроля —  $35.2 \pm 1.4\%$ . В цитоплазме гладкомышечных клеток всех слоев миометрия и сосудов обнаруживали умеренную (2 балла), местами выраженную (3 балла) иммуногистохимическую реакцию к рецепторам вазопрессина –  $88,4 \pm 2.3\%$ . В группе морфологического контроля в цитоплазме гладкомышечных клеток всех слоев миометрия и сосудов также отмечалась умеренная иммуногистохимическая реакция к рецепторам вазопрессина –  $43,2 \pm 1.8\%$ . Изменение плотности рецепторов к окситоцину и вазопрессину статистически значимы ( $p < 0.05$ ).

**Заключение.** Патогенетически обоснованным механизмом тазовой боли у женщин с диффузным аденомиозом является изменение рецепторной чувствительности тканей миометрия к действию окситоцина и вазопрессина, что может проявляться спонтанными дисперистальтическими сокращениями миометрия спазматического характера.

**Ключевые слова:** аденомиоз; синдром тазовой боли; окситоцин; вазопрессин.

**Для цитирования:** Оразов М. Р., Радзинский В.Е., Локшин В.Н., Хамошина М.Б., Гаспаров А.С., Дубинская Е.Д., Костин И.Н., Демяшкин Г.А., Токтар Л.Р., Лебедева М.Г., Токаева Э.С., Читанова Ю.С., Минаева А.В. Роль рецепторов к окситоцину и вазопрессину в патогенезе тазовой боли, обусловленной аденомиозом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 99-107.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 99-107

**Для корреспонденции:** Оразов Мекан Рахимбердыевич, e-mail: omekan@mail.ru  
**Финансирование.** Работа не имеет финансовой поддержки.

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

**Поступила** 25.01.2019

Orazov M.R.<sup>1</sup>, Radzinskiy V.Y.<sup>1</sup>, Lokshin V.N.<sup>2</sup>, Khamoshina M.B.<sup>1</sup>, Gasparov A.S.<sup>1</sup>, Dubinskaya E.D.<sup>1</sup>, Kostin I.N.<sup>1</sup>, Demyashkin G.A.<sup>3,4</sup>, Toktar L.R.<sup>1</sup>, Lebedeva M.G.<sup>1</sup>, Tokaeva E.S.<sup>1</sup>, Chitanava Y.S.<sup>1</sup>, Minaeva A.V.<sup>1</sup>

## OXYTOCIN AND VASOPRESSIN IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC PELVIC PAIN INDUCED BY ADENOMYOSIS

<sup>1</sup> Peoples' Friendship University of Russia,  
Miklukho-Maklaya Str. 6, Moscow, 6117198

<sup>2</sup> International Clinical Reproduction Center "PERSONA",  
Utepova Str. 32a, Almaty 050060, Kazakhstan

<sup>3</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,  
Trubetskaya Str. 8. Moscow 119991

<sup>4</sup> Department of Pathology and Laboratory of Cytology, Scientific Clinical Center of the Russian Railways LLC,  
Volokolamskoye Shosse 84, Moscow 123567

Pathogenetic mechanisms underlying the development of adenomyosis-associated pelvic pain are currently not fully understood and require a comprehensive approach in their analysis to determine the most effective diagnosis and individualized therapy.

**Objective.** To expand the understanding of the pathogenesis of pelvic pain associated with adenomyosis.

**Methods.** The study evaluated 30 ( $n = 30$ ) biopsy samples obtained after hysterectomy from women with grade II-III diffuse adenomyosis accompanied by severe painful syndrome who received no hormonal therapy. The morphological comparison group consisted of 30 ( $n = 30$ ) biopsy samples obtained from women with painless adenomyosis operated for abnormal uterine bleeding who did not receive any hormone therapy either. After hysterectomy, fragments of the uterine wall including the endometrium and myometrium were subjected to standard histological procedures with preparation of 5- $\mu$ m paraffin sections. For general morphological assessment the sections were stained with hematoxylin and eosin. Nerve fibers were visualized using immunohistochemical (IHC) staining with monoclonal antibodies (Abcam, UK) to oxytocin receptors (OTR) (Anti-Oxytocin Receptor antibody, Clone ab217212, 1: 300) and polyclonal antibodies to vasopressin receptors (V1aR) (Anti-AVPR1A / V1aR antibody, Clone ab140492, 1: 200). Statistical analysis was performed using the SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, USA). In the absence of normal distribution, the non-parametric Wilcoxon test (Statistical Methods for Research Workers) was used with a significance level at  $p < 0.05$ .

**Results.** The morphometric analysis of the epithelial lining of endometrioid heterotopies did not show any significant differences in the height of glandular epithelium cells, gland diameter, and their density per unit area in groups 1 and 2 ( $p > 0.05$ ). The total density of OTR immunological labeling in foci of the adenomyotic lesion was  $73.7 \pm 1.8\%$  vs.  $35.2 \pm 1.4\%$  in the morphological control group ( $p < 0.05$ ), which indicated a significant effect of oxytocin as a ureterotonic (uterotonic?) peptide enhancing non-peristaltic contractions of the myometrium and local vasoconstriction in adenomyosis. In the cytoplasm of smooth muscle cells (SMC) of all myometrium layers and blood vessels, a moderate (score 2), sometimes pronounced (score 3) IHC response to V1aR ( $88.4 \pm 2.3\%$ ) was found. In contrast, in the morphological control group, a moderate (score 2) IHC response to V1aR ( $43.2 \pm 1.8\%$ ,  $p < 0.05$ ) was observed in SMC cytoplasm in all layers of the myometrium and blood vessels.

**Conclusions:** As distinct from painless diffuse adenomyosis, the pathogenesis of adenomyosis-associated pelvic pain is based on increased activities of the ureterotonic (uterotonic?) factors, oxytocin (OTR, 2.5 times –  $92.2 \pm 2.1\%$  vs.  $36.3 \pm 2.4\%$ ,  $p < 0.05$ ) and vasopressin (V1aR, 2.05 times –  $88.4 \pm 2.3\%$  vs.  $43.2 \pm 1.8\%$ ,  $p < 0.05$ ) in the myometrium, which induces spontaneous, nonperistaltic contractions of spastic myometrium associated with increased expression of their receptors in the pattern under study.

**Keywords:** adenomyosis, pelvic pain syndrome, oxytocin, vasopressin.

**For citation:** Orazov M.R., Radzinskiy V.Y., Lokshin V.N., Khamoshina M.B., Gasparov A.S., Dubinskaya E.D., Kostin I.N., Demyashkin G.A., Toktar L.R., Lebedeva M.G., Tokaeva E.S., Chitanava Y.S., Minaeva A.V. Oxytocin and vasopressin in the pathogenesis of chronic pelvic pain induced by adenomyosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63 (2): 99-107. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 99-107

**For correspondence:** Orazov Mekan Rakhimberdyevich, MD, Professor at the Department of obstetrics and gynecology with course of Perinatology of the RUDN-university. E-mail: omekan@mail.ru.

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

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

**Received** 25.01.2019

## Введение

Механизмы, лежащие в основе развития аденомиоз-ассоциированной тазовой боли (ТБ), на сегодняшний день до конца не раскрыты и требуют комплексного подхода к решению этой проблемы для разработки наиболее эффективных методов диагностики и персонализированной терапии.

Согласно нашим данным, внесшим вклад в развитие современной концепции формирования и персистенции ТБ, выделен ряд ключевых факторов, указывающих на нейроиммунную обусловленность ТБ при эндометриозе вообще, и при аденомиозе в частности [1, 2]. Доказано, что нейрональный компонент ТБ связан с повышением плотности нервных волокон непосредственно в области эндометриоидного поражения ткани. Установлено, что расширение иннервационного поля в миометрии за счет формирования гетеротопических эндометриоидных очагов у женщин с аденомиозом сопровождается клинически выраженным синдромом ТБ [3, 4].

Среди наиболее перспективных маркеров, изменение экспрессии которых указывает на появление патологического нейрогенеза, следует выделить фактор роста нервов (ФРН), который является одной из ведущих нейротрофических субстанций, участвующих в регуляции роста и гомеостаза нервной ткани путем активации пролиферации глиальных клеток, роста и увеличения числа нервных волокон. На уровне периферической сенсорной чувствительности доказано участие ФРН в формировании локальной гиперчувствительности с увеличением плотности нервных волокон и повышением секреции провоспалительных факторов [5–8]. Однако в случае аденомиоза терминальным патофизиологическим субстратом в развитии ТБ выступают спастические сокращения миометрия, возникающие на фоне уже развившейся и/или прогрессирующей локальной гипералгезии, сопряженной с очагами гетеротопий эндометрия. Именно в этой связи выделяют ряд биологически активных триггеров, которые, вероятно, обуславливают не только интенсификацию местного роста нервных волокон, но и могут способствовать прямому или опосредованному повышению спонтанной контрактильности гладких миоцитов миометрия, и лежать в основе болевой перцепции при аденомиозе [9].

Из числа секретлируемых нейрональных маркеров необходимо обозначить вазопрессин и окситоцин, которые являются ключевыми факторами, регулирующими маточную контрактильность. Следует отметить, что вазопрессин и окситоцин напрямую стимулируют сокращение гладкомышечных клеток (ГМК) миоме-

трия и его сосудистого русла, связываясь с одноименными рецепторами — рецептором к вазопрессину (Vasopressin-1a Receptor, V1aR) и рецептором к окситоцину (Oxytocin Receptor, OTR). Роль окситоцина и вазопрессина в развитии ТБ подтверждается отмеченным терапевтическим эффектом антагонистов одноименных рецепторов. Результатами исследований было установлено, что повышение плотности рецепторов к окситоцину и вазопрессину (V1aR и OTR) в миометрии положительно коррелирует с амплитудой маточных сокращений и может приводить к появлению патологических и дискоординированных спазмов миометрия, сопровождающихся выраженной дисменореей и снижением фертильности у женщин репродуктивного возраста [10–12].

Непрямое стимулирование спастического сокращения миометрия может быть обусловлено действием воспалительных и провоспалительных цитокинов (субстанция P, кальцитонин ген-родственный пептид и др.), выступающих в роли нейротрансмиттеров, оказывающих опосредованное влияние на сокращение ГМК и способных увеличивать чувствительность ноцицептивных нейронов путем изменения экспрессии ионных каналов на нервных окончаниях, что в совокупности приводит к развитию локальной гипералгезии с формированием ТБ [9].

Однако количество и разнонаправленность действия биогенных аминов, цитокинов и иных биологически активных пептидов, продуцируемых в эндометрии и участках эндометриоидных гетеротопий, вызывает закономерные сложности в обоснованной оценке влияния тех или иных факторов на развитие ТБ при аденомиозе.

**Цель исследования** — изучить роль рецепторов к окситоцину и вазопрессину в патогенезе тазовой боли при аденомиозе.

## Методика

Настоящее когортное, проспективное, сравнительное морфологическое исследование проведено в период 01.09.2016 — 01.07.2018 гг. на базе кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов в рамках основной научно-исследовательской деятельности — «Репродуктивное здоровье населения Московского мегаполиса и пути его улучшения в современных экологических и социально-экономических условиях». 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 университета.

Изучены 60 образцов ткани матки после гистерэктомии у женщин, страдающих аденомиозом (МКБ-10: эндометриоз матки (аденомиоз) N80.0). Дизайн исследования предполагал разделение пациенток исследуемой когорты с морфологически верифицированным диагнозом «аденомиоз» на 2 группы. I-ю группу (основная,  $n=30$ ) – составили пациентки с ТБ выраженной интенсивности, обусловленной диффузным аденомиозом II – III степени, не получавших ранее гормональную терапию. II-ю группу – женщины с диффузным аденомиозом II – III степени без болевого синдрома, прооперированные по поводу аномальных маточных кровотечений, также не получавших ранее гормональную терапию.

Диффузная форма аденомиоза до операции была верифицирована на основании сонографического и магнитно-резонансно томографического исследования. В дальнейшем диагноз был подтвержден морфологически. Для объективизации тазовой боли и определения её интенсивности использовали визуальную аналоговую шкалу (ВАШ).

*Критерии включения:* верифицированный диагноз эндометриоз матки – аденомиоз (N80.0 согласно классификации МКБ-10), морфологически подтвержденный диагноз, диффузная форма, наличие или отсутствие тазовой боли (N94.8 согласно классификации МКБ-10).

*Критерии исключения:* наличие в анамнезе сопутствующих гинекологических заболеваний воспалительной и невоспалительной этиологии, сопровождающихся синдромом ТБ: варикозная болезнь, системные заболевания, спаечная болезнь, интерстициальный цистит, миофасциальный болевой синдром, синдром раздраженного кишечника, наличие ТБ, обусловленной неврологическими расстройствами, психогенная боль.

Материалом для исследования служили образцы ткани после гистерэктомии. Проводили морфологическое, иммуногистохимическое (ИГХ) исследование и стандартизованную компьютерную морфометрию. Образцы, включавшие эндометрий и миометрий, подвергали стандартным гистологическим процедурам, готовили парафиновые срезы (5 мкм). Общую морфологическую оценку проводили при окраске срезов гематоксилином и эозином. Визуализацию структур осуществляли после иммуногистохимического окрашивания.

Парафиновые срезы для ИГХ исследования помещали на специальные адгезивные предметные стёкла Super Frost Plus («Mainzel Glaser», Polylysine, Германия), и использовали их для ИГХ.

*Имуногистохимическое* исследование проводили по стандартному протоколу в автоматическом режиме на иммуногистостейнере Bond-Max («Leica», Германия). В качестве первичных антител использовали моноклональные мышинные антитела («Abcam», Великобритания) к рецептору окситоцина OTR (Anti-Oxytocin Receptor antibody, Clone ab217212, 1:300) и поликлональные к рецептору вазопрессина V1aR (Anti-AVPR1A / V1aR antibody, Clone ab140492, 1:200), вторичные антитела – универсальные «Cell Marque» (США). Для каждого маркера выполняли контрольные исследования с целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов. Ядра клеток окрашивали гематоксилином Майера.

Полуколичественный метод предусматривал оценку результатов иммуногистохимических реакций с подсчетом количества иммунопозитивных клеток в процентах от общего количества клеток в 10 случайно выбранных полях зрения (увеличение  $\times 400$ ). Интенсивность ИГХ оценивали качественно: «–» – отсутствие, «+» – слабая (5–25% клеток, 1 балл), «++» – умеренная (25 – 50% клеток, 2 балла), «+++» – выраженная ( $\geq 51\%$  клеток, 3 балла). Визуализацию материала выполняли на светооптическом микроскопе «Leica DM4500» (Leica Microsystems, Германия), совмещённом с видеокамерой «Leica» (Германия) и штатным программным обеспечением.

*Компьютерную морфометрию* для оценки результатов иммуногистохимической реакции и определения площади позитивно окрашенных объектов в поле зрения осуществляли при помощи компьютерной системы анализа изображения с открытым кодом Image J 1.51. Для этого проводили микрофотосъемку 10 случайно отобранных полей зрения при увеличении  $\times 200$  на микропрепаратах после выполненной ИГХ реакции с соответствующими первичными антителами. Далее полученное изображение автоматически подвергали нормализации и переводили из режима цветного 24-х-битного изображения (RGB) в режим 256 градаций серого (gray scale), выполняли бинаризацию объектов с заданным уровнем чувствительности. При обработке микрофотографий системой анализа изображений отсекались бинарные объекты с уровнем яркости  $> 150$  и выполнялось определение суммарной площади позитивно окрашенных объектов от общей площади микрофотографий (в %).

Полученные в результате подсчета данные статистически обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). При этом определяли вариационные ряды, выборочное среднее, стандартную ошибку выборочного среднего (SEM) и вероятность раз-

личия. Оценивали соответствие/несоответствие полученных результатов нормальному распределению с применением критерия Колмагорова–Смирнова. При статистической обработке для оценки статистической значимости различий средних значений между группами использовались следующие непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни и H-критерий Краскала-Уоллиса.

## Результаты и обсуждение

Результаты общего морфологического исследования показали наличие во всех образцах эндометрия маточных желез в фазах пролиферации менструального цикла с неровным контуром на фоне неоднородного распределения железистых структур и эндометриальной стромы (рис. 1).

Соединительная эндометриально-миометральная зона не имела четких границ и признаков демаркации. Базальный слой эутопического эндометрия на всем протяжении в значительной степени погружался в подлежащий субмукозный, местами отмечалась инвазия в средний и субсерозный слои миометрия с формированием неравномерных участков пролапса маточных желез в миометрий и образованием очагов эктопической локализации эндометриоидной ткани, содержащей железы и эндометриальную строму (рис. 2).

Во всех слоях в толще миометрия обнаруживались отдельные очаги эндометриоидных гетеротопий пре-

имущественно смешанной морфофункциональной формы с умеренными пролиферативными изменениями эпителия желез и цитогенной стромы. Наблюдались единично расположенные, окруженные плотной эндометриальной стромой маточные железы различной формы и железы, с высоким индексом васкуляризации без признаков атипичности клеточного состава, отмечалась также выраженная перифокальная гиперплазия миоцитов. В строме очагов аденомиоза также выявлялись отдельные участки гиперплазии ГМК, окруженные тонкостенными сосудами (рис. 3).

По данным морфометрического анализа эпителиальной выстилки эндометриоидных гетеротопий статистически значимых различий между группами в высоте клеточек железистого эпителия, диаметре желез и их плотности на единицу площади не установлено (табл. 1).

При иммуногистохимическом исследовании установлено, что в цитоплазме ГМК всех слоев миометрия определяется умеренная (2 балла) иммунопозитивная реакция с антителами к рецептору окситоцина (OTR). В то же время в гладких миоцитах, окружающих участки аденомиотического поражения, обнаруживалась более интенсивная (3 балла) ИГХ реакция. Согласно результатам морфометрического анализа диффузная плотность иммуногистохимического маркирования рецепторов OTR в миометриальных ГМК составила  $92.2 \pm 2.1\%$ , ( $p < 0.05$ ) (рис. 4, а). Значимых изменений интенсивности иммуномечения рецептора OTR в ми-

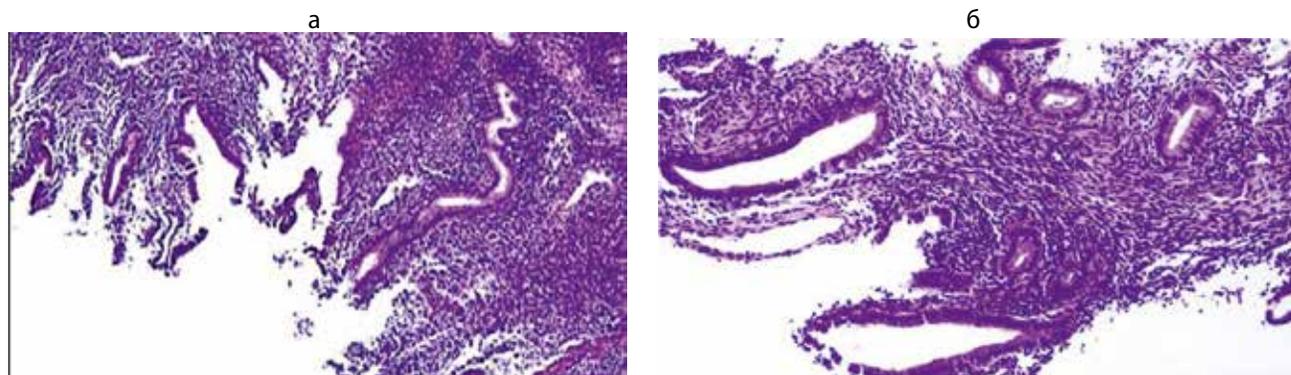


Рис. 1. Эутопический, окраска: гематоксилин и эозин, увелич.  $\times 20$ :  
а – I-я группа (аденомиоз с ТБ), б – II-я группа (аденомиоз без ТБ).

Таблица 1

### Морфометрический анализ эндометриоидных гетеротопий миометрия в биоптатах стенки матки у женщин I-й и II-й групп ( $p > 0.05$ )

Морфометрический параметр	Высота эпителия, $\mu\text{m}$	Диаметр желез, $\mu\text{m}$	Плотность желез на $\text{mm}^2$
I-я группа (аденомиоз с ТБ, $n=30$ )	$15.2 \pm 1.4$	$105.1 \pm 5.3$	$7.2 \pm 2.1$
II-я группа (аденомиоз без ТБ, $n=30$ )	$16.1 \pm 1.2$	$103.5 \pm 4.7$	$8.1 \pm 1.9$

ометрии в зависимости от фазы менструального цикла выявлено не было.

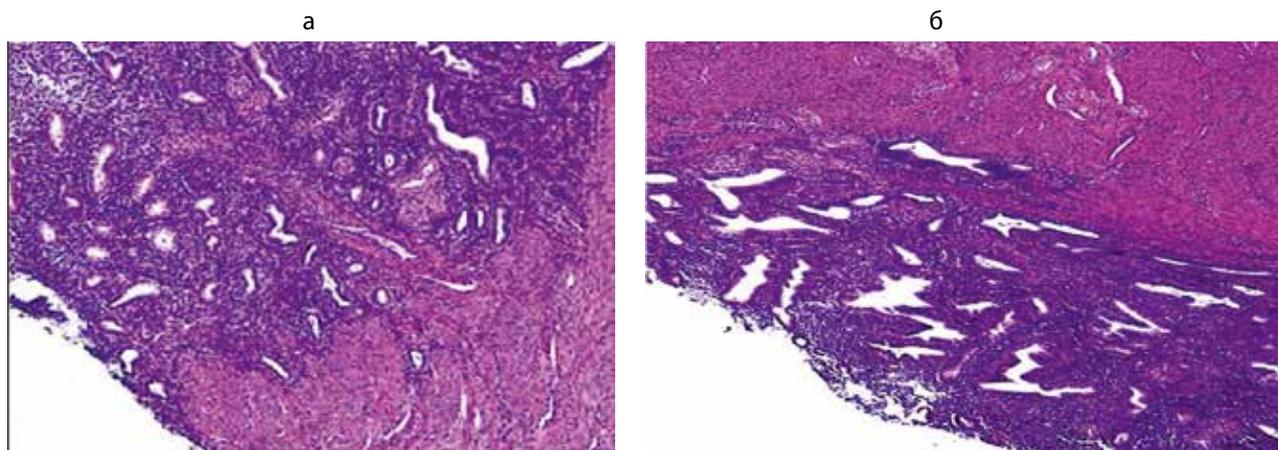
В клетках железистого эпителия эндометриодных гетеротопий, диффузно расположенных в миометрии, выявлялась выраженная (3 балла) цитозольная ИГХ реакция клеток железистого эпителия на OTR, которая также не зависела от фазы менструального цикла. В окружающей эндометриальной строме определялись единичные OTR-положительные клетки, вплотную прилегающие к ГМК миометрия.

Суммарная плотность иммунологического маркирования OTR в очагах аденомиотического поражения составила  $73.7 \pm 1.8\%$  ( $p < 0.05$ ), что указывает на значительный эффект окситоцина как утеротонического пептида, направленного на усиление дисперсальти-

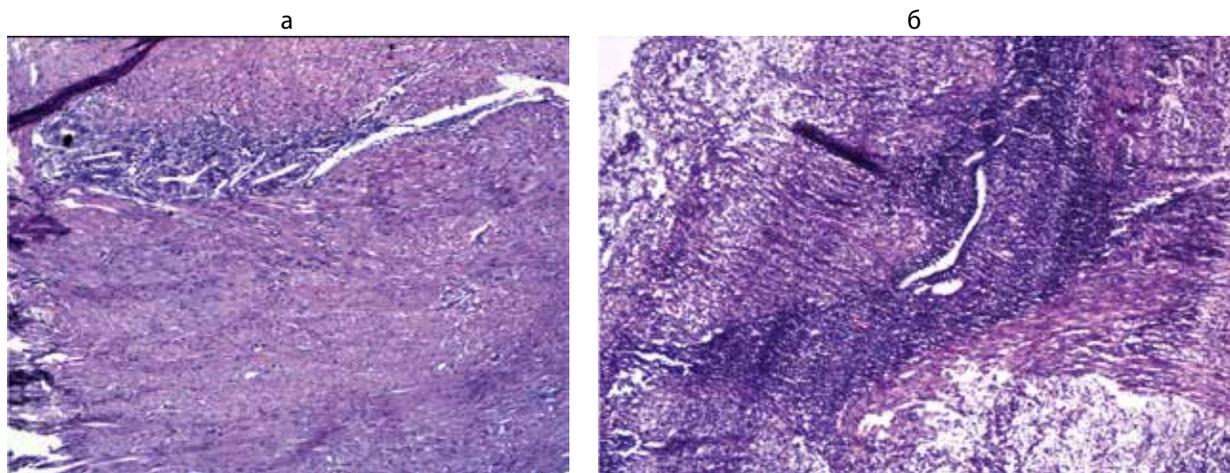
ческих сокращений миометрия и местную вазоконстрикцию при аденомиозе. Сочетание этих патогенетических факторов и гиперпластические изменения миометрия вокруг очагов эндометриодных гетеротопий вносят свой вклад в развитие аденомиоз-ассоциированной ТБ (рис. 4, б).

В группе морфологического контроля умеренное (2 балла) положительное иммунологическое маркирование OTR в цитоплазме ГМК определялось во всех слоях миометрия, также и в ГМК, окружающих очаги эндометриодных гетеротопий. Плотность ИГХ маркирования OTR в миометриальных ГМК составляла  $36.3 \pm 2.4\%$ , ( $p < 0.05$ ).

В клетках железистого эпителия эндометриодных гетеротопий выявлялась умеренная (2 балла) цитозоль-



**Рис. 2.** Соединительная эндометриально-миометральная зона, окраска: гематоксилин и эозин, увелич.  $\times 20$ :  
а – I-я группа (аденомиоз с ТБ), б – II-я группа (аденомиоз без ТБ).



**Рис. 3.** Миометрий, окраска: гематоксилин и эозин, ув.  $\times 20$ :  
а – I-я группа (аденомиоз с ТБ), б – II-я группа (аденомиоз без ТБ).

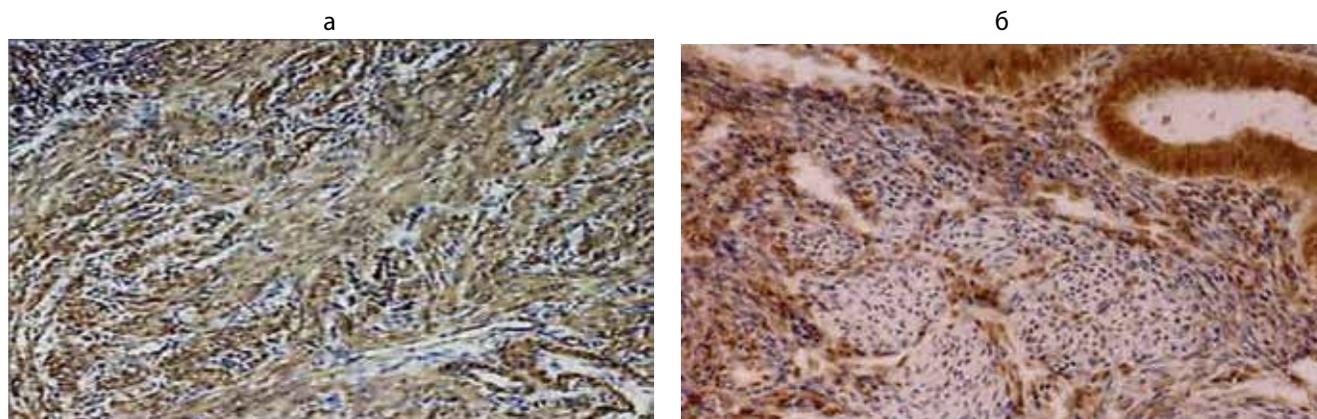
ная ИГХ реакция клеток железистого эпителия на OTR, не зависящая от фазы менструального цикла. В окружающей эндометриальной строме определялись единичные OTR-положительные клетки, вплотную прилегающие к ГМК миометрия. Суммарная плотность иммунологического маркирования OTR в очагах аденомиотического поражения составила  $35.2 \pm 1.4\%$  ( $p < 0.05$ ). Данный факт свидетельствует о более низкой местной активности окситоцина, что предполагает и более низкую тоническую активность гладкой мускулатуры миометрия.

Для оценки сосудистого компонента и изменений локальной васкуляризации миометрия и аденомиотических очагов анализировали экспрессию рецепторов к вазопрессину (V1AR). В цитоплазме гладких миоцитов всех слоев миометрия и сосудов обнаруживали умеренную (2 балла), местами выраженную (3 балла) им-

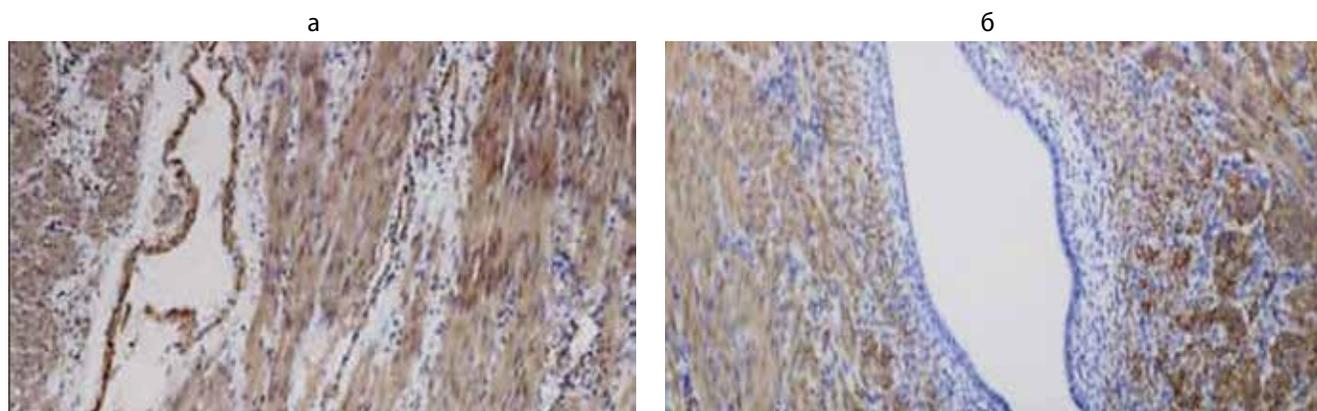
муногистохимическую реакцию к рецептору вазопрессина –  $88,4 \pm 2.3\%$ , ( $p < 0.05$ ) (рис. 5, а).

В цитоплазме клеток железистого эпителия экстракорпоральных эндометриальных желез и в сосудистом русле окружающей стромы иммунологическое маркирование рецептора V1AR отсутствовало (рис. 5, б).

Полученные данные свидетельствуют о тождественной роли вазопрессина и одноименного рецептора в регуляции сократительности миометрия на фоне аденомиоза. Отсутствие экспрессии V1AR в сосудах стромы эндометриальных гетеротопий указывает на усиление неоваскулогенеза в очагах аденомиоза и отсутствие местного вазоконстрикторного эффекта в ответ на действие эндогенного вазопрессина. Это представляется важным не только для понимания патогенеза развития аденомиоза и поддержания метаболизма в аденомиотических очагах, но



**Рис. 4.** Аденомиоз с тазовой болью. Миометрий (метод ИГХ: антитела к OTR, докрасивание ядер – гематоксилином Майера, ув.  $\times 40$ ): а – участок миометрия, б – аденомиотический очаг.



**Рис. 5.** Аденомиоз с тазовой болью. Миометрий (метод ИГХ: антитела к V1AR, докрасивание – гематоксилином Майера, ув.  $\times 40$ ): а – участок миометрия, б – аденомиотический очаг.

также может принимать участие в формировании болевого синдрома.

В группе морфологического контроля в цитоплазме ГМК во всех слоях миометрия и сосудах визуализировалась умеренная (2 балла) ИГХ реакцию на VIAR —  $43,2 \pm 1.8\%$ , ( $p < 0.05$ ). В эпителиальной выстилке эктопических эндометриальных желез и в сосудистом русле окружающей стромы ИГХ реакция с VIAR отсутствовала. Полученные данные указывают на отсутствие процессов активного неоваскулогенеза и снижение потенциальной сократимости гладких миоцитов в образцах морфологического контроля, что предрасполагает к снижению активных спастических сокращений миометрия и тем самым, уменьшению раздражения локальных ноцицептивных рецепторов в отличие от болевой формы аденомиоза.

### Заключение

В основе патогенеза тазовой боли у женщин с диффузным аденомиозом лежит изменение рецепторной чувствительности тканей миометрия к действию окситоцина и вазопрессина, что проявляется спонтанными дисперистальтическими сокращениями миометрия спастического характера. На это указывает статистически значимое увеличение плотности рецепторов к окситоцину (в 2,5 раза) и вазопрессину (в 2,9 раза) в сравнении с безболевым формой болезни.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ИГХ — иммуногистохимическое исследование
- ТБ — тазовая боль
- ГМК — гладкие мышечные клетки
- ФРН (NGF) — Фактор Роста Нервов (Nerve Growth Factor)
- OTR — рецептор к окситоцину (Oxytocin Receptor)
- VIAR — рецептор к вазопрессину (Vasopressin Receptor 1A)

### Литература

3. Оразов М.Р., Радзинский В.Е., Хамошина М.Б. и др. Патологический нейрогенез — ключевое звено патогенеза тазовой боли, обусловленной аденомиозом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(1): 59-64.

8. Радзинский В.Е., Оразов М.Р., Носенко Е.Н. Экспрессия сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) в тканях матки как один из механизмов аллогенеза при аденомиозе, ассоциированном с хронической тазовой болью. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(1): 32-5.

### References

1. Orazov M.R., Demyashkin G.A., Hamoshina M.B., Zakirova YA.R., Zharkov N.V., Batov M.A. Pathogenesis of pelvic pain in external genital endometriosis: treatment options. *Akusherstvo i ginekologiya: Novosti. Mneniya. Obucheniya*. 2017; 17, 3.
2. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*. 2014; 10(5): 261–75.
3. Neurogenesis - the key pathogenesis of pelvic pain caused by adenomyosis/ M.R. Orazov, V.E. Radzinskiy, M.B. Hamoshina, E.N. Nosenko, T.V. Galina, A.O. Duhin, A.A. et al. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(1): 59 – 64. (In Russian)
4. Innervation of endometrium and myometrium in women with painful adenomyosis and uterine fibroids. Zhang, Xinmei et al. *Fertil Steril*. 2010; Vol. 94: 730 –7.
5. Barcena de Arellano, M.L., Arnold, J., Vercellino, G.F., Chiantera, V., Ebert, A.D., Schneider, A. et al. Influence of nerve growth factor in endometriosis-associated symptoms. *Reprod Sci*. 2011; 18: 1202–10.
6. Mita S, Shimizu Y, Sato A, et al. Dienogest inhibits nerve growth factor expression induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  or interleukin-1 $\beta$ . *Fertil Steril* 2016; 101: 595–601.
7. Goteri G, Lucarini G, Montik N, Zizzi A, Stramazotti D, Fabris G, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha), and microvessel density in endometrial tissue in women with adenomyosis. *Int J Gynecol Pathol*. 2009; 28: 157–63.
8. Radzinskiy V.E., Orazov M.R., Nosenko E.N. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in uterine tissues as one of the mechanisms of algogenesis in adenomyosis associated with chronic pelvic pain. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(1): 32-5. (in Russian)
9. Jiang C, Cheng Z. Update of recent studies of adenomyosis-associated dysmenorrhea. *Gynecology & Minimally Invasive Therapy*. 2016; 5(4): 137–40.
10. Mechsner S, Grum B, Gericke C, et al. Possible roles of oxytocin receptor and vasopressin-1 $\alpha$  receptor in the pathomechanism of dysperistalsis and dysmenorrhea in patients with adenomyosis uteri. *Fertil, Steril*. 2010; 94: 2541-6.
11. Guo SW, Mao X, Ma Q, Liu X. Dysmenorrhea and its severity are associated with increased uterine contractility and overexpression of oxytocin receptor (OTR) in women with symptomatic adenomyosis. *Fertil. Steril*. 2013; 99: 231–40.
12. Zhang Y., Yu P., Sun F., et al. Expression of oxytocin receptors in the uterine junctional zone in women with adenomyosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2015; 94: 412-8.

### Сведения об авторах:

**Оразов Мекан Рахимбердыевич**, доктор мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, e-mail: omekan@mail.ru;

**Радзинский Виктор Евсеевич**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, заслуженный деятель науки РФ, зав. каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: radzinsky@mail.ru;

**Локшин Вячеслав Нотанович**, доктор мед. наук, проф., чл.- корр. НАН РК, акад. РАМТ, президент Казахстанской Ассоциации репродуктивной медицины, генеральный директор Международного клинического центра репродуктологии «PERSONA», ректор Международной академии репродуктологии, e-mail: v\_lokshin@persona-ivf;

**Хамошина Марина Борисовна**, доктор мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, e-mail: mba999@yandex.ru;

**Гаспаров Александр Сергеевич**, доктор мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, e-mail: 5044334@mail.ru;

**Дубинская Екатерина Дмитриевна**, доктор мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, e-mail: dubinskaya@mail.ru;

**Костин Игорь Николаевич**, доктор мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, e-mail: kostin\_i@mail.ru;

**Демяшкин Григорий Александрович**, канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова ФГА-ОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России; врач-патологоанатом НУЗ Научный клинический центр ОАО «РЖД», Москва. e-mail: dr.dga@mail.ru;

**Токтар Лилия Равильевна**, канд. мед. наук, доцент каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии медицинского факультета, Медицинского института РУДН, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: toktarly@yandex.ru;

**Лебедева Марина Георгиевна**, канд. мед. наук, доцент каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии медицинского факультета, Медицинского института РУДН, отрасль специализации, акушерство и гинекология, e-mail: lebedeva1108@rambler.ru;

**Токаева Эльвира Сериковна**, аспирант каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, e-mail: tokaeva.e@yandex.ru;

**Читанова Юрий Сергеевич**, аспирант каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, e-mail: 4itanava@gmail.com;

**Минаева Анастасия Вадимовна**, аспирант каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, e-mail- miniminaeva@mail.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 618.2+616.97:615.281

Перетягко О. В., Пуликов А.С.

## Реакция децидуальных клеток плаценты при коррекции хламидиоза у женщин во время беременности

ФИЦ КНЦ СО РАН «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»,  
660022, г. Красноярск, Россия, ул. Партизана Железняка, д. 3 г

**Цель исследования:** оценка влияния антибиотиков на структуру децидуальных клеток плаценты при лечении хламидиоза во время беременности.

**Методика.** Гистологическими методами изучали децидуальные клетки различных зон плаценты от рожениц с неосложненной беременностью и с хламидиозом, пролеченным во время беременности. Препараты готовили стандартным гистологическим методами с окраской гематоксилин-эозином. Гисто-стереометрически определяли большой и малый диаметры децидуальных клеток и ядер, количество децидуальных клеток на мм<sup>2</sup> площади базальной пластинки и септ. Вычисляли ядерно-цитоплазматическое отношение, объемы децидуальных клеток, их цитоплазмы и ядер. Охарактеризованы клеточные популяции стромальных децидуальных клеток базальной пластинки и септ. Составлены вариационные графики объема ядер децидуальных клеток базальной пластинки и септ.

**Результаты.** Установлено, что антибактериальная терапия действует преимущественно на клетки центральной зоны плаценты, изменяя ядерно-клеточный аппарат децидуальных клеток, при этом клеточно-пролиферативный статус клеток снижается к периферии плаценты, где компенсаторно-приспособительные механизмы децидуальных клеток работают слабо. Это сопровождается ослаблением необходимых иммунных реакций в плаценте. Появление дополнительных мод в графиках объема ядер может свидетельствовать о высокой митотической активности и набухании ядер, что, вероятно, связано с цитотоксическим действием антибактериальных препаратов.

**Заключение.** Использованная схема антибактериальной терапии хламидиоза у беременных оказывает незначительный положительный эффект. Результаты работы могут быть использованы для разработки новых схем лечения хламидиоза во время беременности, с использованием антибактериальных препаратов с более щадящим действием на ядерно-клеточный аппарат децидуальной ткани плаценты.

**Ключевые слова:** беременность, хламидиоз, антибактериальная терапия, плацента, децидуальные клетки.

**Для цитирования:** Перетягко О. В., Пуликов А.С. Реакция децидуальных клеток плаценты при коррекции хламидиоза у женщин во время беременности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(2): 108-115.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.108-115

**Для корреспонденции:** Перетягко Ольга Викторовна, e-mail: peretyatkooolga@mail.ru

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

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

**Поступила** 11.02.2017

Peretyat'ko O.V., Pulikov A.S.

### THE RESPONSE OF PLACENTAL DECIDUAL CELLS TO TREATMENT OF CHLAMYDIOSIS IN PREGNANT WOMEN

Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, 3g, Partizana Zheleznyaka Str. 3g, Krasnoyarsk 660022, Russia

**Aim.** To evaluate the effect of antibiotics on placental decidual cells in the treatment of chlamydiosis during pregnancy.

**Methods.** The study was performed on 6,000 decidual cells in different zones of placenta from mothers with uncomplicated pregnancy and chlamydiosis treated during pregnancy. The cells were stained with hematoxylin-eosin according to standard histological techniques. **Method.** The major and minor diameters of decidual cells and nuclei and the number of decidual cells per mm<sup>2</sup> of basal lamina and septa were determined using histostereometry. Based on the obtained values the nucleus-cytoplasm ratio and volumes of decidual cells, their cytoplasm and nuclei were calculated. Populations of stromal decidual cells of the basal lamina and septa were characterized. Variation curves of nucleus volume were constructed for decidual cells of the basal lamina and septa.

**Results.** The antibiotic therapy affected primarily cells of the placenta central area. In this process, the cell proliferative status decreased toward the periphery of placenta where compensatory-adaptive mechanisms of decidual cells are weak. This was associated with impairment of essential immune responses in the placenta. The emergence of additional peaks in the variation curves of nucleus volume may indicate high mitotic activity and functional swelling of nuclei, probably due to cytotoxic effects of antibacterial drugs.

**Conclusion.** The used regimen of antibiotic therapy for chlamydiosis in pregnant women exerted a minor beneficial effect. Results of this study can be used to develop new regimens for treatment of chlamydiosis during pregnancy with antibacterial drugs with a weaker effect on the nucleus apparatus of cells in the placental decidual tissue.

**Keywords:** pregnancy, chlamydiosis, antibiotic therapy, placenta, decidual cells.

**For citation:** Peretyat'ko O.V., Pulikov A.S. The response of placental decidual cells to treatment of chlamydiosis in pregnant women. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 108-115. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.108-115

**For correspondence:** *Olga V. Peretyat'ko*, Researcher of Clinical Division of Digestive System Pathology in Adults and Children, FRC KSC SB RAS «Scientific Research Institute of Medical Problems of the North», 3g, Partizan Zheleznjak st., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation, e-mail: peretyatkoolga@mail.ru

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

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

**Information about authors:**

Peretyat'ko O.V., <http://orcid.org/0000-0003-1142-3933>

Pulikov A.S., <http://orcid.org/0000-0002-8751-5861>

**Received** 11.02.2017

## Введение

Полиэтиологичность внутриутробной инфекции, отсутствие четких клинических проявлений инфекции, многофакторное воздействие инфекционного агента на плод – все это делает данную патологию одной из актуальных и сложных медико-социальных проблем [1].

Среди всех урогенитальных инфекций в России, лидирующее положение занимает хламидийная инфекция [2]. Последствия хламидийной инфекции отражаются не только на состоянии гинекологического и андрологического здоровья, но и на репродуктивной функции.

Беременность в связи с развивающимся функциональным иммунодефицитом является весьма уязвимым состоянием, предрасполагающим к развитию инфекционных заболеваний. При этом может пострадать не только беременная женщина, но также плод или новорожденный [3]. Риск неблагоприятных воздействий на плод может быть связан как с прямыми последствиями инфицирования, так и с опосредованным действием патологических изменений в организме матери вследствие развития инфекции, что определяет необходимость проведения эффективной антибактериальной терапии при бактериальных инфекциях у беременной женщины [4].

Антибиотики являются одними из наиболее часто назначаемых беременным препаратов [5]. При назначении антимикробных препаратов беременным важно обеспечить адекватное лечение инфекции, избегая при этом неблагоприятного воздействия на плод, так как ни одно лекарственное средство не может считаться абсолютно безопасным для применения во время беременности [4, 6].

Внутриутробная инфекция поражает в основном децидуальные клетки плаценты, которые являются одним из основных её «рабочих элементов». Изменения морфологии и числа децидуальных клеток при различных внутриутробных инфекциях доказывают целесообразность подобных исследований [7–9]. В связи с этим, была поставлена задача: охарактеризовать морфофункциональное состояние децидуальных клеток плаценты при антибактериальной терапии хламидиоза с децидуальными клетками плаценты неосложненной беременности.

Цель — оценка влияния антибиотиков на децидуальные клетки плаценты при лечении хламидиоза во время беременности.

## Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия пациентов. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом института.

Объектом исследования служили плаценты рожениц с неосложненной беременностью и беременных женщин с диагнозом хламидиоза, пролеченных антибиотиками по стандартным алгоритмам. Все данные были получены из обменной карты и истории родов. Включенные в исследование беременные были информированы о проведении исследования и дали согласие на обработку полученного биоматериала и публикацию результатов в открытой печати. Было исследовано 6000 окрашенных гематоксилин-йозином децидуальных клеток (ДК) из 3 зон плаценты: центральной

(Ц) (около пуповины), краевой (К) (ближе к краю плаценты) и парацентральной (ПЦ) (между ними) зон. Основное рабочее увеличение -  $\times 400$ . С помощью окуляра – микрометра, определяли большой и малый диаметры децидуальных клеток и ядер базальной пластинки и септ, подсчитывали количество децидуальных клеток на  $\text{мм}^2$  площади базальной пластинки и септ. Используя полученные данные, вычисляли ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО), объемы децидуальных клеток, их цитоплазмы и ядер по формуле:

$$V = \pi/6 \times LB^2 \text{ где:}$$

L – больший диаметр ядра,

B – меньший диаметр ядра.

В каждом препарате методом случайной выборки проводили измерение каждого из исследуемых параметров 100 раз. На основании вычисленных диаметров стромальные децидуальные клетки базальной пластинки (БП) и септ были распределены по клеточным популяциям на К-клетки, малые и большие децидуальные клетки (МДК и БДК соответственно) [10]. Кроме того, были построены вариационные кривые объема ядер децидуальных клеток базальной пластинки и септ с шагом в  $150 \text{ мкм}^3$ .

Полученные результаты подвергались непараметрической статистической обработке с применением непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых переменных (сравнение группы контроля и патологии), критерия Вилкоксона (сравнение показателей между зонами плаценты и фракциями), с использованием программного продукта STATISTICA 6.0. Принятый уровень значимости составлял  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

При гистологическом изучении препаратов были выявлены следующие особенности (табл. 1). Лечение хламидиоза во время беременности приводило к тому, что половина исследуемых показателей в базальной пластинке и септах центральной зоны плаценты существенно не отличались от значений контрольной группы. Исключение представляли увеличенные параметры объема ядер децидуальных клеток, их удельный объем на единицу площади и ядерно-цитоплазматическое соотношение в септах, а также снижение показателей объема децидуальных клеток и их цитоплазмы в базальной пластинке.

Оценивая характер изменений показателей децидуальных клеток между базальной пластинкой и септами центральной зоны плаценты, можно заключить, что после лечения хламидиоза септы центральной зоны плаценты имеют меньшие размеры децидуальных клеток,

в то время как ядерный потенциал их несколько выше, что может быть обусловлено прилежанием к пуповине, где данная зона оказывается первой, на которую воздействует антибактериальный препарат, при этом за счет организма матери нивелируется их влияние.

После лечения хламидиоза во время беременности, показатели децидуальных клеток парацентральной зоны базальной пластинки статистически значимо выше, чем в контроле, в то время как количество ДК на  $1 \text{ мм}^2$  площади плаценты и удельного объема клеточного материала статистически значимо снижается, тем самым приближая значения удельного объема ядерного материала к показателям контрольной группы. В септах терапевтическое воздействие проявляется статистически значимым увеличением параметров ядерно-клеточного звена, при этом, также как и в базальной пластинке, снижается количество децидуальных клеток на единицу площади.

Сравнение показателей септ и базальной пластинки парацентральной зоны плаценты показало отсутствие различий с параметрами децидуальных клеток контрольной группы. Удельный объем децидуальных клеток и их ядер в септах был увеличен в группе пролеченного хламидиоза относительно базальной пластинки. В группе применения антибактериальных препаратов в септах был достоверно увеличен и ядерный потенциал децидуальных клеток относительно базальной пластинки, за счет объема ядер и ядерно-цитоплазматического отношения, а также количество децидуальных клеток на единицу площади плаценты, в то время как объем ДК и их цитоплазмы был статистически снижен.

Базальная пластинка краевой зоны оказалась более чувствительной к терапии и наиболее защищенной от компенсаторно-приспособительных процессов воздействия антибактериальных препаратов, здесь было зафиксировано достоверное снижение всех исследуемых показателей, относительно группы контроля. Децидуальные клетки септ напротив, реагируют на воздействие терапии, увеличением всех исследуемых показателей относительно контрольной группы.

При сравнении базальной пластинки и септ краевой зоны было выявлено, что в контрольной группе в септах все изучаемые показатели были существенно снижены, а в группе пролеченного хламидиоза - повышены.

При распределении по клеточным популяциям стромальных децидуальных клеток было выявлено, что количество малых децидуальных клеток было во всех исследуемых группах больше всех остальных фракций (табл. 2). Количество МДК в группе контроля в цен-

Таблица 1

## Параметры децидуальных клеток в базальной пластинке и септах плаценты

Параметры	Центральная зона		Парацентральная зона		Краявая зона	
	Контроль	Хламидиоз леченый	Контроль	Хламидиоз леченый	Контроль	Хламидиоз леченый
<b>Базальная пластинка</b>						
Объем ДК БП (мкм <sup>3</sup> )	2802,95 (2059,31-3203,36)	2353,5 (2059,31-3203,38)	2059,31 (1430,08-2059,31) 2)	2802,95 (2059,31-3203,38) 1) 2)	2353,5 (1838,67-3203,38) 2) 3)	2059,31 (1634,38-2647,69) 1) 2) 3)
Объем (V <sub>1</sub> ) ядер ДК БП (мкм <sup>3</sup> )	220,64 (153,22-294,19)	220,64 (204,3-294,19) 1)	153,22 (98,06-178,76) 2)	220,64 (163,44-294,19) 1)	220,64 (153,22-294,19) 3)	220,64 (153,22-294,19) 1) 2) 3)
Объем (V <sub>2</sub> ) цитоплазмы ДК БП (мкм <sup>3</sup> )	2508,77 (1906,09-2909,19)	2132,86 (1765,13-2909,19) 1)	1906,09 (1332,02-1953,08) 2)	2531,24 (1765,13-2982,73) 1) 2)	2132,86 (1685,45-2909,19) 2) 3)	1838,67 (1340,19-2427,05) 1) 2) 3)
ЯЦО БП (V <sub>1</sub> /V <sub>2</sub> )	0,089 (0,76-0,101)	0,11 (0,07-0,14) 1)	0,087 (0,08-0,101)	0,10 (0,07-0,14) 1)	0,101 (0,084-0,103) 2) 3)	0,11 (0,07-0,14) 1)
Количество ДК БП на 1мм <sup>2</sup>	1093,75 (937,5-1406,25)	937,5 (781,25-1093,75) 1)	1093,75 (937,5-1406,25)	781,25 (781,25-1093,75) 1) 2)	1093,75 (937,5-1406,25)	937,5 (781,25-1093,75) 1) 3)
Общий объем ДК БП в 1мм <sup>3</sup> , мкм <sup>3</sup>	96707584,61 (76743279,11-140986406,25)	77361813,54 (58851125,51-97487027,07)	72063703,01 (57186878,32-105059003,91) 2)	63329397,55 (63329397,55-104905295,18) 1) 2)	92216783,48 (73179558,58-134439433,59) 3)	63509317,54 (48313174,76-80030887,00) 1) 2) 3)
Общий объем ядер ДК БП в 1мм <sup>3</sup> , мкм <sup>3</sup>	7908306,21 (6275716,15 – 11529226,76)	8052960,66 (6126094,73-10147890,25) 1)	5949021,95 (4720906,37-8672858,79) 2)	5626669,82 (5626669,82-9320591,72) 1) 2)	7986934,12 (6338112,12-11643855,47) 3)	5937755,46 (4517003,62-7482427,06) 1) 2) 3)
<b>Септы</b>						
Объем ДК септ (мкм <sup>3</sup> )	2353,50 (1912,22-3203,38) 4)	2353,5 (1838,67-3203,38)	2059,31 (1430,08-2353,5) 2)	2353,5 (1634,38-3203,38) 1) 4)	2059,31 (1765,13-3103,27) 2) 3) 4)	2647,69 (2059,31-3203,38) 1) 3) 4)
Объем (V <sub>3</sub> ) ядер ДК септ (мкм <sup>3</sup> )	220,64 (153,22-294,19)	294,19 (220,64-523,00) 1) 4)	153,22 (98,06-220,64) 2)	294,19 (220,64-400,42) 1) 4)	220,64 (98,06-220,64) 2) 3) 4)	294,19 (220,64-367,73) 1) 2) 3) 4)
Объем (V <sub>4</sub> ) цитоплазмы ДК септ (мкм <sup>3</sup> )	2132,86 (1759-2872,41) 4)	2059,31 (1544,48-2827,98)	1906,09 (1332,02-2132,86) 2)	1985,77 (1387,18-2819,30) 1) 4)	1961,25 (1544,48-2845,86) 2) 3) 4)	2162,48 (1765,13-2909,19) 1) 3) 4)
ЯЦО септ (V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub> )	0,095 (0,08-0,103) 4)	0,14 (0,10-0,20) 1) 4)	0,087 (0,08-0,101) 2)	0,14 (0,12-0,20) 1) 2) 4)	0,08 (0,063-0,107) 2) 3) 4)	0,14 (0,10-0,18) 1) 3) 4)
Количество ДК септ на 1мм <sup>2</sup>	937,5 (781,25-1093,75) 4)	937,5 (781,25-1093,75) 1) 4)	1093,75 (781,25-1250) 2) 4)	937,5 (781,25-1406,25) 2) 4)	937,5 (937,5-1250) 2) 4)	937,5 (781,25-1250,00) 1) 2)
Общий объем ДК септ в 1мм <sup>3</sup> , мкм <sup>3</sup>	71708142,44 (54550232,18-90362587,21) 4)	75221571,88 (57222988,51-94790014,33) 4)	73065677,97 (44108406,15-89269137,53) 2) 4)	74695180,36 (56822548,92-137223808,59) 1) 2) 4)	68223360,55 (68223360,55-105036734,87) 3) 4)	75899956,15 (57739052,91-116855626,97) 1) 2) 4)
Общий объем ядер ДК септ в 1мм <sup>3</sup> , мкм <sup>3</sup>	6160715,48 (4686615,05-7763388,80) 4)	9555579,09 (7269175,30-12041405,89) 1) 4)	6123864,77 (3696864,55-7481927,79) 2)	9809973,91 (7462700,00-18022072,85) 1) 2) 4)	5669461,70 (5669461,70-8728707,30) 3) 4)	8863235,6 (6742491,76-13645843,89) 1) 2) 3) 4)

Примечание.  $p < 0,05$  – 1) по сравнению с контролем; 2) - по сравнению с центральной зоной; 3) - по сравнению с парацентральной зоной; 4) - по сравнению базальной пластинки и септ в пределах зоны при  $p < 0,05$ .

тральной зоне плаценты было наибольшим, как в базальной пластинке, так и в септах. В контрольной группе высокое содержание К-клеток выявлялось преимущественно в парацентральной зоне плаценты, тогда как в базальной пластинке, так и в септах, количество больших децидуальных клеток было минимальным относительно всех остальных исследуемых групп.

После лечения хламидийной инфекции количество больших децидуальных клеток увеличено как в базальной пластинке, так и в септах, относительно группы контроля, количество К-клеток снижено, в то время как МДК достигают значений контрольной группы базальной пластинки, при этом в септах наиболее активной зоной по продукции малых децидуальных клеток является краевая зона плаценты.

При распределении по частоте исходных несистематизированных данных объема ядер децидуальных клеток с интервалом в 150 мкм<sup>3</sup> было выявлено, что большинство ядер во всех исследуемых группах на всем протяжении плаценты соответствуют количеству ядерного материала в среднем 3n, учитывая, что первый класс К1 составляют ядра с объемом ядра 75 мкм<sup>3</sup> (1—150 мкм<sup>3</sup>) (см. рисунок).

В центральной и парацентральной зонах плаценты в первой моде К1 большее количество ядер базальной пластинки было отмечено в группе контроля, однако в парацентральной зоне число ядер было несколько увеличено. В базальной пластинке краевой зоны было зафиксировано статистически значимо наибольшее количество ядер в группе леченного хламидиоза относительно контрольной группы и относительно остальных зон плаценты в рамках исследуемой патологии. В септах статистически значимо минимальное число ядер класса К1 зафиксировано в группе терапевтического хламидиоза в парацентральной и краевой зонах, в то время как в центральной зоне количество ядер значимо не отличалось от контроля.

В классе К2 наибольшее количество ядер в базальной пластинке принадлежало группе контроля краевой зоны, несколько ниже было количество в группе лечен-

ного хламидиоза. Такая же тенденция была характерна и для ядер базальной пластинки парацентральной зоны в моде К2, однако здесь количество ядер было несколько ниже. В классе К2 центральной зоны базальной пластинки количество ядер группы контроля и леченного хламидиоза существенно не различалось, и было значимо выше одноименных групп в парацентральной зоне, при этом количество ядер в группе пролеченного хламидиоза центральной зоны значимо не отличалось от краевой зоны плаценты. Количество ядер септ моды К2 было наибольшим в контрольной группе, и несколько ниже в группе леченного хламидиоза на всем протяжении плаценты. При этом, количество ядер септ контрольной группы в зоне К2 было наибольшим в центральной зоне, количество ядер септ группы леченного хламидиоза — в краевой зоне.

В зоне К3, которая характеризуется увеличением ядерного материала в 5n и соответствует объему ядер 301-450 мкм<sup>3</sup>, отмечено наличие незначительного количества ядер базальной пластинки и септ контрольной группы (не более 8%). В группе леченного хламидиоза количество ядер в зоне К3 было большим в септах на всем протяжении плаценты и составляло около 10% общего количества децидуальных клеток септ зоны. Количество ядер базальной пластинки в группе леченного хламидиоза статистически значимо снижено в центральной и краевой зонах относительно парацентральной зоны ( $p < 0,05$ ).

Контрольная группа характеризуется отсутствием мод К4 и К5, в отличие от группы исследуемой патологии. В группе леченного хламидиоза зоны К4 (объем ядра 7n) количество ядер септ статистически превалирует над количеством в базальной пластинке на всем протяжении плаценты ( $p < 0,05$ ). Количество ядер базальной пластинки исследуемой патологии в рамках моды К4 снижается от центра к периферии. Мода К5 (объем ядра 9n) группы пролеченного хламидиоза характеризуется отсутствием ядер базальной пластинки в центральной и краевой зонах, в то время как количество ядер септ в центральной зоне достигает почти 9%

Таблица 2

Коэффициенты отношений популяций стромальных децидуальных клеток

	Зоны плаценты	МДК/К-клетки		МДК/БДК		К-клетки/БДК	
		Контроль	Хламидиоз леченый	Контроль	Хламидиоз леченый	Контроль	Хламидиоз леченый
Базальная пластинка	Ц	15,13	31,57	28,38	10,05	1,88	0,32
Септы		14,5	10,51	116	8,04	8	0,77
Базальная пластинка	ПЦ	5,63	21,95	140,7	6,52	25	0,3
Септы		10,29	206,5	3,02	42,5	0,29	1,05
Базальная пластинка	К	10,8	7,29	15,43	22,11	1,43	3,05
Септы		7,47	27	48,1	19,13	6,44	0,71

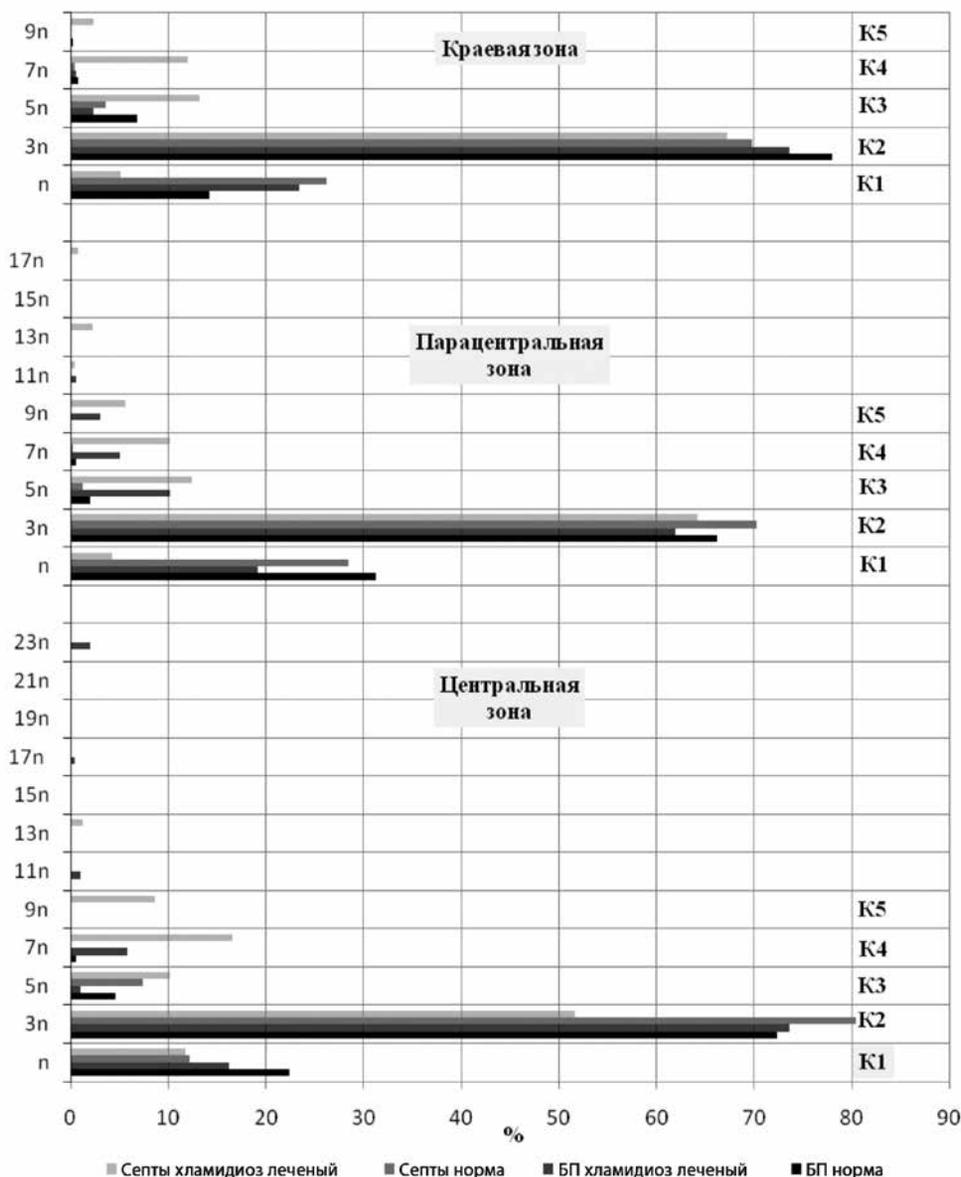
от общего количества ядер септ, и снижается к периферии плаценты.

Также, в группе леченного хламидиоза на всем протяжении плаценты выявляются ядра с гигантским объемом, однако их количество незначительно.

### Заключение

Антибактериальная терапия оказывает влияние на центральную зону плаценты преимущественно за

счет регуляции количества децидуальных клеток, тем самым стабилизируя общий объем клеточного и ядерного материала в плаценте. При этом, септы больше реагировали на терапию увеличением ядерного потенциала децидуальных клеток относительно базальной пластинки, что выразилось и в преобладании количества ядер с потенциалом 5-9n. В базальной пластинке парацентральной зоны, воздействию антибиотиков на нормализацию показателей подвержен в первую очередь ядерный аппарат, что подтверж-



Вариационная кривая объема ядер децидуальных клеток на протяжении плаценты.

дается как наличием ядер больших объемов, так и большим объемом клеточного материала, тогда как в септах объем клеточного материала остается в рамках нормальных значений. Однако, пролиферативный статус во всех фракциях плаценты парацентральной зоны был снижен. Базальная пластинка краевой зоны наиболее всего страдает от антибактериальной терапии. В ней не наблюдаются компенсаторно-приспособительные процессы, в отличие от септ. В целом, во всех зонах плаценты количество больших децидуальных клеток после терапии было повышенным, количество К-клеток снижалось, при этом отмечался рост числа малых децидуальных клеток, направленных на усиление синтеза межклеточного вещества. Учитывая, что большие децидуальные клетки являются секретирующими большое количество плацентарных белков и гормонов, увеличение концентрации которых, в частности плацентарных белков материнской части плаценты PP-12 и PP-14, ведет к развитию внутриутробной гипоксии и гипотрофии, можно предположить, что купирование хламидиоза в некоторой степени неблагоприятно влияет на ход и развитие беременности. Оценивая снижение количества К-клеток при хламидиозе во время беременности, которые выполняют иммунорегулирующие функции, можно сделать вывод, что терапевтические мероприятия хламидиоза у матери снижают иммунитет в плаценте на всем ее протяжении.

Применение антибиотиков, в частности макролидов, которые преимущественно назначают при лечении хламидиоза во время беременности, вероятно оказывает цитотоксическое воздействие на ядерный аппарат децидуальных клеток. Колебания объема ядер может отражать функциональное набухание ядра, поэтому нельзя с полной уверенностью судить об увеличении числа хромосом клеток и содержании ДНК в ядре. Однако, появление дополнительных мод, в частности в исследуемой группе, может свидетельствовать о высокой митотической активности, в то время как вариационная кривая контрольной группы больше соответствует состоянию накопления полиплоидных ядер при задержке деления [11].

Основываясь на ранее проведенных нами исследованиях [12] можно подтвердить предположения, что терапевтические мероприятия во время беременности, направленные на купирование хламидиоза, оказывают незначительное положительное влияние на нормализацию показателей за счет стабилизации ядерного потенциала децидуальных клеток, однако клеточно-пролиферативный статус при этом значительно снижен. В качестве перспектив применения полученных результатов, может служить разработка новых схем ле-

чения женщин, беременность которых осложнена хламидиозом, на основе применения антибактериальных препаратов с более слабым воздействием на ядерно-клеточный аппарат децидуальной фракции плаценты.

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

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

### Литература

1. Хамадянов У.Р., Русакова Л.А., Хамадянова А.У., Тихонова Т.Ф., Хамадянова С.У., Галимов А.И. и др. Внутриутробное инфицирование плода: современный взгляд на проблему. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2013; 5: 16-20.
2. Кубанова А.А., Лесная И.Н., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е., Каспирович М.А. Анализ эпидемиологической ситуации и динамика заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем, и дерматозами на территории Российской Федерации. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2010; 5: 4-21.
3. Каграманова Ж.А., Ланшакова П.Е., Малиновская В.В., Сви-стуннов А.А., Выжлова Е.Н. Влияние факторов риска на патогенез анэмбрионии в раннем сроке беременности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 136-49.
4. Стецюк О. У., Андреева И. В. Актуальные аспекты применения макролидов при беременности и лактации. *Клиническая микробиология и антимикробная терапия*. 2010; 1: 41 – 53.
5. Andrade S.E., Gurwitz J.H., Davis R.L., Chan K.A., Finkelstein J.A., Fortman K., et al. Prescription drug use in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004; 191: 398-407.
6. Shehata H, Nelson-Piercy C. Drugs to avoid. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2001; 15: 971-86.
7. Перетяtko О. В., Пуликов А. С. Особенности реакции децидуальных клеток плаценты при уреоплазмозе, после его лечения антибиотиками во время беременности. *Врач-аспирант*. 2013; 6.3(61): 446-54.
8. Перетяtko О. В., Пуликов А. С. Реакция децидуальных клеток при хламидийном поражении плаценты. *В мире научных открытий*. 2013; 3(39): 90-116.
9. Цхай В.Б., Пуликов А.С., Наумова Н.М. Морфофункциональные состояния амниона при поздних гестозах и внутриутробной инфекции. *Вестник перинатологии, акушерства и гинекологии*. 2000; 7: 139-41.
10. Кветной И. М., Айламазян Э. К., Лапина Е. А., Колобов А. В. *Сигнальные молекулы – маркеры зрелости плаценты*. М.; МЕД-прессинформ; 2005.
11. Хесин Я.Е. *Размеры ядер и функциональное состояние клеток*. М.; Медицина, 1967.
12. Перетяtko О.В., Пуликов А.С. Оценка антибактериальной терапии хламидиоза во время беременности в плаценте. *Современные технологии в медицине*. 2015; 7(2): 127-32.

### References

1. Khamad'yanov U.R., Rusakova L.A., Khamad'yanova A.U., Tikhonova T.F., Khamad'yanova S.U., Galimov A.I., et al. Intrauterine fetal infection: the present view of the problem. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2013; 5: 16-20. (in Russian)

2. Kubanova A.A., Lesnaya I.N., Kubanov A.A., Melekhina L.E., Kaspirovich M.A. Analysis of the epidemiological situation and dynamics of std and dermatosis morbidity in the territory of the Russian federation. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2010; 5: 4-21. (in Russian)
3. Kagramanova Zh.A., Lanshchakova P.E., Malinovskaya V. V., Svis-tunov A. A., Vyzhlova E. N. Effect of risk factors on pathogenesis of anembryonia in early pregnancy loss. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(4): 136-49. (in Russian)
4. Stetsyuk O.U., Andreeva I.V. Emerging Concepts in Use of Macro-lides in Pregnancy and Lactation. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimitrobnaya terapiya*. 2010; 1: 41-53. (in Russian)
5. Andrade S.E., Gurwitz J.H., Davis R.L., Chan K.A., Finkelstein J.A., Fortman K., et al. Prescription drug use in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004; 191: 398-407.
6. Shehata H, Nelson-Piercy C. Drugs to avoid. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2001; 15: 971-86.
7. Peretyat'ko O.V., Pulikov A.S. Features reaction decidual placental cells in ureaplasmosis, after treatment with antibiotics during pregnancy. *Vrach-aspirant*. 2013; 6.3(61): 446-54. (in Russian)
8. Peretyat'ko O.V., Pulikov A.S. Decidual cells reaction on chlamydial damage of placenta. *V mire nauchnykh otkrytiy*. 2013; 3(39): 90-116. (in Russian)
9. Tskhay V.B., Pulikov A.S., Naumova N.M. The morphofunctional state of the amnion in late gestosis and intrauterine infection. *Vestnik perinatologii, akusherstva i ginekologii*. 2000; 7: 39-141. (in Russian)
10. Kvetnoy I.M., Aylamazyan E.K., Lapina E.A., Kolobov A.V. *Signal molecules - markers of placental maturity [Signal'nye molekuly – markery zrelosti placenty]*. Moscow; MEDpressinform; 2005. (in Russian)
11. Khesin Ya.E. *Sizes nuclei and functional state of the cell [Razmery yader i funktsional'noe sostoyanie kletok]*. Moscow; Meditsina; 1967. (in Russian)
12. Peretyat'ko O.V., Pulikov A.S. Assessment of antibacterial therapy of Chlamydiosis during pregnancy in placenta. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2015; 7(2): 127-32. (in Russian)

**Сведения об авторах:**

**Перетьяко Ольга Викторовна**, науч. сотр., клиническое отд-ние патологии пищеварительной системы у взрослых и детей, группа функциональной морфологии, e-mail: peretyatko Olga@mail.ru;

**Пуликов Анатолий Степанович**, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр., e-mail: Pulik\_off@mail.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 615.356.065+616.36-02

Демяшкин Г.А.<sup>1</sup>, Цибулевский А.Ю.<sup>2</sup>, Балыка М.А.<sup>3</sup>, Иванов А.Н.<sup>1</sup>, Маммаев Р.У.<sup>1</sup>

## К вопросу о механизме патогенеза пелиоза печени

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), 119434, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8;

<sup>2</sup>Московский медицинский университет «РЕАВИЗ» («РЕабилитация, Врач И Здоровье»), 107076, г. Москва, Россия ул. Краснобогатырская, д. 2, корп. 2;

<sup>3</sup>Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, 194044, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Лебедева, д. 6

**Цель** исследования – иммуногистохимическая характеристика пелиоза печени. **Методика.** Образцы опухолей печени ( $n=4$ ) изучали с использованием гистологического, гистохимического (импрегнация  $AgNO_3$ ) и иммуногистохимического методов. В качестве первичных антител использовали антитела к Collagen III, Collagen IV,  $\alpha$ -SMA, Ki67, CD31, CD34,  $\beta$ -catenin, CD10 и pCEA (Novocastra, UK). Вторичные антитела – универсальные (HiDef Detection™ HRP Polymer system, «Cell Marque», США). Интенсивность иммуногистохимической окраски оценивали в баллах: «1+» – 1–(10% клеток), «2+» – (11–50% клеток), «3+» – ( $\geq 51\%$  клеток). Результаты представляли в процентах от общего числа иммунопозитивных клеток. **Результаты.** Гистологическое исследование показало, что стенка кисты представлена склерозированной волокнистой тканью с выраженной мононуклеарной инфильтрацией. В перипортальных трактах отчетливо выражены скопления гемосидерина и обширные зоны ступенчатого некроза. В прилежащей печеночной паренхиме определялись мультифокальные, синусоидальные эктазии с кровяным и/или плазменным содержимым, охватывающие все 3 зоны печеночной дольки. При гистохимическом исследовании в этих образованиях выявлялись ретикулярные волокна без признаков деструкции. При иммуногистохимическом исследовании вдоль синусоидов и выстилки полостей было обнаружено увеличение экспрессии Collagen III, Collagen IV (96.6 $\pm$ 0.2% и 97.2 $\pm$ 0.3% соответственно) и  $\alpha$ -SMA (94% $\pm$ 0,5). Степень экспрессии на CD31 (87.3 $\pm$ 0.6%) и CD34 (86.3 $\pm$ 0.2%) в эндотелии уменьшалась в направлении от триад к центральной вене. Индекс экспрессии Ki-67 был увеличен в макрофагах (28.3 $\pm$ 0.2%) и лимфоцитах (12.3 $\pm$ 0.7%) синусоидов. Иммунонегативные реакции на  $\beta$ -catenin, CD10 и pCEA исключали опухолевый рост при пелиозе печени. **Заключение.** Активный синтез белков экстрацеллюлярного матрикса и пролиферация иммунокомпетентных клеток являются ключевыми процессами в патогенезе пелиоза печени на фоне разрушения эндотелиальных коммуникаций. Использованные методы могут быть полезны в дифференциальной диагностике пелиоза и опухолевых процессов в печени.

**Ключевые слова:** пелиоз печени; клинический случай; иммуногистохимическое исследование.

**Для цитирования:** Демяшкин Г.А., Цибулевский А.Ю., Балыка М.А., Иванов А.Н., Маммаев Р.У. К вопросу о механизме патогенеза пелиоза печени. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 116-122.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.116-122

**Для корреспонденции:** Демяшкин Григорий Александрович, канд. мед. наук, гистолог-эмбриолог, врач-патологоанатом; доцент каф. патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: dr.dga@mail.ru

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

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

**Поступила** 29.06.2018

Demyashkin G.A.<sup>1</sup>, Tsubulevskiy A.Yu.<sup>2</sup>, Balyka M.A.<sup>3</sup>, Ivanov A.N.<sup>1</sup>, Mammaev R.U.<sup>1</sup>

### ABOUT THE PATHOGENESIS OF PELIOSIS HEPATIS

<sup>1</sup> Department of Pathology, I.M. Sechenov First State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Moscow 119048, Russia;

<sup>2</sup> Department of Morphology and Pathology, Moscow Medical University REAVIZ, Krasnobogatyrskaya Str. 2, Bld. 2, Moscow 107076, Russia.

<sup>3</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy, Akademika Lebedeva Str. 6, St.-Petersburg, 194044, Russia

**Aim.** Characterization of peliosis hepatitis using immunohistochemical methods.

**Methods.** The study was performed on archive autopsy samples from patients ( $n=4$ ) with peliosis hepatitis using histological, histochemical ( $AgNO_3$  impregnation), and immunohistochemical methods. Murine monoclonal antibodies, anticollagen type III, anticollagen type IV, anti- $\alpha$ -smooth muscle actin, anti-CD31, anti-CD34, and anti-Ki-67 (Novocastra, UK), were used as primary antibodies, and all-purpose antibodies (HiDef Detection™ HRP Polymer system, Cell Marque, USA) were used as secondary antibodies. Intensity of immunohistochemical staining was expressed as scores: 1+ = 1-10% of cells, 2+ = 11-50% of cells, and 3+ =  $\geq 51\%$  of cells.

**Results.** The cyst wall consisted of sclerotic fibrous tissue with pronounced mononuclear infiltration, accumulation of hemosiderin in periportal tracts, and zones of piecemeal necrosis. Multifocal, sinusoidal ectasias filled with blood and/or plasma components encompassing all three zones of the hepatic lobe were observed in the adjacent hepatic parenchyma. Histochemical study

revealed reticular fibers without signs of destruction in these formations. Immunohistochemical analysis found increased expression of collagen III (96.6±0.2%), collagen IV (97.2±0.3%), and  $\alpha$ -SMA (94%±0.5) along sinusoids and cavity lining. The endothelial expression of CD31 (87.3±0.6%) and CD34 (86.3±0.2%) decreased on going from the hepatic triad to the central vein. The expression index, Ki-67, was increased in sinusoid macrophages (28.3±0.2%) and lymphocytes (12.3±0.7%). Reactions to  $\beta$ -catenin, CD10 and pCEA were immune-negative, which excluded tumor growth.

**Conclusion.** The study suggested that the active synthesis of extracellular matrix proteins and the immune cell proliferation are key processes in the pathogenesis of peliosis hepatis during destruction of endothelial communications in hepatic lobes.

**Keywords:** peliosis hepatis; clinical case; immunohistochemical study.

**For citation:** Demyashkin G.A., Tsibulevskiy A.Yu., Balyka M.A., Ivanov A.N., Mammaev R.U. About the pathogenesis of peliosis hepatis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 116-122. (In Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.116-122

**For correspondence:** **Grigory Demyashkin**, PhD, histologist-embryologist, pathologist; ass. professor of the Department of Pathology of the Sechenov University (Moscow, Russia), E-mail: doc.dga76@gmail.com

**Information about authors:**

Grigory Demyashkin, <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

Alexander Tsibulevsky, <https://orcid.org/0000-0003-4449-7859>

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

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

**Received** 29.06.2018

## Введение

Пелиоз печени (ПП; пурпурный гепатит, пелиозный гепатит) редкое наследственное заболевание характеризующееся образованием в печеночных дольках множественных локальных каверн синусоидных капилляров, заполненных кровью. Отличительным морфологическим признаком собственно ПП является разрушение ретикулярных волокон стенки синусоидов. ПП – редкое сосудистое заболевание, за более чем полвековую историю, которого было зафиксировано всего несколько сотен случаев. Данные по эпидемиологии пелиоза весьма приблизительны, так как заболевание трудно диагностируется с помощью современных методов прижизненной визуализации (ультразвуковое исследование, компьютерная и магнитно-резонансная томография и др.). Единственным методом, позволяющим верифицировать диагноз ПП, является морфологический анализ биоптатов печени [1]. Как правило, ПП развивается у лиц, ранее принимавших лекарственные препараты из групп анаболических стероидов, оральных контрацептивов, селективных ингибиторов эстрогеновых рецепторов или других веществ с выраженной гепатотоксичностью, а также при воздействии гамма-излучения [2]. Кроме того, описана особая форма ПП – бацилярный пелиозный (пурпурный) гепатит барселонской этиологии у больных ВИЧ-инфекцией, а также при других вариантах иммунодефицита, при болезни «кошачьих царапин». В 25–50% случаев этиология ПП остается не известной (идиопатический вариант) [1, 3].

Выделяют следующие формы пелиоза: паренхиматозную и флектоктическую. Флектоктическая форма характеризуется наличием полостей, выстланных эндотелием, при паренхиматозной – отсутствует эндотелиальная выстилка полостей, обнаруживаются очаги некроза паренхимы печени [4, 5]

Механизмы формирования пелиозных каверн мало изучены. Принято считать, что они образуются вследствие разрушения ретикулярных структур перисинусоидальных пространств или эндотелия, а также при нарушении функционирования сливной части кавернальных трактов [2, 4].

В последние десятилетия, использование иммуногистохимических методов позволило выявить причинно-следственную связь между синусоидальной дилатацией и увеличением продукции экстрацеллюлярного матрикса с трансформацией клеток фибробластического ряда в миофибробласты [6].

Сложность диагностики ПП связана с тенденцией маскировки заболевания более часто выявляемыми инструментальными методами исследования патологические состояниями – гепатоцеллюлярной карциномой, аденомой, метастазами в печени или абсцессом. Таким образом, для точной дифференциальной диагностики предложено применять иммуногистохимический анализ различных новообразований печени [3, 7].

**Цель исследования** – изучение иммуногистохимическими методами клеточных и молекулярных механизмов пелиоза печени.

Для реализации обозначенной цели поставлены следующие задачи: с помощью комплекса гистологических и иммуногистохимических методов оценить состояние компонентов межклеточного матрикса (коллагены III и IV типов, гладкомышечный актин), уровень клеточной пролиферации (Ki-67) и функциональный статус эндотелия (CD31, CD34); кроме того, с использованием реакций на антитела к CD10, p-CEA и к  $\beta$ -catenin оценить возможность развития в тканях печени опухолевых процессов, в частности, гепатоцеллюлярной карциномы и/или  $\beta$ -catenin-ассоциированной формы гепатоцеллюлярной аденомы.

### Методика

Клинико-морфологическое исследование операционного биопсийного материала пациентов (n=4) с диагнозом «Пелиоз печени» проводили с помощью гистологических, гистохимических и иммуногистохимических методов.

Физикальные, клинико-лабораторные и инструментальные данные (по материалам историй болезни пациентов). Пациенты (n=4): 3 женщины (42, 45 и 54 лет), 1 мужчина (60 лет) находились на лечении в хирургическом отделении (с 2011 по 2017 гг.) с жалобами на выраженную общую слабость, недомогание, тупые боли в правом подреберье тянущего характера в течение нескольких месяцев. Семейный и наследственный анамнезы не отягощены. Границы печени по Курлову (по срединно-ключичной, срединной линиям и

левой реберной дуге): 1-й пациент – 13, 10, 8 см; 2-й пациент – 12, 12, 8 см; 3-й пациент – 15, 13, 9 см; 4-й пациент – 12, 10, 6 см.

**Биохимический анализ крови.** Исследование печени выявило повышение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ).

**Ультразвуковое исследование (УЗИ):** на УЗИ выявлялись множественные кисты печени различных объемов (от 15 до 60 мл, у одной из пациентов – 180); жировой гепатоз; множественные гематомы с участками отека в разных сегментах печени (**рис. 1**).

Результаты мультиспиральной компьютерной томографии совпадают с данными УЗИ (**рис. 2**).

**Оперативное вмешательство.** Под эндотрахеальным наркозом пациентам была выполнена диагностическая лапароскопия с биопсией новообразований печени.

**Морфологическое исследование.** Фрагменты печени фиксировали в 10% нейтральном формалине, забуференным по Лилли (при pH 7,2 – 7,4), заливали в парафин по стандартной методике. Парафиновые срезы, толщиной  $\approx$  5 мкм монтировали на обычные, а для иммуногистохимического исследования – на специальные адгезивные предметные стёкла. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином после депарафинизации и (H&E) для гистологического исследования. В качестве контроля использовали аутопсийный материал печени (n=5).

Ретикулярные волокна выявляли методом импрегнации депарафинированных срезов азотнокислым се-



**Рис. 1.** Пациент К., 60 лет. При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости (печени) обнаружена киста диаметром до 2,53 см в проекции V – VI сегментов.



**Рис. 2.** Пациентка Р., 42 года. При МКТ брюшной обнаружены множественные кисты в печени разных диаметров.

ребром по методу Вейгерта (по одному препарату от каждого случая).

*Иммуногистохимический метод (ИГХ).* После депарафинизации и регидратации парафиновых срезов проводили ИГХ-исследование по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max («Leica», Германия).

В качестве первичные использовали мышинные антитела (в готовом разведении) к Collagen IV (clone PHM-12, Novocastra™, Великобритания), Collagen III (clone FH-7A, Abcam™, США),  $\alpha$ -SMA (clone  $\alpha$ sm-1, Novocastra™, Великобритания), CD34 (clone QVEnd/10, Novocastra™, Великобритания), CD31 (clone JC70A, Novocastra™, Великобритания), Ki67 (clone MM1, Novocastra™, Великобритания), CD10 (clone 56C6, abcam™, США),  $\beta$ -catenin (clone 17C2, Novocastra™, Великобритания), pCEA (Abcam™, США). Вторичные антитела – универсальные (HiDef Detection™ HRP Polymer system, «Cell Marque», США), позволяющие выявлять мышинные и кроличьи первичные антитела, конъюгированные с ферментным комплексом на основе пероксидазы хрена. Для каждого маркера выполнялись контрольные исследования с целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера; срезы промывали под проточной водой; дегидратировали и заключали в балзам.

Визуализацию биопсийного материала выполняли на светооптическом микроскопе Carl Zeiss Lab.A1 («Carl Zeiss», Германия), совмещенном с видеокamerой AxioCam ERc5s («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия) и программным обеспечением ZEN Lite.

Согласно рекомендациям (Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry. 4<sup>th</sup> ed., 2014) проводили подсчет общего количества иммунопозитивных клеток, качество и интенсивность окраски оценивали в баллах «–» – отсутствие, «+» – слабая (1–10% клеток), «++» – умеренная (11–50% клеток), «+++» – выраженная ( $\geq 51\%$  клеток).

Результаты представляли в % клеточных структур с разной интенсивностью реакций.

*Компьютерную морфометрию* осуществляли при помощи компьютерной системы анализа изображений с открытым кодом ImageJ 1.51 для оценки интенсивности иммуногистохимической реакции и определения площади позитивно окрашенных объектов в поле зрения. Для этого проводили микрофото съемку 10 случайно отобранных полей зрения при увеличении  $\times 200$  на микропрепаратах с выполненной ИГХ реакцией с соответствующими первичными антителами. Далее полученное изображение автоматически нормализовали и переводили из ре-

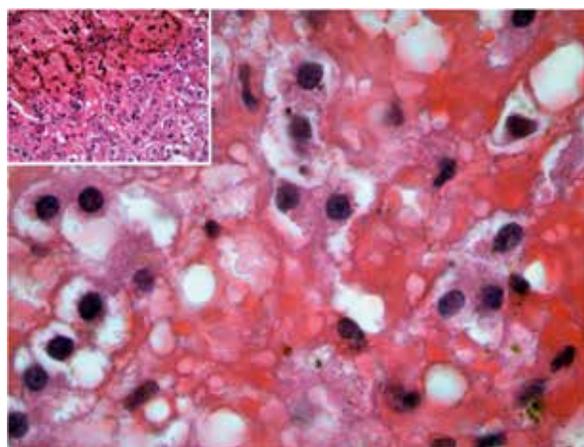
жима цветной 24-битной (RGB) в режим 256 градаций серого, после чего проводили бинаризацию объектов с заданным уровнем чувствительности. При обработке микрофотографий с помощью системы анализа изображений исключали бинарные объекты с уровнем яркости  $> 150$  и определяли суммарную площадь позитивно окрашенных объектов от общей площади микрофотографий.

*Статистический анализ.* Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием программного пакета SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США), рассчитывали средние арифметические величины с ее предельными отклонениями и среднеквадратичную ошибку. Соответствие данных нормальному распределению подтверждали с применением критерия Колмогорова – Смирнова. При статистической обработке для оценки статистической значимости различий средних значений между группами использовались следующие непараметрические критерии: U-критерий Манна–Уитни, H-критерий Краскала–Уоллеса. При отсутствии нормального распределения данных использовали непараметрический критерий F. Wilcoxon (Statistical methods for research workers) с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

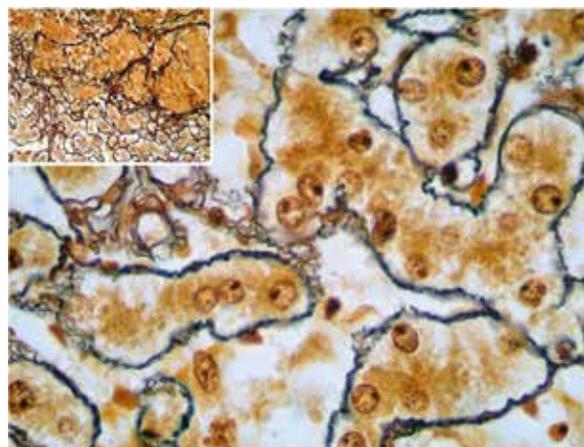
## Результаты и обсуждение

*Гистологическое исследование.* При микроскопическом исследовании образцов печени обнаруживались расширенные синусоиды и каверны, заполненные кровью, выстланные эндотелием или гепатоцитами, которые местами были сильно деформированы (рис. 3). На срезах, импрегнированных нитратом серебра, выявили частично сохранные печеночные дольки с множественными, диффузно расположенными внутридольевыми полостями (рис. 4).

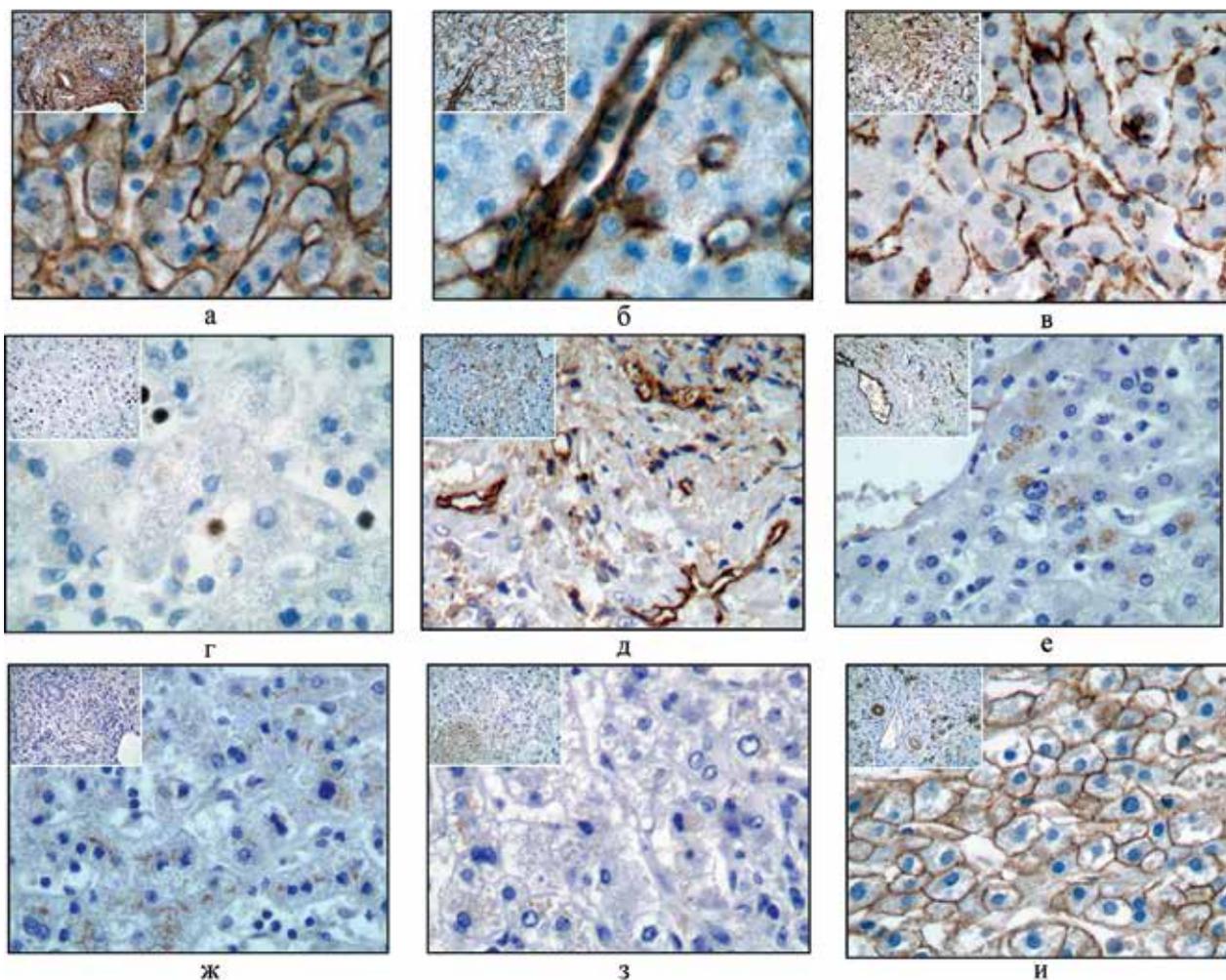
*Иммуногистохимическое исследование.* Во всех образцах вдоль расширенных синусоидов и субэндотелиально в выстилке патологических полостей ( $96.6 \pm 0.2\%$ ) выявлялась положительная реакция на коллаген III типа (рис. 5, а). Выраженное маркирование (коллаген IV типа) обнаружено вокруг синусоидов и в выстилке каверн ( $97.2 \pm 0.3\%$ ) (рис. 5, б). Окрашивание на  $\alpha$ -SMA, которое в норме выявляется в гладкомышечных клетках (ГМК) стенки кровеносных сосудов, перипитах, единичных желчных протоках, наблюдали в стенке расширенных синусоидов, вокруг каверн ( $94.2 \pm 0.5\%$ ) и в перисинусоидальных зонах (рис. 5, в). Положительная реакция на антитела к Ki-67 была выявлена в макрофагах ( $18.4 \pm 0.2\%$ ) и лимфоцитах ( $8.1 \pm 0.7\%$ ), расположенных перисинусоидально вблизи очагов кровоизлияний (рис. 5, г). Для CD31- и



**Рис. 3.** Результаты морфологического исследования пелиоза печени. Окраска гематоксилином и эозином, увелич.  $\times 100$ , вставка  $\times 40$ . В центре – разрушенные гепатоциты, очаги кровоизлияния.



**Рис. 4.** Результаты морфологического исследования пелиоза печени. Импрегнация солями серебра, увелич.  $\times 100$ , вставка  $\times 40$ .



**Рис. 5.** Результаты иммуногистохимического исследования пелиоза печени; увелич.  $\times 100$ , вставка  $\times 40$ . Антитела к: а – Collagen type III, б – Collagen type IV, в –  $\alpha$ -SMA, г – Ki-67, д – CD31; е – CD34, ж – CD10, з – pCEA, и –  $\beta$ -catenin.

CD34-позитивных клеток ( $86.3 \pm 0.2\%$  и  $86.3 \pm 0.2\%$  соответственно) характерна тенденция к уменьшению интенсивности их окрашивания в направлении от портальных трактов к центральной вене, то есть от области наилучшего кровоснабжения к худшему (зона I-зона III), а также выраженная положительная реакция в макрофагах и лимфоцитах (рис. 5, д, е).

ИГХ-реакции с антителами к CD10, p-CEA (polyclonal carcinoembryonic antigen) и  $\beta$ -catenin продемонстрировали отрицательные результаты во всех случаях (рис. 5 ж, з, и).

Исследован биопсийный материал 3 женщин и 1 мужчины в возрасте от 42 до 60 лет с пелиозом печени, обнаруженным по данным УЗИ и МСКТ и подтвержденным гистологическим исследованием.

Особое внимание в ходе данного исследования было уделено роли экстрацеллюлярного матрикса в патогенезе ПП, таких как: коллаген III и IV типов и гладкомышечному актину. Обнаруженное нами перисинусоидально и вдоль синусоидов увеличение количества коллагена III типа, известного как «молодой» коллаген [8], говорит о начальных этапах фиброобразования, а IV типа – компонента базальных мембран (Телегина и др., 2013) и в первую очередь кровеносных сосудов, о неоваскуляризации в виде синусоидальной капилляризации. Увеличение объема коллагенового матрикса возможно связано с активацией извращенного синтеза перисинусоидными клетками пространства Диссе, а также некоторыми эндотелиоцитами и отдельными гепатоцитами и может рассматриваться как проявление компенсаторного механизма или локальной субституции (формой репаративной регенерации). Следует отметить, что усиление интенсивности иммуногистохимической реакции на коллагены вокруг пролиферирующих желчных протоков и в зонах ступенчатого некроза совпадает с участками повышенной эпителиальной пролиферации.

Интенсивное окрашивание на  $\alpha$ -SMA свидетельствует о возможной трансформации фибробластов в миофибробласты под действием повышенного давления внутри пелиозных полостей [9], направленной на обеспечение ретракции и снижение уровня синусоидальной дилатации, а также (совместно с адренергическими нервами-вазоконстрикторами) на модуляцию тонуса синусоидов. Существенно, что при этом отмечается увеличение количества маркеров клеточной адгезии и миграции (CD31 и CD34) в эндотелии и выход за его пределы макрофагов и Т-лимфоцитов, обладающих, как известно, васкулопротективным и неоваскуляризирующим действием [10].

Положительное внутриядерное окрашивание на Ki-67 (маркёра клеточной пролиферации) макрофагов (в том числе клеток Купффера), лимфоцитов в пери-

синусоидальных пространствах и между печеночными балками, по всей вероятности, свидетельствует о развитии иммунокомпетентного воспаления.

То обстоятельство, что иммуногистохимические реакции с антителами к CD10 и p-CEA и отсутствие иммуномечения на  $\beta$ -catenin дали отрицательные результаты, позволяет исключить гепатоцеллюлярную карциному и  $\beta$ -catenin -ассоциированную форму гепатоцеллюлярной аденомы соответственно.

На основании полученных данных можно высказать следующие суждения относительно патогенеза пелиоза печени. Под влиянием этиологических факторов происходит повреждение эндотелия, нарушение пространственных взаимоотношений между печеночными балками и синусоидными капиллярами, что приводит к замедлению тока крови, повышению давления в микроциркуляторном русле (в направлении от сосудов портального тракта к центральной вене) и в конечном итоге к синусоидальной дилатации и выходу эритроцитов в пространство Диссе. Затем развивается воспаление и ступенчатые некрозы в печеночных дольках, сопровождающиеся избыточным синтезом компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Активно мигрирующие в очаг воспаления иммунокомпетентные клетки частично утилизируют некротизированные гепатоциты и избыточный коллаген, вследствие чего нарушается баланс между коллагенообразованием и иммунным ответом. Активный синтез коллагена, по всей видимости, можно рассматривать как один из ключевых компенсаторных механизмов, обеспечивающих образование ограниченного очага воспаления (по типу пролиферативного воспаления). Что касается макрофагов, утилизирующих коллаген, их роль в данном случае представляется нам отрицательной – разрушая коллаген, они повреждают сосуды, и тем самым, усугубляют синусоидальную дилатацию и кровоизлияния.

## Заключение

Активный синтез белков экстрацеллюлярного матрикса и пролиферация иммунокомпетентных клеток на фоне нарушения эндотелиальных коммуникаций являются ключевыми звеньями патогенеза пелиоза печени.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

## Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и в написании рукописи. Окончатель-

ная версия рукописи одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

### Литература

1. Гейвандова Н.И., Касторная И.В., Ягода А.В., Аксененко В.А., Гаврилова Л.Б., Гудзовская Т.В., Корой П.В. Случай пелиоза печени в результате длительного приема препарата «Аевит». *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2006; 16(3): 89-93.
2. DeLeve L.D. *Liver sinusoidal endothelial cells and liver injury. Drug-Induced Liver Disease*. Third Edit. Elsevier Inc. 2013; 135-46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387817-5.00008-X>
3. Iannaccone R., Federle M.P., Brancatelli G., Matsui O., Fishman E.K., Narra V.R., et al. 2006. Peliosis hepatis: Spectrum of imaging findings. *American Journal of Roentgenology*. 2006; 187(1): 43-52. <https://doi.org/10.2214/ajr.183.4.1831075>.
4. Логинов А.С., Аруин А.И. *Клиническая морфология печени*. М.: Медицина; 1984.
5. Tsokos M, Erbersdobler A. Pathology of peliosis. *Forensic Science International*. 2005; 149(1): 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.05.010>
6. Gulubova M. Immunohistochemical localization of collagen Type III and Type IV, laminin, tenascin and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) in the human liver in peliosis. *Pathology-Research and Practice*. 2002; 198(12): 803-12. <https://doi.org/10.1078/0344-0338-00339>.
7. Dai Y.N., Ren, Z.Z., Song, W.Y., Huang, H. J., Yang, D.H., Wang, M.S., Pan H.Y. Peliosis hepatis: 2 case reports of a rare liver disorder and its differential diagnosis. *Medicine*. 2017; 96(13): 3-6. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006471>.
8. Телегина И.В., Нежданов И.Г., Павлов Р.В., Аксененко В.А., Демьяшкин Г.А. Особенности репарации раны на матке после операции кесарева сечения. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2013; (2): 89-92.
9. Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002; 3(5): 349-63. <https://doi.org/10.1038/nrm809>.
10. Kushner E.J., Weil B.R., MacEaney O.J., Morgan R.G., Mestek M.L., Van Guilder G.P., et al. Human aging and CD31+ T-cell number, migration, apoptotic susceptibility, and telomere length. *Journal of applied physiology*. 2010; 109(6): 1756-61. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00601.2010>

### Сведения об авторах:

**Демьяшкин Григорий Александрович**, канд. мед. наук, гистолог-эмбриолог, врач-патологоанатом; доцент каф. патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: dr.dga@mail.ru;

**Цибулевский Александр Юрьевич**, доктор мед. наук, проф., каф. морфологии и патологии Московского медицинского университета «РЕАВИЗ» («РЕАбилитация, Врач И Здоровье»), e-mail: auts77@gmail.com;

**Максим Анатольевич Балька**, ординатор каф. патологической анатомии ВМА им. С. М. Кирова, e-mail: dr.balyka@gmail.com;

**Иванов Антон Николаевич**, студент лечебного факультета Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: anton-ivanov96@yandex.ru;

**Маммаев Рамазан Умаханович**, студент лечебного факультета Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: ramazan.mammaev@outlook.com

### References

1. Geyvandova N.I., Kastornaya I.V., Yagoda A.V., Aksyonenko V.A., Gavrilova L.B., Gudzovskaya T.V., Koroy P.V. Case of liver peliosis as a result of long-term intake of «Aevitum» preparation. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2006; 16(3): 89-93. (In Russian)
2. DeLeve L.D. *Liver sinusoidal endothelial cells and liver injury. Drug-Induced Liver Disease*. Third Edit. Elsevier Inc. 2013; 135-46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387817-5.00008-X>.
3. Iannaccone R., Federle M.P., Brancatelli G., Matsui O., Fishman E.K., Narra V.R., et al. 2006. Peliosis hepatis: Spectrum of imaging findings. *American Journal of Roentgenology*. 2006; 187(1): 43-52. <https://doi.org/10.2214/ajr.183.4.1831075>.
4. Loginov A.S., Aruin A.I. *Clinical morphology of the liver [Klinicheskaya morfologiya pecheni]*. Moscow; Meditsina. 1984. (In Russian)
5. Tsokos M, Erbersdobler A. Pathology of peliosis. *Forensic Science International*. 2005; 149(1): 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.05.010>.
6. Gulubova M. Immunohistochemical localization of collagen Type III and Type IV, laminin, tenascin and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) in the human liver in peliosis. *Pathology-Research and Practice*. 2002; 198(12): 803-12. <https://doi.org/10.1078/0344-0338-00339>.
7. Dai Y.N., Ren, Z.Z., Song, W.Y., Huang, H. J., Yang, D.H., Wang, M.S., Pan H.Y. Peliosis hepatis: 2 case reports of a rare liver disorder and its differential diagnosis. *Medicine*. 2017; 96(13): 3-6. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006471>.
8. Telegina I.V., Nezhdanov I.G., Pavlov R.V., Aksenenko V.A., Demmyashkin G.A. Features of wound repair on the uterus after cesarean section operation. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2013; (2): 89-92. (In Russian)
9. Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002; 3(5): 349-63. <https://doi.org/10.1038/nrm809>.
10. Kushner E.J., Weil B.R., MacEaney O.J., Morgan R.G., Mestek M.L., Van Guilder G.P., et al. Human aging and CD31+ T-cell number, migration, apoptotic susceptibility, and telomere length. *Journal of applied physiology*. 2010; 109(6): 1756-61. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00601.2010>

© Пальцын А.А., 2019

УДК 616-092

**Пальцын А.А.**

## Старость без болезней

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования

«Российская медицинская академия последипломного образования»,

123995, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1

Наиболее распространенные неинфекционные болезни современного мира: метаболический синдром, диабет 2-го типа, хронические респираторные заболевания, церебро- и сердечно-сосудистые болезни, болезнь Альцгеймера и другие деменции, депрессии, опухоли, саркопения, остеопороз имеют общий механизм нарушения гомеостаза — окислительный стресс. Другая, объединяющая эти болезни черта — пожилой и старческий возраст пациентов. Связываются эти характеристики снижением адаптивных способностей организма, развивающемся по мере увеличения числа прожитых лет. Связь, в принципе, неизбежная, но в конкретности поддающаяся, как всё живое, влиянию среды. В статье представлены некоторые наиболее известные приемы создания такой среды (образа жизни), которые могут исключить или отодвинуть (нередко на годы) начало болезней.

**Ключевые слова:** старение; физические нагрузки; образ жизни; диета; антиоксиданты; гормезис; окислительный стресс; долголетие.

**Для цитирования:** Пальцын А.А. Старость без болезней. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 123-131.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.123-131

**Для корреспонденции:** Пальцын Александр Александрович, lrrp@mail.ru

**Финансирование.** Работа не имеет финансовой поддержки.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 15.05.2018

**Paltsyn A.A.**

## AGEING WITHOUT DISEASES

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia;

Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russia

The most common noninfectious diseases of the modern world, including metabolic syndrome, type 2 diabetes, chronic respiratory diseases, cerebrovascular and cardiovascular diseases, Alzheimer's disease and other dementias, depression, tumors, sarcopenia, and osteoporosis, share a mechanism of homeostatic disorders, oxidative stress. Another common feature of these diseases is the old and senile age of patients. These characteristics are linked with impaired adaptability, which develops with older age. In principle, this combination is inevitable but the environment can influence it like all life. The article presents some of the most well-known techniques for creating such an environment (lifestyle) that could exclude or postpone (often for years) the onset of disease.

**Keywords:** aging; exercise; lifestyle; diet; antioxidants; hormesis; oxidative stress; longevity.

**For citation:** Paltsyn A.A. Ageing without diseases. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2019; 63(2): 123-131. (In Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.123-131

**For correspondence:** Paltsyn A.A., e-mail: lrrp@mail.ru

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

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

**Received** 15.05.2018

Разрешите доложить  
Коротко и просто,  
Я большой охотник жить  
Лет до девяноста.  
*А. Твардовский «Василий Теркин»*

Начинаю статью объяснением названия. Формально говоря, старость без болезней (СББ) также невозможна, как жизнь без смерти. Однако, я хочу названием в большей степени отразить цель усилий, нежели их результат. Стремление к абсолютной цели принесет пуск и не абсолютный, но существенный результат — увеличит продолжительность здоровья.

Возраст — главный фактор риска многих наиболее распространенных болезней человека. Это положение определяет актуальность медицинских усилий по обеспечению СББ. В аббревиатуре СББ имеется в виду комплекс заболеваний смертельных или значительно снижающих качество жизни. «Комплексное» направление не менее важно, чем профилактика и лечение конкретных болезней пожилого возраста. Одновременно предотвращать развитие многих весьма вероятных болезней крайне привлекательно. Но, реально ли это, можно ли и какими действиями этого добиться? Попытаюсь ответить на этот непростой вопрос, обсуждая только образ жизни и не касаясь медикаментозного лечения, как правило, специфического для каждой болезни. Рассмотрим некоторые данные экспериментов и клинических наблюдений.

Изменение образа жизни и успехи медицины увеличили среднюю продолжительность жизни [1] с 45 лет (в начале XX века) до 77 лет (в начале XXI века). Однако это увеличение продолжительности жизни не означает увеличения срока СББ. Распространение хронических болезней и улучшение их диагностики (большая выявляемость) снижают пафос роста долголетия в XX веке. Речь идет о таких заболеваниях как метаболический синдром, диабет 2-го типа, хронические респираторные заболевания, церебро- и кардиоваскулярные болезни, болезнь Альцгеймера и другого генеза деменции, депрессии, опухоли, саркопении, остеопороз. Считается, что в Англии доля больных мужчин с 1995 г. по 2006 г. увеличилась от 20 до 40% [2]. Очень вероятно, что общей причиной этих бед является известный факт возрастного снижения способности к адаптивному гомеостазу [3].

Клеточный гомеостаз находится под постоянным воздействием реактивных форм кислорода и азота (ROS и RNS). Они образуются эндогенно в процессе клеточного метаболизма или в результате действия экзогенных причин: лекарств, ксенобиотиков, радиации. Эндогенные ROS и RNS — это нормальные, абсолютно необходимые для жизни продукты обмена, регуляторы многих физиологических процессов и адаптивного ответа на патогенные факторы. В то же время ROS и RNS могут изменять макромолекулы: белки, липиды, сахара, ДНК и РНК. В зависимости от глубины повреждения окисленные макромолекулы репарируют-

ся или устраняются. При избыточной продукции ROS и RNS или недостаточности системы репарации/деградации развивается оксидативный стресс — главный фактор всех, перечисленных выше болезней старости, по современным понятиям. Получается, что наша жизнь и наша смерть обеспечиваются одним и тем же веществом — кислородом.

Это положение обязывает врача много знать, многое уметь и ещё больше думать. Повреждающий организм оксидативный стресс отличается от обеспечивающего жизнь дыхания всего лишь количественно. Поэтому главная задача в поддержании здоровья — избегать стрессовой ситуации: токсических концентраций ROS и RNS. Не забывать, в то же время, что без образования ROS и RNS жизнь невозможна. Сохранение жизни при постоянных и неизбежных изменениях её условий обеспечивается постоянными приспособлениями окислительно-восстановительных процессов к этим изменениям. Если изменение не превышает величины (порога), допускающей возврат к исходному состоянию — репарации или устранения всех окисленных макромолекул — гомеостаз сохраняется. Более того, появляется возможность восстанавливать гомеостаз даже при большем его нарушении, при образовании ROS и RNS в больших количествах. Так осуществляется важнейшая приспособительная реакция, называемая гормезисом. Однако всё живущее умирает, гормезис отодвигает момент, но не устраняет неизбежный факт возрастного накопления модифицированных макромолекул. Это выражается, в частности, в том, что замечательное свойство гормезиса, как и всё живое, подчиняется закону времени — снижается с возрастом. Дрозофилы успешно справляются с хронически повторяющимся окислительным стрессом, гормезис обеспечивает им удаление окисленных белков. Однако, такой стресс существенно сокращает продолжительность их жизни [4]. Возрастное снижение адаптивного гомеостаза характерно для живых существ от дрожжевой клетки до человека [3].

Является ли в такой ситуации увеличение прожитых лет неразрывно связанным с подверженностью болезням или возможно годы человеку оставить, а от болезней избавиться? Уже до углубления в медицинскую литературу по опыту жизни видится ответ — возможно. Рассмотрим некоторые пути к достижению этого привлекательного результата. Сегодня в качестве главной стратегии достижения СББ обсуждаются различные варианты создания гормезисного эффекта в тканевом дыхании.

Оказалось, что очень простым и даже экономически выгодным приемом — ограничением пищи (умеренным питанием) на 30-60% к *ad libitum*, можно увеличить срок жизни многих беспозвоночных: дрожжей,

нематод, насекомых. Это интересно, но далеко от здравоохранения. Однако принципиально такие же наблюдения были сделаны и на гораздо более близком к человеку объекте: грызунах. Сокращение рациона на 30 и 60%, начатое в молодом возрасте, вызывало соответствующее уровню питания (т.е. на 30 и 60%) увеличение срока жизни мышей [5]. Такой же режим питания у мышей с возраста 12 мес продлевал жизнь меньше, только от 10 до 20% [6]. Умирают мыши очень часто (в 70–80% случаев) от опухолей. Оказалось, что умеренное питание мышей ингибирует развитие спонтанных, а также химически и радиационно-индуцированных опухолей [7]. Умеренное питание предотвращало развитие диабета, аутоиммунных и респираторных заболеваний, развитие нейродегенерации (накопление  $\beta$ -амилоида), усиливало нейрогенез при экспериментальных болезнях Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и при инсульте [8]. Сокращение рациона на 30% у взрослых молодых макак-резусов увеличивало продолжительность их жизни [9].

В самой общей форме механизм благотворного действия умеренного питания на здоровье понятен и, по-видимому, играет свою роль во всем царстве животных, не исключая человека. Активность всех живых существ включается и усиливается голодом — энергетическим стрессом. Голод самый постоянный (в эволюции) стрессовый фактор. И соответственно вызывает антистрессовую реакцию, мобилизующую защитные силы организма. Стимулирует эффективные пути метаболизма и блокирует менее эффективные. Усиливает биогенез митохондрий и экспрессию в них антиоксидантов [10]. Такие события не только устраняют последствия стресса, но и повышают по принципу гормезиса стрессоустойчивость. Поскольку адаптивный ответ развивается в митохондриях, его называют митогормезисом [11].

Сегодня имеется большое число свидетельств, положительного влияния умеренного питания на здоровье человека. Оправдываются приписываемые Гиппократу слова: «есть больному — кормить болезнь». Так при метаболическом синдроме голодание через день в течение 2 мес снижало сердечный ритм в покое и такие показатели риска сердечно-сосудистых заболеваний, как содержание в крови глюкозы, инсулина и гомоцистеина [12].

Сотрудники университета Юта (M. Lefevre и др.) исследовали липидный обмен и кровяное давление у здоровых с нормальным ИМТ (индекс массы тела) мужчин и женщин после сокращения калорийности пищи на 25% в течение 6 мес. Обнаружили снижение массы тела и уменьшение на 29% десятилетнего риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [13].

Проведенное позже исследование действия 25% сокращения калорийности пищи, но осуществлявшееся в течение 2 лет, по сути, подтвердило данные M. Lefevre с сотрудниками, добавив к благоприятным эффектам умеренного питания существенные снижение содержания TNF $\alpha$  [14].

Исследования любых влияний на продолжительность жизни человека осложняются многими обстоятельствами. Одно из них — величина этой продолжительности, могущая заметно превзойти срок жизни исследователя. Конечно, трудной задачей является и строгость многолетнего соблюдения обследуемыми условий эксперимента. Тем не менее, в нашей теме имеется результат наблюдения L. Fontana с сотрудниками [15], показавшими, что умеренное питание в течение 3—15 лет, даже, если не продлевает жизнь, то существенно снижает возможность атеросклероза сократить срок жизни. В тестовой и контрольной группах этого исследования было по 18 участников в возрасте 35–82 года, средний возраст  $50 \pm 10$  лет. Рацион тестовой группы содержал все незаменимые продукты с энергоемкостью 1112—1958 ккал/день. Широкий набор овощей, фруктов, орехов, молочных продуктов, яиц, белки пшеницы и сои, мясо ( $\approx 26\%$  кал за счет белка,  $\approx 28\%$  кал за счет жиров, и  $\approx 46\%$  кал за счет углеводов). Исключались трансжиры и высоко гликемические продукты. Почти в 2 раза более калорийной (1976—3537 ккал/день) была типичная американская диета в группе контроля ( $\approx 18\%$  кал за счет белка,  $\approx 32\%$  кал за счет жира и  $\approx 50\%$  кал за счет углеводов). Через 6 лет такого пищевого режима обнаружены следующие различия групп. Индекс массы тела в группе с умеренным питанием  $19.6 \pm 1.9$  кг/м<sup>2</sup>; в контроле  $25.9 \pm 3.2$  кг/м<sup>2</sup>. Содержание жира (по данным двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии) в группе умеренного питания  $8.7 \pm 7\%$ ; в контроле  $24 \pm 8\%$ . В группе умеренного питания, существенно ниже было содержание в сыворотке крови холестерина, липопротеина низкой плотности, инсулина, глюкозы, C-реактивного белка, PDGF, систолическое и диастолическое давление, а содержание липопротеина высокой плотности выше, чем в контроле. Толщина комплекса интима-медиа по данным УЗИ в группе умеренного питания также была на 40% меньше. Вывод этого исследования: *многoletнее умеренное питание заметно подавляет проявление признаков атеросклероза.*

Не удивительно, что интересные и оптимистические результаты этой работы вызвали многочисленные отклики (более 200 цитирований) и стимулировали проверочные исследования. Результаты их, в общем, подтверждая основной вывод работы L. Fontana с сотрудниками, выявили важную и неприятную особен-

ность продолжительного ограниченного питания — снижение минеральной плотности костной ткани, даже у сравнительно молодых людей. Так в многоцентровом исследовании D. Villareal с сотрудниками и с участием L. Fontana [16] у людей в возрасте  $37.9 \pm 7.2$  года обнаружили по данным двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии снижение плотности кости в пояснице, бедре и шейке бедра — типичных местах остеопорозных переломов.

Уменьшение массы костной ткани у ожиревших пожилых людей в результате курса умеренного питания было многократно описано. Оно происходило даже при его сочетании с физическими нагрузками [17]. У молодых и среднего возраста ожиревших людей снижение умеренным питанием массы тела не сопровождалось снижением прочности костной ткани [18]. Сегодня большей подверженности утрате костной ткани при умеренном питании молодых и среднего возраста людей с нормальным ИМТ сравнительно с толстыми сверстниками предлагается следующее объяснение [16]. Жир и кость связаны множеством метаболических механизмов, обеспечивающих скелету возможность нести образовавшуюся на нем массу жировой ткани. Вероятные медиаторы этой связи: адипонектин, инсулин, амилин, лептин, эстроген адипоцитов. Клинический аспект такой связи выражается в том, что ожирение — защита от остеопороза, а худощавость — предотвратимый риск переломов [19]. Есть в обсуждаемом вопросе ещё и такой момент. При сравнительных исследованиях влияния умеренного питания на людей нормального телосложения и ожиревших обращается внимание только на различие ИМТ. Но между такими группами есть ещё существенное различие. Группа ожиревших — это люди, выполняющие в ходе исследования бóльшую физическую нагрузку, чем группа с нормальным ИМТ, у первых бóльшая абсолютная масса мышц. А поскольку мышцы подобно железам внутренней секреции выделяют в кровь большое количество миокинов, у них лучше сохраняется костная ткань (у толстяков железа-мышца больше по величине и больше нагружена). И это может быть не единственным «сюрпризом» подобных сравнений.

Как отмечалось ранее [17] у старых людей с избыточной массой тела умеренное питание снижает прочность костной ткани, но и такая ситуация может быть исправлена остеопротективным действием физических нагрузок [20].

Заявленное в начале статьи утверждение, что умеренное питание, будучи повреждающим фактором, продлевает жизнь по механизму гормезиса, в настоящее время получило ряд доказательств из области молекулярно-клеточных взаимодействий. Было обнару-

жено, что у мышей продление срока жизни при ограничении питания сочетается с замедленной сравнительно с контролем «эрозией» теломер, [21]. Есть данные, свидетельствующие о благоприятном для продолжительности жизни действии гормезиса умеренного питания и на эпигенетическом уровне. Вряд ли ошибусь, сочтя наиболее интересными и действенными процессы, совершающиеся в митохондриях. Обязательными условиями СББ является сохранение достаточно высокого уровня биогенеза митохондрий, оптимального уровня обмена в них белка и оптимального уровня апоптоза. Режим ограничения питания благоприятен для сохранения высокой оксидативной способности при низком уровне оксидативного повреждения. У старых животных при ограничении питания в сравнении с питающимися *ad libitum*, активируется транскрипционный фактор PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ), что усиливает биогенез митохондрий, улучшает утилизацию субстратов: углеводов, жирных кислот [22]. Увеличение числа митохондрий в гепатоцитах крыс при умеренном питании доказано в электронно-микроскопических исследованиях [23]. Я не пересказываю сведения об известных в настоящее время путях усиления или торможения активности ключевого регулятора биогенеза и функции митохондрий транскрипционного фактора PGC-1 $\alpha$ . Для нашей темы главный интерес представляет отчетливо обозначившаяся возможность умеренного питания через антиоксидантную роль PGC-1 $\alpha$  заметно ослаблять действие факторов риска возрастных болезней.

Профилактическое и лечебное действие умеренного питания доказывает, что самые распространенные неинфекционные болезни современного человечества — это, в значительной мере, расплата за жадность и за эксплуатацию других людей. Собственным трудом человек не склонен добывать и, соответственно, поглощать *избыточное* количество пищи — нет стимула-голода для этого нелегкого труда.

Имеется много сообщений о профилактике возрастных болезней физическими нагрузками [24]. Пишут, что умеренное питание способствует увеличению продолжительности жизни, а нагрузки в большей степени увеличивают срок старости без болезней [24]. Но, конечно, эти эффекты трудно разграничить, особенно у человека. Важно, что и одно и другое способствуют здоровью.

Главный механизм положительного влияния нагрузок на здоровье — оксидативный стресс в гормезисной дозе. В окислительно-восстановительных процессах, соответственно их интенсивности, можно наблюдать морфологические изменения митохондрий:

перемещения, особенно значительные в такой крупной клетке, как мышечное волокно, деления и слияния. Функция, структура и перемещения митохондрий регулируются ROS/RNS. Повторяющиеся нагрузки (т.е. периодические увеличения концентраций ROS/RNS) вызывают, выявляемую электронно-микроскопическим исследованием, гиперплазию митохондрий и оптимизацию путей окисления-восстановления [25, 26]. Морфология митохондрий определяется балансом слияний-делений [27]. Когда равновесие нарушается, митохондрии становятся фрагментированными – (несбалансированное деление) или длинными (несбалансированное слияние).

При умеренном питании и нагрузках гормезисной интенсивности включается так называемый стресс-индуцированный ответ митохондриальных гипер-слияний «Stress-Induced Mitochondrial Hyperfusion response» (SIMH). SIMH считается благоприятным ответом, связанным с увеличением продукции АТФ. При умеренном стрессе, слияния перестраивают и увеличивают митохондриальную сеть, повышают эффективность окислительного фосфорилирования и “простым” увеличением объема защищают митохондрии от деградации в аутофагосомах. При тяжелых повреждениях митохондрии, напротив, в результате делений изолируются от митохондриальной сети и это способствует их устранению митофагией [28].

Для современного человечества важным моментом в обсуждаемой проблеме является следующее обстоятельство: для многих, стремящихся к старости без болезней людей, умеренное питание не обуславливается финансовыми ограничениями, но предпринимается с лечебно-профилактической целью, что в условиях доступности пищи, требует волевых усилий, и удается не всем. Другой путь — режим постоянных физических нагрузок достаточной интенсивности — не всегда удается обеспечить даже в молодом возрасте. У пожилых людей эта задача становится ещё труднее. Такое положение повышает актуальность фармакологических путей в решении проблемы. Стимулирует интерес медицины к препаратам заменителям или имитаторам умеренного питания и физических нагрузок. Конечно аптечные и пищевые средства, нацеленные на СББ, не лишены интереса и для людей, испытывающих физические нагрузки и достаточно волевых для соблюдения режима ограничения питания. Здоровья много не бывает.

Формулой: главное зло — оксидативный стресс, подсказывается стратегия защиты: антиоксиданты. Они представляются и используются как самостоятельно действующие факторы долголетия и как дополнение к умеренному питанию и физическим нагрузкам.

Эта стратегия не изобретение человека. Она природное явление и обеспечивается в каждой клетке антиоксидантными ферментами, наиболее популярные из них: супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидазы. Эмпирически обнаруженное лекарственное и укрепляющее здоровье свойство многих веществ и пищевых продуктов, при дальнейшем исследовании оказалось обусловленным их антиоксидантной способностью. Однако современное изобилие антиоксидантов на аптечном и продовольственном рынках не избавляет врача от трудности организации программы старости без болезней. Трудность в том, что благотворное действие образа жизни осуществляется по принципу гормезиса — баланса оксидантных и антиоксидантных эффектов. Поскольку точный учет того и другого невозможен от врача требуется много знаний для приблизительного определения стратегии и таланта для окончательного решения.

Для фактического подтверждения сказанного ссылаюсь на одно из многочисленных исследований обсуждаемого вопроса [29]. Изучали совместное действие нагрузок и антиоксидантов. Две группы молодых здоровых мужчин: первая предварительно не тренированные ( $n = 19$ ), вторая - тренированные ( $n = 20$ ) прошли месячный курс тренировок. Тренировки увеличили чувствительность к инсулину в обеих группах. Увеличилась экспрессия транскрипционных регуляторов антиоксидантной защиты, в частности PGC1 $\alpha$ . Активировались молекулярные медиаторы эндогенной ROS защиты: супероксиддисмутаза и глутатион пероксидаза. Однако, все эти эффекты стресс-устойчивости не возникали, если одновременно с нагрузками участники исследования принимали антиоксиданты: витамины С и Е. Иными словами вмешательство аптечных антиоксидантов не позволяло стрессу нагрузок достигнуть достаточной для благоприятного эффекта величины — гормезиса. У человека несколько значительных, долговременных, рандомизированных клинических исследований с витаминными антиоксидантами не обнаружили снижения сердечно-сосудистой и опухолевой морбидности/мортальности [30].

Эти исследования, доказывают, что ROS и RNS могут быть факторами, как пользы, так и вреда. Способствовать как сохранению здоровья так и развитию болезни. Всё определяется концентрацией. Для разумной рекомендации образа жизни, нацеленного на СББ с использованием умеренного питания, физических нагрузок, пищевых антиоксидантов необходимо учитывать принципиальную возможность навредить благотворными, в других ситуациях, антиоксидантами. Обеспечить гармонию оксидантов — антиоксидантов по аптечным инструкциям невозможно. В таких реко-

мендациях обязательно должны учитываться индивидуальные особенности кислородного обмена (редокс-статус) человека. Сказанное можно подтвердить исследованием [31]. У 19 испытуемых (10 мужчин) определяли окислительно-восстановительные маркеры сыворотки и эритроцитов перед физической нагрузкой, непосредственно после неё и в дальнейшем через 24, 48 и 72 ч. У 11 участников исследования обнаружено значительное увеличение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) после нагрузки, у остальных 8 – высокая степень уменьшения. Только в группе с снижением ОВП отмечена существенная активация перекисного окисления липидов, указывающая на оксидативный стресс. Следует, однако, отметить, что непосредственное измерение окислительно-восстановительного потенциала пока остается методом с невысоким уровнем надежности в связи с резкими колебаниями показателей у одного человека в разные дни [32].

Большим числом экспериментов и клинических исследований было обнаружено, что введениями антибиотика рапамицина можно продлить жизнь мышей, отодвинуть у мышей и людей сроки появления ряда «возрастных» патологических процессов: когнитивной недостаточности, болезни Альцгеймера, рака, почечных, сердечных и аутоиммунных заболеваний. Благоприятное действие рапамицина объясняют его ингибирующим действием на группу белков, регулирующих, главным образом отрицательно, клеточный рост и пролиферацию. Белки, соответственно, называются мишень рапамицина у млекопитающих (mammalian target of rapamycin — mTOR). Относительно действия рапамицина на иммунитет и диабет 2-го типа есть благоприятные и отрицательные сообщения [33]. Наиболее обсуждаемое побочное действие рапамицина – развитие инсулинорезистентности может быть компенсировано популярным антидиабетическим средством – метформином. Он гармонирует с задачами долгожительства, обеспечив принявшим его 78 241 диабетикам большую продолжительность жизни, чем у 90 463 сравниваемых с ними людей, не больных диабетом [34].

Способность NAD-зависимых белков сиртуинов регулировать экспрессию генов и устранять повреждения ДНК стимулировала попытки повлиять сиртуинами на продолжительность жизни. Попытки дали положительный результат в экспериментах на дрожжах, нематодах и дрозофилах. Много оптимистичных наблюдений было сделано и на млекопитающих. Действуя как регуляторы транскрипции, сиртуины благоприятно влияли на энергетический обмен, выживаемость клеток, репарацию ДНК, регенерацию тканей,

воспаление, противоопухолевую резистентность, нейрональные связи и даже циркадные ритмы. Поэтому предполагается благоприятное влияние сиртуинов на патогенез многих болезней, включая метаболический синдром, нейродегенеративные болезни, воспалительный ответ, болезни кровообращения, новообразования и другие возрастные патологии. Активация сиртуинов может способствовать СББ и даже увеличению продолжительности жизни [35, 36]. Локализуются сиртуины в ядре, цитозоле и митохондриях. В списке подвластных им целей есть такие важные для здоровья факторы как p53, PGC1 $\alpha$  и NF- $\kappa$ B (ядерный фактор «каппа-би»). Поэтому весьма привлекательным представляется умение регулировать активность сиртуинов.

Наиболее известным активатором сиртуинов является ресвератрол [36]. Через сиртуины он увеличивает экспрессию нескольких антиоксидантных ферментов (гем-оксигеназы-1, каталазы, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы). В то же время ресвератрол и непосредственно обладает антиоксидантным действием, устраняя ROS и RNS [37]. Другие достоинства ресвератрола: распространенность, отсутствие токсичности, невысокая цена. Действие через сиртуины доказывается тем, что у нокаутных по Sirt1 мышей прием ресвератрола не обеспечивает продление жизни и другие эффекты умеренного питания. В исследовании большой группы ученых (27 авторов из США, Австралии, Испании) мыши, питавшиеся *ad libitum*, но получавшие ресвератрол со среднего возраста (12 мес) отличались заметным уменьшением многих проявлений старости: альбуминурии, воспалений, апоптоза эндотелиоцитов, образования катаракт, снижения эластичности аорты, координации движений, плотности костной ткани. Однако, продолжительность жизни этих животных не превысила контроль – питание *ad libitum* без ресвератрола [38]. Есть много сообщений о подобном УП действии ресвератрола в клинике при диабете, сердечно-сосудистых заболеваниях, болезни Альцгеймера [36, 39]. Сходным по структуре с ресвератролом флавоноидом, посвящено много сообщений об их благотворных эффектах на здоровье. В частности о способности уменьшать жесткость артерий со снижением АД [40], о более легком течении экспериментального метаболического синдрома [41].

Не меньший интерес для нашей темы, чем роль отдельных пищевых факторов, представляет влияние на здоровье той или иной диеты в целом. Из огромного числа публикаций на эту тему привожу результаты мета-анализа литературы с января 1999 г. по июнь 2014 г. Авторы включили в анализ 17 рандомизированных исследований трех оздоровительных диет, в том числе средиземноморской. Диеты характеризовались высо-

ким содержанием фруктов, овощей, цельных зерен, семян, бобовых, орехов, рыбы, молочных продуктов и низким содержанием мяса, сладостей и алкоголя. Такие диеты по выводам авторов заметно снижали АД: систолическое на 4,26 мм, диастолическое на 2,38 мм [42].

По данным рандомизированных многоцентровых исследований с 652 участниками поглощение орехов и арахиса в течение 3х недель или больше существенно улучшает (по результатам УЗИ) поток-опосредованную дилатацию кровеносных сосудов, т.е. улучшает производство сосудистой стенкой оксида азота — NO [43]. Снижение активности NO как основного вазодилатора сосудистой стенки является одним из самых ранних маркеров атеросклероза. Возрастная эндотелиальная дисфункция уменьшает биодоступность NO.

Эволюционная обусловленность связи питание-здоровье проявляется не только в значении количества и состава пищи, но и в роли такого фактора, как время приема пищи. Временной параметр в приеме пищи имеет существенное значение, поскольку он древнее, закрепленное эволюцией приспособление наших предков к еде днем и голоданию ночью. Цивилизация придумала искусственное освещение. Для большей части современных землян заход солнца не обеспечивает наступления темноты. Уже это способствует распространению всего комплекса болезней, связанных с избыточным весом (метаболический синдром, диабет, атеросклероз, сердечнососудистые и цереброваскулярные болезни, рак, нейродегенеративные болезни). Ещё более грубое вмешательство в циркадные ритмы, нежели удлинённый световой период, произошло путем большого распространения ночных смен в разных сферах современного индустриального и постиндустриального общества. Распространенное и быстро нарастающее в распространенности цивилизационное нарушение циркадных ритмов — фактор полета (jetlag). В особо грубой форме он действует на экипажи и пассажиров самолетов. Слабее, но зато постояннее, действует, так называемый «социальный фактор полета» (social jetlag) в форме несоответствия времени сна эндогенным ритмам человека («совы» — «жаворонки») и в форме разницы длительности будничного и воскресного сна. Есть сообщение, что различие воскресного и будничного сна, по крайней мере, на 1 ч распространено на 87% жителей северной Европы [44].

Опубликовано несколько исследований о повышении риска развития рака молочной железы у работающих в ночные смены женщин [45]. Влияние на здоровье периода суток, выбранного для приема пищи показано исследованием [46]. Группу тучных женщин (ИМТ —  $32.4 \pm 1.8$  кг/м<sup>2</sup>) делили на 2 выборки, кото-

рые отличались только временем приема половинной по калорийности порции суточной еды: в завтрак или в обед. Все участницы исследования получали 1400 ккал/сут. У всех уменьшились вес, окружность талии, содержание натошак глюкозы, инсулина, грелина. Однако в подгруппе с большим завтраком снижение веса, окружности талии, глюкозы и инсулина было выражено значительно сильнее.

Сказанное выше обозначает важность достижения максимально возможного соответствия временного режима жизни вообще и, в частности, времени сна циркадным ритмам. Для проблемы СББ важно, что цивилизация не только нарушает циркадные ритмы, но и открывает способы коррекции таких нарушений. Первейший инструмент коррекции — понимание сущности этих нарушений. Понимание позволяет вносить целесообразные организационные изменения во временной режим работы, еды, отдыха. Есть и лекарственные способы гармонизации образа жизни с циркадными ритмами. Не удивительно, что в таком подходе первое место занимает естественный, природный регулятор циркадных ритмов — мелатонин [47]. Терапевтический потенциал мелатонина пока ещё в стадии предварительного исследования, но уже есть свидетельства его эффективности в интересующей нас области патологии. В рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании прием мелатонина (1-3 мг/день) в течение 1 года женщинами в постменопаузе привел к достоверному уменьшению массы жира и увеличению массы мышц [48]. При приеме 2 мг мелатонина в течение 5 мес больными диабетом 2-го типа и с нарушениями сна, обнаружили достоверное снижение уровня гликированного гемоглобина и улучшение сна [49].

Патогенность нарушений циркадных ритмов может быть снижена и совсем не медицинскими приемами: заменой коротковолнового освещения — голубого, зеленого на длинноволновое — желтое, красное [50].

Много рекомендаций и даже есть президентские призывы к населению (США) снижать АД уменьшением потребления соли. [51]. Ограниченное потребление соли уменьшало как жесткость артерий так и АД [40]. В то же время оказывается, что этот вездесущий, простой по структуре и тысячи лет, потребляемый всем человечеством пищевой продукт, мало изучен, в его влиянии на здоровье больше вопросов, чем ответов. Его недостаток в организме также ведет к повышенной смертности, как и избыток. Скорее всего, при нормальной функции почек не стоит увлекаться низко солевой диетой [52, 53].

Попытка беспристрастного рассмотрения современной литературы с задачей определить, возможно

ли исключить или задержать «приход» наиболее распространенных сегодня болезней старости позволяет сделать разумно-оптимистическое резюме. СББ явление временное, но достижимое. Продолжительность его зависит от состояния человека на старте усилий и упорства в стремлении к цели. Важно, что результат может выражаться годами. А поскольку результат означает *жизнь* — он стоит усилий!

### Литература (п.п. 1-40, 42-46; 48-53 см. References)

41. Шрамко Ю.И., Кубышкин А.В., Давыдова А.А., Фомочкина И.И., Алиев Л.Л., Чегодарь Д.В. Коррекция морфофункциональных нарушений в экспериментальном метаболическом синдроме у крыс полифенолами винограда. *Патогенез*, 2017; 4: 43-8.
47. Арушанян Э.Б., Шетинин Е.В. Мелатонин как универсальный модулятор любых патологических процессов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 1: 79-88.

### Литература

1. Omodei D., Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett.* 2011; 585: 1537–42.
2. Bonkowski M.S., Sinclair D.A. Slowing ageing by design: the rise of NAD<sup>+</sup> and sirtuin-activating compounds. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016; Nov; 17(11): 679-90.
3. Pomatto L.C., Davies K.J. The role of declining adaptive homeostasis in ageing. *J Physiol.* 2017; Dec 15; 595(24): 7275-309.
4. Pickering A.M., Vojtovich L., Tower J., Davies K.J. Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repeated stress. *Free Radical Biology and Medicine.* 2013; 55: 109-18.
5. Masoro E.J. Over view of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 2005; 126: 913–22.
6. Weindruch R., Walford R.L. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life span and spontaneous cancer incidence. *Science.* 1982; 215: 1415–8.
7. Longo V.D., Fontana L. Calorie restriction and cancer: metabolic and molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2010; 31: 89–98.
8. Omodei D., Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett.* 2011; Jun 6; 585(11): 1537-42.
9. Colman R., Beasley T., Kemnitz J.W., Johnson S.C., Weindruch R., Anderson R. M. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun.* 2014; Apr 1; 5: 3557.
10. Picca A., Pesce V., Lezza A. Does eating less make you live longer and better? An update on calorie restriction. *Clin Interv Aging.* 2017; Nov 8; 12: 1887-902.
11. Ristow M., Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011; Jul 15; 51(2): 327-36.
12. Mattson M.P., Longo V.D., Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev.* 2017; Oct; 39: 46-58.
13. Lefevre M., Redman L.M., Heilbronn L.K., Smith J.V., Martin C.K., Rood J.C. et al. Caloric restriction alone and with exercise improves CVD risk in healthy non-obese individuals. *Atherosclerosis.* 2009; Mar; 203(1): 206-13.
14. Ravussin E., Redman L., Rochon J., Das S., Fontana L., Kraus W et al. A 2-Year Randomized Controlled Trial of Human Caloric Restriction: Feasibility and Effects on Predictors of Health Span and Longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015; Sep; 70(9): 1097–104.
15. Fontana L., Meyer T.E., Klein S., Holloszy J.O. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Apr 27; 101(17): 6659-63.
16. Villareal D.T., Fontana L., Das S.K., Redman L., Smith S.R., Saltzman E. et al. Effect of Two-Year Caloric Restriction on Bone Metabolism and Bone Mineral Density in Non-obese Younger Adults: a Randomized Clinical Trial. *J Bone Miner Res.* 2016; Jan; 31(1): 40–51.
17. Villareal D.T., Shah K., Banks M.R., Sinacore D.R., Klein S. Effect of weight loss and exercise therapy on bone metabolism and mass in obese older adults: a one-year randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 2181–7.
18. Uusi-Rasi K., Rauhio A., Kannus P., Pasanen M., Kukkonen-Harjula K., Fogelholm M. et al. Three-month weight reduction does not compromise bone strength in obese premenopausal women. *Bone.* 2010; May; 46(5): 1286-93.
19. Reid I.R. Fat and bone. *Arch Biochem Biophys.* 2010; Nov 1; 503(1): 20-7.
20. Armamento-Villareal R., Sadler C., Napoli N., Shah K., Chode S., Sinacore D.R. et al. Weight loss in obese older adults increases serum sclerostin and impairs hip geometry but both are prevented by exercise training. *J Bone Miner Res.* 2012; May; 27(5): 1215-21.
21. Vera E., Bernardes de Jesus B., Foronda M., Flores J.M., Blasco M.A. Telomerase reverse transcriptase synergizes with calorie restriction to increase health span and extend mouse longevity. *PLoS One.* 2013; 8(1): e53760.
22. Martin-Montalvo A., de Cabo R. Mitochondrial metabolic reprogramming induced by calorie restriction. *Antioxid Redox Signal.* 2013; Jul 20; 19(3): 310–20.
23. Lopez-Lluch G., Hunt N., Jones B., Zhu M., Jamieson H., Hilmner S. et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 1768–73.
24. Mercken E.M., Carboneau B.A., Krzysik-Walker S.M., deCabo R. Of mice and men: the benefits of caloric restriction, exercise, and mimetics. *Ageing Res Rev.* 2012; 11: 390–8.
25. Trewin A.J., Berry B.J., Wojtovich A.P. Exercise and Mitochondrial Dynamics: Keeping in Shape with ROS and AMPK. *Antioxidants (Basel).* 2018; Jan; 7(1): 7.
26. Zemirli N., Morel E., Molino D. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. *Int J Mol Sci.* 2018; Feb; 19(2): 564.
27. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; Dec; 11(12): 872-84.
28. Suarez-Rivero J.M., Villanueva-Paz M., de la Cruz-Ojeda P., de la Mata M., Cotan D., Oropesa-Avila M. et al. Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases.* 2017; 5: 1.
29. Ristow M., Zarse K., Oberbach A., Klötting N., Birringer M., Kiehntopf M. et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 2009; 106: 8665-70.
30. Sesso H.D., Buring J.E., Christen W.G., Kurth T., Belanger C., MacFadyen J. et al. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA.* 2008; 300: 2123–33.
31. Stagos D., Goutzourelas N., Ntontou A.M., Kafantaris I., Deli C.K., Poullos A. et al. Assessment of Eccentric Exercise-Induced Oxidative Stress Using Oxidation-Reduction Potential Markers. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: 204615.

32. Argüelles S., Gómez A., Machado A., Ayala A. A preliminary analysis of within-subject variation in human serum oxidative stress parameters as a function of time, *Rejuvenation Research*. 2007; 10(4): 621–36.
33. Johnson S.C., Rabinovitch P.S., Kaerberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*. 2013; 493: 338–45.
34. Bannister C.A., Holden S.E., Jenkins-Jones S., Morgan C.L., Halcox J.P., Scherthner G, et al. Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2014; 16: 1165–73.
35. Wałroba M., Szukiewicz D. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv Med Sci*. 2016; Mar; 61(1): 52–62.
36. Bonkowski M.S., Sinclair D.A. Slowing ageing by design: the rise of NAD<sup>+</sup> and sirtuin-activating compounds. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016; Nov; 17(11): 679–90.
37. Truong V.L., Jun M., Jeong W.S. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*. 2018; Jan; 44(1): 36–49.
38. Pearson K.J., Baur J.A., Lewis K.N., Peshkin L., Price N.L., Labinskyy N, et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab*. 2008; 8(2): 157–68.
39. Barger J.L., Kayo T., Pugh T.D., Prolla T.A., Weindruch R. Short-term consumption of a resveratrol-containing nutraceutical mixture mimics gene expression of long-term caloric restriction in mouse heart. *Exp Gerontol* 2008; 43(9): 859–66.
40. Nowak K.L., Rossmann M.J., Chonchol M., Seals D.R. Strategies for Achieving Healthy Vascular Aging. *Hypertension*. 2018; Mar; 71(3): 389–402.
41. Shramko Yu.I., Kubyshkin A.V., Davydova A.A., Fomochkina I.I., Aliev L.L., Chegodar' D.V. Correction of morphofunctional disorders in experimental metabolic syndrome in rats with grape polyphenols. *Patogenez*. 2017; 4: 43–8.
42. Ndanuko R.N., Tapsell L.C., Charlton K.E., Neale E.P., Batterham M.J. Dietary Patterns and Blood Pressure in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Adv Nutr*. 2016; Jan 15; 7(1): 76–89.
43. Neale E.P., Tapsell L.C., Guan V., Batterham M.J. The effect of nut consumption on markers of inflammation and endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*. 2017; 7(11): e016863.
44. Potter G.D., Skene D.J., Arendt J., Cade J.E., Grant P.J., Hardie L.J. Circadian Rhythm and Sleep Disruption: Causes, Metabolic Consequences, and Countermeasures. *Endocr Rev*. 2016; Dec; 37(6): 584–608.
45. Stevens R.G., Brainard G.C., Blask D.E., Lockley S.W., Motta M.E. Breast cancer and circadian disruption from electric lighting in the modern world. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64(3): 207–18.
46. Jakubowicz D., Barnea M., Wainstein J., Froy O. High caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women. *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21(12): 2504–12.
47. Arushanyan E.B., Shchetinin E.V. Melatonin as a universal modulator of any pathological processes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2016; 1: 79–88.
48. Amstrup A.K., Sikjaer T., Pedersen S.B., Heickendorff L., Mosekilde L., Rejnmark L. Reduced fat mass and increased lean mass in response to 1 year of melatonin treatment in postmenopausal women: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016; 84(3): 342–7.
49. Garfinkel D., Zorin M., Wainstein J., Matas Z., Laudon M., Zisapel N. Efficacy and safety of prolonged-release melatonin in insomnia patients with diabetes: a randomized, double-blind, crossover study. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2011; 4: 307–13.
50. Gringras P., Middleton B., Skene D.J., Revell V. Bigger, Brighter, Bluer-Better? Current Light-Emitting Devices - Adverse Sleep Properties and Preventative Strategies. *Front Public Health*. 2015; Oct 13; 3: 233.
51. Appel L.J., Frohlich E.D., Hall J.E., Pearson T.A., Sacco R.L., Seals D.R, et al. The importance of population-wide sodium reduction as a means to prevent cardiovascular disease and stroke: a call to action from the American Heart Association. *Circulation*. 2011; Mar 15; 123(10): 1138–43.
52. Cohen J.B., Townsend R.R. To restrict or not to restrict? The enigma of sodium intake and mortality. *Am J Kidney Dis*. 2015; Jan; 65(1): 9–11.
53. Drake-Holland A.J., Noble M.I. The Hyponatremia Epidemic: A Frontier Too Far? *Front Cardiovasc Med*. 2016; Oct 7; 3: 35.

**Сведения об авторах:**

**Пальцын Александр Александрович**, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО, лауреат Государственной премии СССР.

Хасанов Р.Р.<sup>1,2</sup>, Гумеров А. А.<sup>1</sup>, Шефер К.Х.<sup>3</sup>, Вессель Л.М.<sup>2</sup>

## Способ выращивания культуры клеток нервной системы кишечника пригодной для тканевой инженерии кишечника

<sup>1</sup>Кафедра детской хирургии с курсом ИДПО, Башкирский государственный медицинский университет, 450015, г. Уфа, Россия ул. Ленина, д. 3;

<sup>2</sup>Клиника детской хирургии, университетская клиника Маннгейм, Университет Гейдельберг, Германия, Germany 68167 Mannheim Theodor-Kutzer-Ufer 1-3;

<sup>3</sup>Университет прикладных наук Кайзерслаутерн, Германия, Germany 66482 Zweibrücken Amerikastrasse 1

Лечение синдрома короткой кишки является сложной проблемой в современной медицине. У ряда пациентов существующие методы лечения неэффективны, а трансплантация кишечника показывает неудовлетворительные результаты. Тканевая инженерия тонкой кишки может быть инновационным методом лечения этих пациентов. Одним из ключевых элементов в создании кишки является выращивание нервной системы кишечника. До настоящего времени не описаны культуры нервных клеток, выделенных из нервной системы кишечника, выращенные в трёхмерном матриксе на основе гиалуроновой кислоты.

**Цель исследования:** разработать метод выращивания *in vitro* взаимодействующих друг с другом клеток нервной системы кишечника в трехмерной среде.

**Методы:** клетки нервной системы кишечника выделялись из кишечника крыс путём препарирования и ферментативного воздействия на мышечный слой тонкой кишки. Далее клетки помещались в трёхмерный матрикс и культивировались в нём в течении нескольких дней.

**Результаты.** Клетки нервной системы кишечника были выделены из крыс и культивировались в трёхмерном матриксе, помещённом в раствор для культур клеток с добавлением специфических факторов роста. Микроскопирование культур клеток на восьмые сутки показало, что нервные клетки активно растут, соединяясь с другими нервными клетками при помощи отростков. Конфокальная микроскопия в сочетании с иммуногистохимическим окрашиванием клеток специфичным маркером нервных клеток показала, что полученные культуры действительно состоят из нервных клеток.

**Заключение.** Разработанный метод позволяет вырастить *in vitro* живущие и взаимодействующие друг с другом клетки нервной системы кишечника в трехмерной среде. Полученная культура клеток может быть использована для моделирования стенки тонкой кишки путем тканевой инженерии.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия; нервная система кишечника; энтеральная нервная система; синдром короткой кишки; нейрон.

**Для цитирования:** Хасанов Р.Р., Гумеров А.А., Шефер К.Х., Вессель Л.М. Способ выращивания культуры клеток нервной системы кишечника пригодной для тканевой инженерии кишечника. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(2): 132-141.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.132-141

**Для корреспонденции:** Гумеров Аитбай Ахметович, Республиканская детская клиническая больница, e-mail: pedsurg@bk.ru

**Финансирование.** Работа не имеет финансовой поддержки.

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

**Поступила** 21.02.2019

Khasanov R.R.<sup>1,2</sup>, Gumerov A.A.<sup>1</sup>, Schaefer K.H.<sup>2</sup>, Wessel L.M.<sup>2</sup>

## A method for culturing of enteric nervous system cells suitable for tissue engineering of the intestine

Department of Pediatric Surgery, Bashkir State Medical University, Lenina Str. 3, Ufa 450015, Russia

Clinic of Pediatric Surgery, University Hospital Mannheim, University of Heidelberg; Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, Germany 68167 Mannheim, University of Applied Sciences, Kaiserslautern, Zweibrücken Amerikastrasse 1, Germany 66482

**Background.** Treatment of short bowel syndrome is a complex issue in modern medicine. Existing treatment methods are inefficient in some cases, and bowel transplantation shows unsatisfactory results. Tissue engineering of the small intestine can represent an innovative method of treatment for these patients. One of the key elements in creation of the gut is culturing of enteric nervous system cells. There is no description of the nerve cells culture extracted from the enteric nervous system and grown in a hyaluronic-acid based three-dimensional matrix so far.

**Research objective:** establishing an *in vitro* method for culturing of interacting enteric nervous system cells in a 3D environment.

**Methods.** The enteric nervous system cells used for these experiments were isolated from Sprague-Dawley rats. Hyaluronic-acid

based hydrogel HyStem®-C (ESI BIO - A Division of BioTime, USA) was used as a 3D matrix. Enteric nervous system cells were isolated from 5- to 8-day-old newborn Sprague-Dawley rats. Animals were decapitated with a rodent guillotine (cervical spinal cord transection). After that they were laparotomized, and their intestines were isolated. The removed intestines were placed in a Petri dish filled with the MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with antibiotics (25 µl factory-produced solution of gentamycin (40 mg/ml) and 50 µl of metronidazole solution (5 mg/ml) per 50 ml of MEM).

The small intestine was then separated from the colon and mesentery under an optical microscope, and the muscular layer of small intestine was isolated from the submucosal layer. The isolated muscular layer was placed in a tube with the deoxyribonuclease and collagenase solution as well as Balanced Salt Solution and incubated for 2 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. As a result, the intestinal muscle tissue was broken down completely in the produced solution, while areas of the myenteric plexus remained intact and were recognizable under the microscope as a network. These neural networks were treated with a trypsin solution. Further, after mechanical processing, a suspension of nerve cells was obtained. The hyaluronic-acid based gel HyStem®-C (ESI BIO - A Division of BioTime, Inc., USA) with added collagen was used to produce a 3D matrix. The enteric nervous system cells were added to this three-dimensional matrix and stirred. Matrix had been hardening for 30 minutes. The cell cultures were fixed, stained and microscopied 10-21 days later. For immunofluorescence staining of cells we used a direct immunohistochemical method with the anti-β III Tubulin antibody conjugated with the fluorochrome Alexa 488 Flour (Merck Millipore). Anti-β III Tubulin is a specific antibody used for peculiar staining of neurons. The anthraquinone dye with a high affinity to double-stranded DNA - DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific) was applied in order to identify cell nuclei. Microscopy was conducted with Leica TCS SP8 (Leica, Germany).

**Results.** The technique we represented allowed us to produce a culture of enteric nervous system cells isolated from rats in the three-dimensional matrix. Confocal microscopy combined with immunohistochemical staining with specific neuronal marker showed that the final cultures indeed consisted of nerve cells. Larger nerve cell clusters were encountered. Herewith, some neurons were arranged close to each other while others were located at a distance; however, all neurons were interconnected. Neurons also clearly showed wide processes morphologically similar to those of axons. In addition, many thin and branching processes resembling dendrites morphologically were visible. The use of confocal microscopy allowed to receive a series of images at different depths of the focal plane, which could then be reconstructed to a three-dimensional image. The 3D reconstruction of the nervous plexi clearly revealed neurons joined together in a complex network. For DRAQ5 stains all cell nuclei, not just those of neurons, the presence of stained cell nuclei just "hanging" on the reconstruction without cytosomes of nerve cells indicated that other cell types were also present in this texture. The present work showed a possibility for culturing interconnected enteric nervous system cells as well as nerve plexi within the three-dimensional medium *in vitro*. The key step in growing the enteric nervous system cells for both two-dimensional and three-dimensional medium claims to be the characteristics of functional cellular activity. Following stages of the study require observing of the cells' functionality, for example, by using the analysis of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration (calcium imaging) and its variability. In addition, the study of cellular interactions within the enteric nervous system with other types of cells in the three-dimensional medium also encourages a great interest.

**Conclusion.** The developed method enables one to culture the interconnected cells of the enteric nervous system within the three-dimensional medium *in vitro*, which can be used to create the enteric nervous system when growing the small intestinal wall by means of tissue engineering. Further research is based on studying the functionality of cells grown in a three-dimensional medium as well as on co-culturing of enteric nerve cells with other types of cells in three-dimensional media.

**Keywords:** tissue engineering; enteric nervous system; short bowel syndrome; neuron.

**For citation:** Khasanov R.R., Gumerov A.A., Schaefer, K.H., Wessel L.M. A method for culturing of enteric nervous system cells suitable for tissue engineering of the intestine. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 132-141. (In Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.132-141

**For correspondence:** **Gumerov Aytbai Akhmetovich**, doctor of medical sciences, professor, head of the department of pediatric surgery with a course of the Institute of Additional Vocational Education of the Bashkir State Medical University, **e-mail:** pedsurg@bk.ru

**Information about authors:**

Gumerov A.A., <http://orcid.org/0000-0001-6183-8286>

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

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

**Received** 21.02.2019

Синдром короткой кишки (СКК) — это заболевание, проявляющееся хронической кишечной недостаточностью, возникает в результате массивной резекции кишечника, реже бывает врожденного характера. Причинами развития СКК у детей чаще всего являют-

ся заболевания, требующие обширной резекций кишечника: некротический энтероколит, атрезия кишечника, гастрошизис, заворот кишок и др. [1, 2]. У взрослых наиболее частыми причинами СКК являются мезентеральный тромбоз, болезнь Крона, злокаче-

ственные новообразования и т.д. [3, 4]. На сегодняшний день проблема выраженной мальабсорбции у детей с СКК решается при помощи парентерального питания (ПП), являющегося жизненно необходимым для таких пациентов [5]. Однако ПП вызывает такие опасные для жизни осложнения, как печеночная недостаточность у 40-70% пациентов, катетер-ассоциированный сепсис и катетер-индуцированный венозный тромбоз [6]. Было показано, что пятилетняя выживаемость пациентов с СКК, находившихся на ПП, составила лишь 52%, тогда как у детей, перешедших в течение 2,5 лет на полное энтеральное питание, отмечалось повышение показателя до 95% [7, 8]. Таким образом, для пациентов с СКК совершенно необходимым и обоснованным является сокращение длительности ПП и ранний переход на полное энтеральное питание. Хирургические методы лечения СКК направлены на улучшение кишечной абсорбции и тем самым на увеличение доли энтерального питания в нутритивном статусе пациента. Эффективность применения современных терапевтических и хирургических методов лечения достигает 70% [9].

Трансплантация кишечника является еще одним из способов лечения пациентов с короткой кишкой. Однако по данным крупнейшего европейского центра по трансплантации кишечника 5-летняя выживаемость трансплантата при пересадке кишечника у детей составляет лишь 44%-57%, а 10-летняя выживаемость трансплантата - 31%-44% [10]. Согласно данным отчета регистра по трансплантации кишечника, на основании данных о 2699, пациентов пятилетняя выживаемость пациентов составила лишь 56% [11].

Тканевая инженерия может стать принципиально новым подходом к лечению пациентов с СКК и хронической кишечной недостаточности [7]. В тканевой инженерии используется матрица, заменяющая внеклеточный матрикс тканей, которая заполняется необходимыми клетками, рост и развитие которых регулируется и стимулируется с помощью различных факторов роста. В последние годы исследователи достигли определенных результатов в моделировании отдельных компонентов кишки [12]. Для создания искусственного кишечника были изучены возможности использования различных тканей в роли матрикса, таких как бесклеточный кожный матрикс (Acellular dermal matrix), подслизистый слой тонкой кишки (small intestinal submucosa), коллагеновая губка заполненная мышечными клетками и др. [3, 13]. Исследовались также синтетические гидрогели на основе алината, l-pNIPAM - гидрогель, l-pNIPAM-co-DMAc гидрогель [14]. Матрикс исследовались с различными типами клеток, такими как энтеральные стволовые клетки, ор-

ганотипические культуры, Caco-2 and HT29-MTX, мышечные клетки и другие. Изучались модели *in vitro* и *in vivo* (животные модели). Авторы показывали преимущества тех или иных комбинаций матрикса и клеток для создания определённых тканей кишечника [12].

Было показано, что мезенхимальные клетки могут дифференцироваться в энтероциты [15]. Были созданы органотипические культуры с 4 типами клеток кишечника в которых обнаруживались глиальные клетки. Авторы считают, что для нормального функционирования кишки, созданной при помощи тканевой инженерии, необходимым условием является наличие энтеральной нервной системы [16]. Другие исследователи также сходятся во мнении, что способность иннервировать искусственно-выращенный мышечный слой является ключевым элементом для создания функционального кишечника [17, 18]. Однако до настоящего времени не описано наличие межмышечного или подслизистого сплетения, выращенных в трёхмерном матриксе при помощи тканевой инженерии [13, 17].

Это связано с высокой чувствительностью клеток нервной системы кишечника к микроокружению. Так, показано, что двухмерные культуры нервных клеток, выращенных как из нейронов центральной нервной системы [19], так и нейронов нервной системы кишечника [20] очень чувствительны к механическим повреждениям и воздействию факторов микроокружения. Трёхмерные культуры клеток имеют ещё более тесные и более сложные взаимосвязи с микроокружением, которые более сложно моделировать. Однако важным преимуществом трёхмерных культур клеток, вне зависимости от типа клеток, является то, что в данных культурах их можно наблюдать в более физиологических условиях [21]. Поэтому создание подобных культур является сложной задачей.

До сих пор не существует работ, в которых были бы сконструированы компоненты кишечной нервной системы, способные функционировать. Цель исследования – разработка метода выращивания *in vitro* клеток нервной системы кишечника, образующих взаимосвязи в трехмерной среде.

## Методика

*Описание метода.* Исследование проводили в научной лаборатории медицинского факультета Мангейм (Германия) в соответствии с немецким законом о защите животных и с разрешения этического комитета по работе с животными медицинского Факультета Мангейм. В эксперименте использовались новорожденные крысы (Sprague–Dawley) в возрасте от 5 до 8

сут. Животных гильотинировали, затем проводили лапаротомию и изымали кишечник.

Кишечник помещали в стерильную одноразовую чашку Петри (диаметр 60, высота 15 мм), заполненную средой MEM (Minimum Essential Media) с добавками антибиотиков. В 50 мл среды MEM добавляли 25 мкл фабричного раствора гентамицина (40 мг/мл) и 50 мкл раствора метронидазола (5 мг/мл).

Под микроскопом с увеличением в 10–20 раз при помощи микропинцетов и микроножниц разделяли мышечный и подслизистый слои тонкой кишки (**рис. 1**).

Выделенный мышечный слой помещали в пробирку, содержащую 100 мкл раствора коллагеназы (10 мг/мл) и 10 мкл дезоксирибонуклеазы (10 мг/мл) в 900 мкл Hank's Balanced Salt Solution и инкубировали в инкубаторе при температуре 37 °С и 5% концентрации углекислого газа в течение 2 ч.

После этого раствор с расщеплённым мышечным слоем выливали в чашку Петри, заполненную средой MEM с добавками антибиотиков, в описанных выше концентрациях. В результате в полученном растворе мышечная ткань кишечника полностью расщеплялась, в то время как участки межмышечного сплетения нервной системы кишечника оставались неповрежденными и под микроскопом выглядели в виде сети (**рис. 2**). Для проведения эксперимента использовали клетки нервной системы кишечника крыс, полученные по методике описанной Schäfer с соавторами [22]. В качестве трёхмерного матрикса использовали гидрогель на основе гиалуроновой кислоты HyStem®-C (ESI BIO - A Division of BioTime, USA).



**Рис. 1.** Препарирование тонкой кишки под микроскопом: отделения мышечного слоя кишки от слизистого. Световая микроскопия.

Эти участки межмышечного нервного сплетения собирали под световым микроскопом (ув. х 20–30) при помощи пипетки объемом 100 мкл и помещали в пробирку объемом 1,5 мл.

Собранные сети межмышечного нервного сплетения центрифугировали при 1000g при температуре 20 °С в течение 5 мин. В результате центрифугирования обрывки сети нервной системы кишечника оседали на дно пробирки. Раствор из пробирки удаляли при помощи пипетки объемом 1 мл. В пробирку добавляли 1 мл 0,25% раствора Trypsin-EDTA (трипсин с этилендиаминтетрауксусной кислотой). Далее пробирку ставили в инкубатор на 1 мин при 37 °С. Затем её снова центрифугировали при 1000 g при температуре 20 °С в течение 5 мин. Супернатант из пробирки убирал пипеткой объёмом 1 мл. В пробирке оставался осадок, после чего в нее добавляли 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Invitrogen, USA) и перемешивали. Полученную смесь несколько раз пропускали через тонкую иголку для получения гомогенного раствора. Таким образом получали суспензию нервных клеток. Раствор (10 мкл) помещали в камеру Горяева для подсчета количества клеток.

На следующем этапе формировали трёхмерный матрикс. Для его получения использовали гель на основе гиалуроновой кислоты с добавлением коллагена HyStem®-C (ESI BIO - A Division of BioTime, Inc., USA). В набор HyStem®-C входят 4 компонента: Gly-



**Рис. 2.** Сеть межмышечного сплетения нервной системы кишечника. Световая микроскопия.

cosil, Gelin-S, Extralink и DG-вода. Каждый из компонентов находится в отдельном флаконе и хранится при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Glycosil, Gelin-S, Extralink представляют собой порошок, DG-вода – дистиллированная вода. Перед применением флаконы согревали до комнатной температуры. Затем во флаконы, содержащие порошок Glycosil и Gelin-S, вносили по 1 мл DG-воды для получения раствора. Флаконы аккуратно перемешивали без резких движений, чтобы избежать появления пузырей. Порошок, содержащийся во флаконах, постепенно растворялся в течение 30–40 мин с последующим получением прозрачного и не-сколькo вязкого раствора. Далее в флакон, содержащий порошок Extralink, добавляли 0,5 мл DG-воды и через 1 мин получали прозрачный раствор.

На следующем этапе нервные клетки инкапсулировали в матрикс.

Растворы Glycosil и Gelin-S перемешивали путём пипетирования в соотношении один к одному. Затем к раствору Glycosil + Gelin-S добавляли нервные клетки, полученные в ходе первого этапа эксперимента и вновь перемешивали смесь пипетированием. Для создания матрикса в полученную смесь добавляли Extralink и раствор Glycosil + Gelin-S + нервные клетки в соотношении 1:4, вновь перемешивали пипетированием. Далее 200 мкл матрикса пипетировали во вставку для 24 луночных планшетов. Вставки помещали в 24 луночные планшеты (BRAND GMBH, Германия). Преимущество использования планшетов со вставками является то, что дно вставки состоит из мембраны, проницаемой для клеточной среды. Кроме того, в стеклах вставки имеются отверстия, через которые клеточная среда также контактирует с матриксом.

Матрикс затвердевал в течение 30 мин.

Далее в каждую лунку добавляли 1,5 мл культуральной среды для нейрокультур. Культуральная среда изготавливалась следующим образом: в 100 мл Neurobasal medium (Gibco) добавляли 1 мл альбумина (Sigma-Aldrich), 100 мкл раствора метронидазола (5 мг/1 мл), 50 мкл раствора гентамицина (40 мг/мл), 250 мкл глутамина (Sigma-Aldrich) и 100 мкл меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich), 2 мл B27 Supplement (Gibco), 100 мкл GD-NF (glial cell line-derived neurotrophic factor) (1 нг/мл), 100 мкл EGF (epidermal growth factor) (1 нг/мл) и 200 мкл bFGF (fibroblast growth factor-basic) (1 нг/мл).

Полученную культуру помещали в инкубатор HERAccl® (Kendro Laboratory Products) и выращивали в течение 10–21 сут при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  и 5% концентрации  $\text{CO}_2$ . Смена культуральной среды производилась каждые 48 ч.

Живые культуры клеток исследовали при помощи световой и фазово-контрастной микроскопии на ин-

версионном микроскопе Olympus IX 70 под увеличением 40x, 100x, 200x.

Через 10–21 сут культуры клеток фиксировали добавлением в каждую лунку 1,5 мл 4% раствора формалина. Через 10 мин раствор формалина отсасывали пипеткой и в каждую лунку добавлялся натрий-фосфатный буфера в количестве 1,5 мл.

Для иммунофлюоресцентного окрашивания клеток применяли прямой иммуногистохимический метод при помощи антитела anti- $\beta$  III Tubulin, конъюгированного с флюорохромом Alexa Flour 488 (Merck Millipore). Anti- $\beta$  III Tubulin – это специфичное антитело для специфичного окрашивания нейронов. Для идентификации ядер клеток использовался антрахиноновый краситель с высоким сродством к двухцепочечной ДНК – DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific). DRAQ5 работает при возбуждающем свете с длиной волны 488–647 нм. Эмиссия DRAQ5 длиной волны 633–710 нм. Выбор anti- $\beta$  III Tubulin конъюгированного с Alexa Flour 488 и DRAQ5 был основан на том, что в использованном нами лазерном конфокальном микроскопе Leica TCS SP8 (Leica, Германия) для возбуждения флюорохромов использовали лазеры длинной волны 488 нм (для Alexa Flour 488) и 638 нм (для DRAQ5).

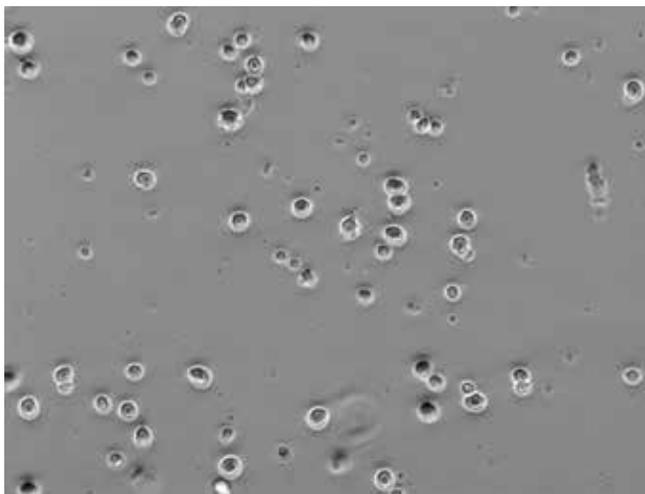
*Методика прямого иммунофлюоресцентного окрашивания.* Окрашивание начинали с пермеабилзации клеток 0,5% Triton-X100 в течении 45 мин, потом матрикс с клетками промывали 3 раза в натрий-фосфатном буфере по 15 мин, далее матрикс инкубировали в течение 1 ч с 10% Normal Goat Serum (DAKO) при комнатной температуре. С этого момента все манипуляции выполняли в затемненных условиях. Матрикс с клетками инкубировали в 200 мкл раствора антител anti- $\beta$  III Tubulin Conjugate Alexa Flour 488 (Merck Millipore) с TBST (Tris Buffered Saline with Tween) (DAKO) в разведении 1:500 при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  в течении ночи. Матрикс с клетками промывали 3 раза в натрий-фосфатном буфере по 15 мин. На следующем этапе матрикс с клетками инкубировали с раствором DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific) с натрий-фосфатным буфером в разведении 1:1000 в течение 20 мин. Далее матрикс с клетками промывали трижды в натрий-фосфатном буфере по 15 мин, потом быстро промывали в дистиллированной воде, помещали на предметное стекло, и покрывали тонким слоем Fluorescence Mounting Medium. Пространство вокруг матрикса заливали толстым слоем Fluorescence Mounting Medium и покрывали покровным стеклом.

## Результаты и обсуждение

Выделенные клетки нервной системы кишечника (рис. 3.) помещали в HyStem®-С матрикс в соотноше-

нии 100 000 клеток на 100 мкл HyStem®-С матрикса и перемешивали путём пипетирования.

Живую культуру клеток изучали под микроскопом в HyStem®-С матриксе на 8-е сут выращивания клеток нервной системы кишечника (**рис. 4**). В HyStem®-С матриксе были отчетливо видны клетки нервной системы кишечника, с сформировавшимися отростками. Клетки образовывали взаимосвязи как с другими



**Рис. 3.** Клетки нервной системы кишечника после получения из тонкой кишки до высаживания в трёхмерный матрикс.



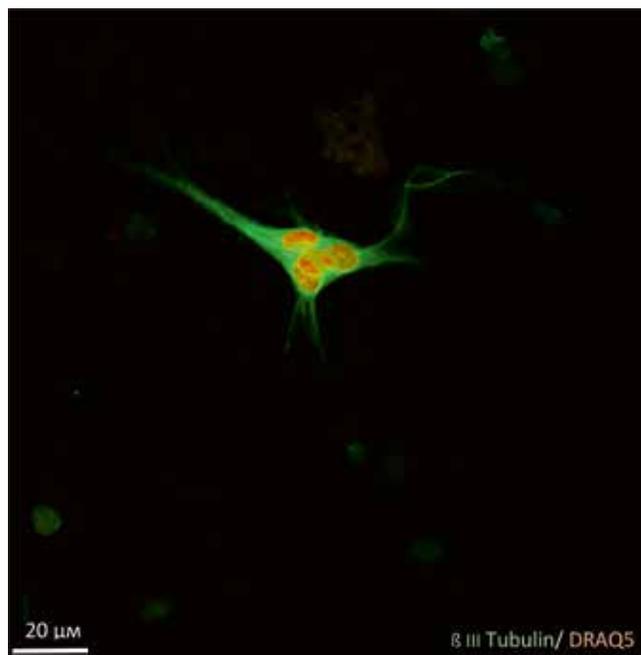
**Рис. 4.** Живая культура клеток нервной системы кишечника под световым микроскопом.

клетками, так и с нейросферами (скоплениями стволовых нервных клеток).

Для доказательства принадлежности клеток к нейронам, было произведено флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание фиксированных культур клеток.

Так как в отличие от обычных 2-х-мерных культур, полученные нами клетки, выращивались в трёхмерном матриксе, возникла необходимость характеристики еще одного параметра, а именно глубины. В связи с этим для определения оптических слоев в трёхмерной культуре клеток нами был использован конфокальный микроскоп. При микроскопировании культур клеток нервной системы кишечника окрашенных антителом в Tubulin III и DRAQ5, были обнаружены небольшие скопления близко расположенных друг к другу нейронов (**рис. 5**), где определяются ядра 4 нейронов. Некоторые отростки нейронов объединены в пучок, морфологически одни из них похожи на аксоны, другие, расходящиеся отдельно и ветвящиеся, похожи на дендриты (**рис. 5**).

Также были обнаружены более крупные скопления нейронов. При этом некоторые нейроны располагались близко друг к другу (**рис. 6**), а другие на некото-



**Рис. 5.** Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Небольшое скопление нейронов. Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет ( $\beta$  III Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет (DRAQ5) – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

ром расстоянии, однако все нейроны были объединены между собой. У двух нейронов отчетливо видны широкие отростки, морфологически похожие на аксоны. Кроме того, видно множество тонких и ветвящихся отростков, морфологически напоминающих дендриты.

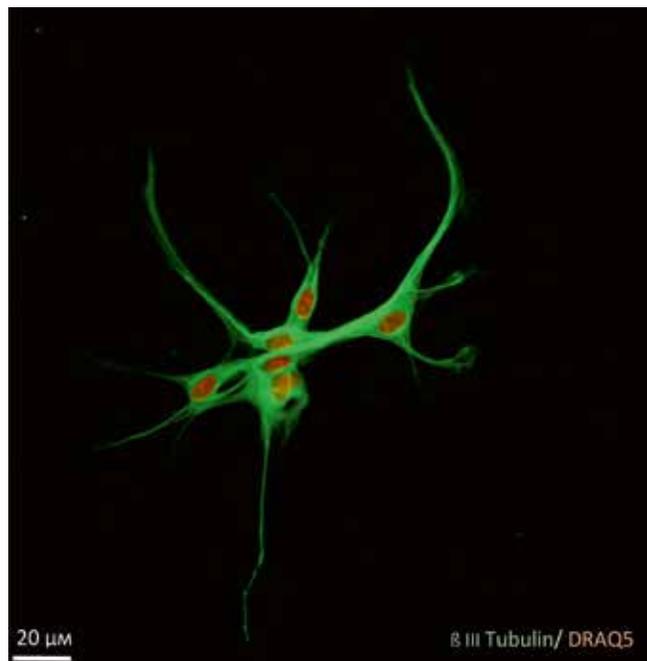
Были также обнаружены большие скопления нейронов, напоминающие сплетение. На **рис. 7** отчетливо видны только нейроны, находящиеся в центральной части сплетения, а нервные клетки в других плоскостях видны не отчетливо или совсем не видны.

Применение конфокальной микроскопии позволило получить серию изображений на различных глубинах фокальной плоскости и затем реконструировать из них трехмерное изображение (**рис. 8**). На трехмерной реконструкции сплетения отчетливо видны нейроны, сплетенные в сложную сеть. DRAQ5 окрашивает ядра всех клеток, а не только нейронов. Наличие окрашенных ядер клеток (красного цвета), просто «висящих» на реконструкции, без окружающей их тела нервной клетки (зеленого цвета) показывает, что в данном сплетении присутствуют и другие типы клеток, наиболее вероятно глиальные клетки.

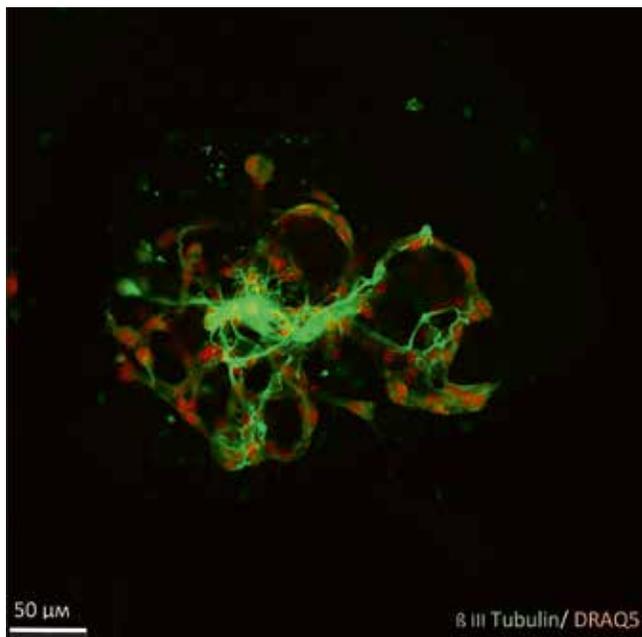
Для оценки трёхмерности сплетения была проведена трёхмерная реконструкция серии изображений с цветовым кодированием клеток по глубине нахождения в сплетении. При цветовом кодировании глубины цвет клеток программно изменялся от темно-синего — для клеток находящихся наиболее глубоко, до темно-красного — для клеток находящихся более поверхностно (**рис. 9**). Высота сплетения была более 50 мкм.

Трёхмерная реконструкция серии изображений сплетения была также рассмотрена под углом (**рис. 10**). На данной реконструкции сплетение визуализируется в трёх осях пространства (x, y, z) без искусственного цветового кодирования глубины. Эта реконструкция, без программного кодирования глубины, показывает трёхмерность и сложность структуры выращенного в HyStem®-С матриксе сплетения нервных клеток кишечника, что позволяет лучше определить взаимное расположение нервных клеток и ядер в трёхмерном пространстве.

Тканевая инженерия органов и тканей является потенциально новым методом лечения многих заболеваний, связанных с недостаточностью или потерей органов и тканей, что позволит решать такие проблемы



**Рис. 6.** Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Скопление нейронов. Флюоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет (β Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.



**Рис. 7.** Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Большие скопления нейронов, напоминающие сплетение. Флюоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет (β Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

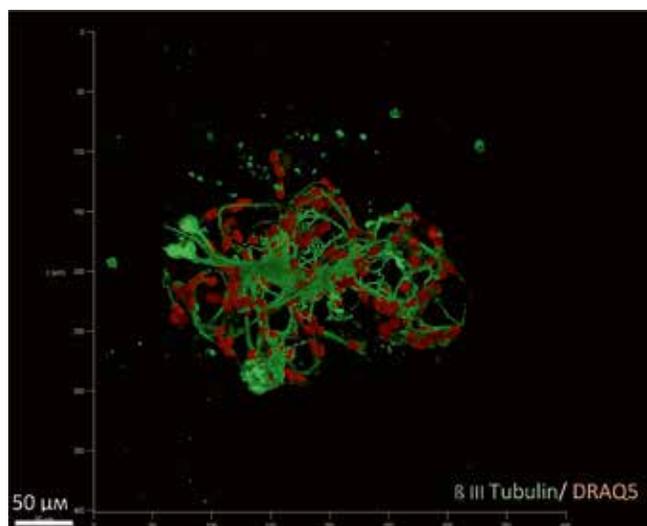
трансплантации органов, как недостаток доноров и отторжение тканей.

Изучением возможности искусственного выращивания кишки занимаются многие исследователи [23]. Работы в этой области в основном сконцентрированы на создании слизистого или мышечного слоя тонкой кишки. При этом авторы утверждают, что создание

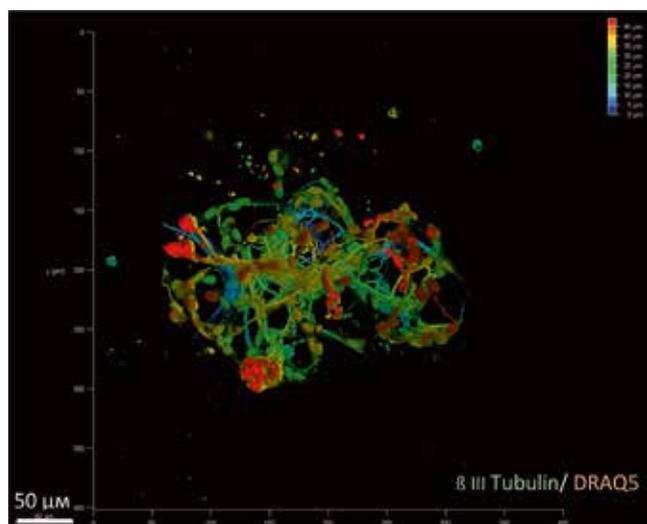
функциональной нервной системы кишечника является ключевым моментом для использования в тканевой инженерии [13, 17].

В доступной на настоящий момент литературе работ по выращиванию дифференцированных и взаимодействующих нервных клеток кишечника в трёхмерной среде для использования в тканевой инженерии отсутствуют. Методика по выделению нервных клеток кишечника, описанная Schäfer с соавторами [22], позволяет выращивать клетки нервной системы кишечника только на плоскости. Однако, для тканевой инженерии ключевым условием является культивирование клеток в трёхмерных средах, что, по нашему мнению, удалось выполнить в нашей работе, благодаря выбору оптимального матрикса и подбору определенных условий для выживания, размножения и роста клеток. Применение конфокальной микроскопии и иммуноспецифического окрашивания клеток позволило не только доказать, что выращенные клетки являются нейронами, но обнаружить взаимосвязи между клетками и выявить комплексную трёхмерную структуру сплетений клеток в трёхмерной среде. В представленной работе показана возможность выращивания клеток нервной системы кишечника, формирующих друг с другом связи, а также нервные сплетения *in vitro* в трёхмерной среде.

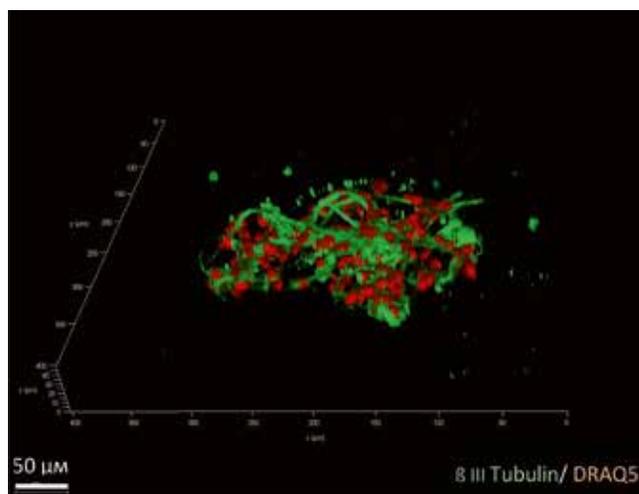
Характеристика функциональной активности клеток является ключевым этапом в выращивании клеток нервной системы кишечника, как в двумерных, так и трёхмерных средах. На следующих этапах исследова-



**Рис. 8.** Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Трёхмерная реконструкция большого скопления нейронов, напоминающие сплетение. Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет ( $\beta$  Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.



**Рис. 9.** Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Трёхмерная реконструкция сплетения нейронов с программным цветовым кодированием глубины. Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание.



**Рис. 10.** Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Трёхмерная реконструкция сплетения нейронов, рассмотренная под углом в трёх осях пространства (x, y, z). Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет ( $\beta$  Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

ния необходимо изучение функциональности клеток, например, при помощи анализа изменений внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  (Calcium imaging) на стимуляцию рецепторов. Кроме того, интересным является изучение взаимодействия клеток нервной системы кишечника с другими типами клеток в трёхмерных средах.

### Заключение

Разработанный метод позволяет выращивать клетки нервной системы кишечника, формирующие связи друг с другом в трёхмерной среде *in vitro*, что может быть использовано для получения нервных сплетений кишечника при выращивании кишки путем тканевой инженерии. Дальнейшие исследования лежат в плоскости изучения функциональности выращенных в трёхмерных средах клеток и совместного выращивания клеток нервной системы кишечника с другими типами клеток в трёхмерных средах.

### Литература

1. Pakarinen, M.P. Autologous intestinal reconstruction surgery as part of comprehensive management of intestinal failure. *Pediatr Surg Int*. 2015; 31(5): 453-64.
2. Хасанов Р.Р., Гумеров А.А., Вессель Л.М. Причины развития синдрома короткой кишки. *Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии*. 2017; 7(3): 8-12.
3. Wales, P.W. and E.R. Christison-Lagay, Short bowel syndrome: epidemiology and etiology. *Semin Pediatr Surg*. 2010; 19(1): 3-9.
4. Тимербулатов В.М., Тимербулатов Ш.В., Асманов Д.И., Асманов Д.И., Султанбаев А.У. Диагностика ишемических повреждений кишечника при некоторых острых хирургических заболеваниях органов брюшной полости. *Креативная хирургия и онкология*. 2017; 7(3): 12-9.
5. Gargasz, A. Neonatal and pediatric parenteral nutrition. *AACN Adv Crit Care*. 2012; 23(4): 451-64; quiz 465-6.
6. Reinshagen, K., et al. The chronic liver disease in patients with short bowel syndrome: etiology and treatment. *Minerva Pediatr*. 2009; 61(3): 273-81.
7. Weih, S., et al. Current practice and future perspectives in the treatment of short bowel syndrome in children—a systematic review. *Langenbecks Arch Surg*. 2012; 397(7): 1043-51.
8. Nucci, A., et al. Interdisciplinary management of pediatric intestinal failure: A 10-year review of rehabilitation and transplantation. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2008; 12(3): 429-35.
9. Belza, C., et al. *Predicting Intestinal Adaptation in Pediatric Intestinal Failure: A Retrospective Cohort Study*. *Ann Surg*. 2017.
10. Lacaille, F., et al. Twenty-eight years of intestinal transplantation in Paris: experience of the oldest European center. *Transpl Int*. 2017; 30(2): 178-86.
11. Grant, D., et al. Intestinal transplant registry report: global activity and trends. *Am J Transplant*. 2015; 15(1): 210-9.
12. Dosh, R.H., et al. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018; 24(2): 98-111.

13. Nakase, Y., et al. Endocrine cell and nerve regeneration in autologous *in situ* tissue-engineered small intestine. *J Surg Res*. 2007; 137(1): 61-8.
14. Dosh, R.H., et al. Use of hydrogel scaffolds to develop an *in vitro* 3D culture model of human intestinal epithelium. *Acta Biomater*. 2017; 62: 128-43.
15. Markel, T.A., et al. Stem cells as a potential future treatment of pediatric intestinal disorders. *J Pediatr Surg*. 2008; 43(11): 1953-63.
16. Levin, D.E., et al. Human tissue-engineered small intestine forms from postnatal progenitor cells. *J Pediatr Surg*. 2013; 48(1): 129-37.
17. Dunn, J.C. Is the tissue-engineered intestine clinically viable? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008; 5(7): 366-7.
18. Bitar, K.N., S. Raghavan, and E. Zakhem. Tissue engineering in the gut: developments in neuromusculature. *Gastroenterology*. 2014; 146(7): 1614-24.
19. Лисина О. Ю., Московцев А. А., Кубатиев А. А., Сурин А. М. Динамика изменений морфологии нейрональной сети и развития митохондрий в механически поврежденной первичной культуре нейронов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(2): 11-23.
20. Hagl, C.I., et al. Enteric neurons from postnatal Fgf2 knockout mice differ in neurite outgrowth responses. *Auton Neurosci*. 2012; 170(1-2): 56-61.
21. Сабурин И. Н., Кошелева Н. В., Зурина И. М., Горкун А. А., Пулин А. А., Еремин И. И. и др. Динамика изменения миогенного потенциала стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки рта в 2D и 3D культуре. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 111-9.
22. Schafer, K.H., et al. A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1997; 1(2): 109-13.
23. Dosh, R.H., et al. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017.

### References

1. Pakarinen, M.P. Autologous intestinal reconstruction surgery as part of comprehensive management of intestinal failure. *Pediatr Surg Int*. 2015; 31(5): 453-64.
2. Khasanov R.R., Gumerov A.A., Wessel L.M. The causes of the short bowel syndrome. *Rossiyskiy vestnik detskoy khirurgii, anesteziologii i reanimatologii*. 2017; 7(3): 8-12. (in Russian)
3. Wales, P.W. and E.R. Christison-Lagay, Short bowel syndrome: epidemiology and etiology. *Semin Pediatr Surg*. 2010; 19(1): 3-9.
4. Тимербулатов В.М., Тимербулатов Ш.В., Сагитов Р.В., Султанбаев А.У., Асманов Д.И. Diagnostics of the intestine ischemic damages in some acute surgical diseases of abdominal cavity. *Kreativnaya khirurgiya i onkologiya*. 2017; 7(3): 12-9. (in Russian)
5. Gargasz, A., Neonatal and pediatric parenteral nutrition. *AACN Adv Crit Care*. 2012; 23(4): 451-64; quiz 465-6.
6. Reinshagen, K., et al. The chronic liver disease in patients with short bowel syndrome: etiology and treatment. *Minerva Pediatr*. 2009; 61(3): 273-81.
7. Weih, S., et al. Current practice and future perspectives in the treatment of short bowel syndrome in children—a systematic review. *Langenbecks Arch Surg*. 2012; 397(7): 1043-51.
8. Nucci, A., et al. Interdisciplinary management of pediatric intestinal failure: A 10-year review of rehabilitation and transplantation. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2008; 12(3): 429-35.

9. Belza, C., et al. Predicting Intestinal Adaptation in Pediatric Intestinal Failure: A Retrospective Cohort Study. *Ann Surg*. 2017.
10. Lacaillie, F., et al. Twenty-eight years of intestinal transplantation in Paris: experience of the oldest European center. *Transpl Int*. 2017; 30(2): 178-86.
11. Grant, D., et al. Intestinal transplant registry report: global activity and trends. *Am J Transplant*. 2015; 15(1): 210-9.
12. Dosh, R.H., et al. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018. 24(2): 98-111.
13. Nakase, Y., et al. Endocrine cell and nerve regeneration in autologous in situ tissue-engineered small intestine. *J Surg Res*. 2007; 137(1): 61-8.
14. Dosh, R.H., et al. Use of hydrogel scaffolds to develop an in vitro 3D culture model of human intestinal epithelium. *Acta Biomater*. 2017; 62: 128-43.
15. Markel, T.A., et al. Stem cells as a potential future treatment of pediatric intestinal disorders. *J Pediatr Surg*. 2008; 43(11): 1953-63.
16. Levin, D.E., et al. Human tissue-engineered small intestine forms from postnatal progenitor cells. *J Pediatr Surg*. 2013; 48(1): 129-37.
17. Dunn, J.C. Is the tissue-engineered intestine clinically viable? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008; 5(7): 366-7.
18. Bitar, K.N., S. Raghavan, and E. Zakhem. Tissue engineering in the gut: developments in neuromusculature. *Gastroenterology*. 2014; 146(7): 1614-24.
19. Lisina O.Y., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A., Surin A.M. Dynamics of changes in neuronal network morphology and development of mitochondria in mechanically damaged primary neuronal culture. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2018; 62(2): 11-23. (in Russian)
20. Hagl, C.I., et al. Enteric neurons from postnatal Fgf2 knockout mice differ in neurite outgrowth responses. *Auton Neurosci*. 2012; 170(1-2): 56-61.
21. Saburina I.N., Kosheleva N.V., Zurina I.M., Gorkun A.A., Pulin A.A., Eremin I.I., et al. The dynamics of changes in myogenic potential of stromal cells from alveolar oral mucosa in 2D and 3D culture. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2018; 62(4): 111-9. (in Russian)
22. Schafer, K.H., et al. A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1997; 1(2): 109-13.
23. Dosh, R.H., et al. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017.

#### Сведения об авторах:

**Хасанов Расуль Риантович**, канд. мед. наук, доцент каф. детской хирургии с курсом ИДПО Башкирского государственного медицинского университета, Уфа, Россия; науч. сотр. клиники детской хирургии университетской клиники Маннгейм университета Гейдельберга, Германия;

**Гумеров Айтбай Ахметович**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. детской хирургии с курсом ИДПО Башкирского государственного медицинского университета, e-mail: pedsurg@bk.ru;

**Шефер Карл-Херберт**, проф., вице-президент рабочей группы «Энтеральная нервная система», Университет прикладных наук Кайзерслаутерн, кампус Цвайбрюкен, Германия, Germany 66482 Zweibrücken Amerikastrasse;

**Весель Лукас Мариа**, доктор мед. наук, проф., директор клиники детской хирургии университетской клиники Маннгейм университета Гейдельберга, Германия.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.831–005.4

Гельцер Б.И.<sup>1</sup>, Слабенко Э.В.<sup>1</sup>, Заяц Ю.В.<sup>1</sup>, Котельников В.Н.<sup>1,2</sup>

## Методы моделирования острой ишемии головного мозга: патофизиологическое обоснование выбора и значение для клинической практики

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»,  
690091, г. Владивосток, Россия, ул. Суханова, д. 8;

<sup>2</sup>Дальневосточный филиал ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины»,  
690080, г. Владивосток, Россия, ул. Борисенко, д. 100Д

Одним из основных требований к разработке экспериментальных моделей цереброваскулярных заболеваний является их максимальная приближенность к реальной клинической практике. В работе систематизированы данные по основным методам моделирования острой ишемии головного мозга (ОИГМ), представлена их классификация, анализируются данные о преимуществах и недостатках той или иной модели. Обсуждаются результаты экспериментальных исследований по изучению патогенеза ОИГМ с использованием различных моделей (полной и неполной глобальной, локальной и мультифокальной ишемии) и способов их реализации (перевязка артерий, клипирование, коагуляция, эмболизация и др.). Особое внимание уделяется «стабильности» последствий острого нарушения мозгового кровообращения: необратимых ишемических повреждений головного мозга или обратимых с реперфузией заданной продолжительности. Отмечается, что важное значение в этих исследованиях должно принадлежать современным методам прижизненной визуализации очагов острого ишемического повреждения, что позволяет оценивать динамику патологического процесса. Предлагаемый метод отвечает требованиям гуманного обращения с животными. Подчеркивается, что выбор релевантной модели ОИГМ определяется задачами предстоящего исследования и технологическими ресурсами научной лаборатории.

**Ключевые слова:** инсульт; модель; крысы; острая ишемия головного мозга.

**Для цитирования:** Гельцер Б.И., Слабенко Э.В., Заяц Ю.В., Котельников В.Н. Методы моделирования острой ишемии головного мозга: патофизиологическое обоснование выбора и значение для клинической практики. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(2): 142-152.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.142-152

**Для корреспонденции:** Котельников Владимир Николаевич, доктор мед. наук, начальник филиала ГНИИИ ВМ МО РФ,  
e-mail: vkotelnikov@hotmail.com

**Финансирование.** Работа не имеет финансовой поддержки.

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

**Поступила** 15.12.2017

Geltser B.I.<sup>1</sup>, Slabenko E.V.<sup>1</sup>, Zayats Yu.V.<sup>1</sup>, Kotelnikov V.N.<sup>2</sup>

## METHODS FOR SIMULATION OF ACUTE BRAIN ISCHEMIA: PATHOPHYSIOLOGICAL SUBSTANTIATION OF SELECTION AND IMPORTANCE FOR CLINICAL PRACTICE

<sup>1</sup>Far East Federal University,  
Sukhanova Str. 8, Vladivostok 690091, Russia;

<sup>2</sup>Far Eastern Branch of the State Research and Test Institute of Military Medicine,  
Borisenko Str. 100 D, Vladivostok 690080, Russia

Development of experimental models for acute forms of cerebrovascular diseases is essential for implementation of methods for their prevention and treatment. One of the principal requirements to such models is their maximum approximation to actual clinical practice. This review systematized major models of acute cerebral ischemia (ACI), their classification, and presented information about their advantages and shortcomings. Also, the review presented results of experimental studies on pathophysiological mechanisms of different types of modeled ACI (complete and incomplete global, local, and multifocal ischemia) and methods for creating these models (arterial ligation, clipping, coagulation, embolization, etc.). Particular attention was paid to “stability” of the consequences of acutely impaired cerebral circulation – an irreversible ischemic brain injury or a reversible injury with reperfusion of a given duration. The authors emphasized that in such studies, a special significance should be given to intravital imaging of acute ischemic damage foci using modern methods, which allow assessing the dynamics of the pathological process and meet the requirements to humane treatment of animals. The choice of a relevant ACI model is determined by objectives of the planned study and the technological resources available at the research laboratory.

**Keywords:** stroke; model; rats; acute cerebral ischemia.

**For citation:** Geltser B.I., Slabenko E.V., Zayats Yu.V., Kotelnikov V.N. Methods for simulation of acute brain ischemia: pathophysiological substantiation of selection and importance for clinical. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 142-152. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 142-152

**For correspondence:** **Vladimir N. Kotelnikov**, MD. Chief Far Eastern Branch of the State Research and Test Institute of Military Medicine, Borisenko St., 100 D, Vladivostok, 690080, Russia. E-mail: vkotelnikov@hotmail.com

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

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

**Information about authors:**

Geltser B.I., <http://0000-0002-9250-557X>

Slabenko E.V., <http://0000-0002-0892-4465>

Zayats Yu.V., <http://0000-0003-1529-1587>

Kotelnikov V.N., <http://0000-0001-5830-1322>

**Received** 15.12.2017

## Введение

Острые и хронические формы цереброваскулярных заболеваний являются одной из наиболее частых причин инвалидизации и смертности, уступая по этим показателям только ишемической болезни сердца. В структуре всех случаев острых форм цереброваскулярных заболеваний около 80% занимают различные варианты ишемического инсульта, летальность при которых в течение первого месяца составляет 28-35% [1–3]. Не менее 50% пациентов, перенесших ишемический инсульт, остаются нетрудоспособными вследствие сенсорного, моторного или когнитивного дефицита и только 10% возвращаются к полноценной жизни [4, 5]. Высокая медико-социальная значимость этой проблемы определяет необходимость исследования патофизиологических механизмов развития ишемического инсульта и разработки новых терапевтических стратегий в интересах фундаментальной и клинической медицины. Именно поэтому важное значение в реализации данных задач принадлежит разработке экспериментальных моделей острой ишемии головного мозга (ОИГМ), одним из основных требований к которым является их максимальная приближенность к реальной клинической практике [6–9]. В настоящее время для моделирования ОИГМ чаще всего используют грызунов (мыши, кролики, крысы) ввиду экономических преимуществ и сходства ангиоархитектоники их мозга с головным мозгом (ГМ) человека. При этом выбор экспериментальной модели является ключевым этапом в реализации конкретного исследовательского проекта. Несмотря на важность этой проблемы, в литературе отсутствуют систематизированные данные о преимуществах или недостатках отдельных моделей ОИГМ, точные представления о которых являются необходимым условием для патофизиологического обоснования их выбора [8, 10–12].

*Общая характеристика экспериментальных моделей ОИГМ у лабораторных животных.* Экспериментальные модели ОИГМ классифицируют прежде всего по типу повреждения (индуцированные или спонтанные), а также по объему ишемического повреждения (полные, неполные, локальные, мультифокальные). Реализация моделей может осуществляться различным доступом (с краниотомией или без нее), а ОИГМ индуцируют с помощью перевязки, коагуляции, клипирования, эмболизации артерий или комбинацией этих способов. По «стабильности» последствий ОИГМ можно выделить необратимые ишемические повреждения или обратимые с реперфузией заданной продолжительности [7, 13–16].

Объем ишемического повреждения оценивается с помощью магнитно-резонансной и рентгеновской компьютерной томографии, доплерографии. Оценка функциональных нарушений проводится с использованием поведенческого и неврологического тестирования. Чаще всего применяются 8-рукавный радиальный лабиринт, водный лабиринт Морриса, тесты хождения по балке (ledged tapered beam), открытого поля, установки позы (bracing test), угловой тест (corner test), тест с вытягиванием лапы (placing test). Кроме того, используют шкалу mNSS (modified neurological severity scores), шкалу Гарсия, шкалу оценки инсульта (stroke index) с модификациями.

*Модели полной глобальной ОИГМ.* Полная глобальная ОИГМ может развиваться в результате остановки сердца, билатеральной окклюзии общих сонных артерий, нисходящей части аорты, нижней полой вены, а также внутриутробной гипоксии плода и гипоксии новорожденных грызунов. Остановка сердца моделируется угнетением автоматизма и сократительной функции сердца за счет внутрисердечного введения животным раствора хлорида калия [7, 17]. Данная методика применяется при изучении состояния клинической смерти и эффективности различных методов сердечно-ле-

гочной реанимации, исследования молекулярных механизмов системных ишемических повреждений и их последствий для центральной нервной системы (ЦНС), тестирования новых лекарственных препаратов, в том числе для терапии постгипоксической энцефалопатии [8, 18]. На основе использования этой модели были изучены защитные свойства гипотермии после восстановления сердечной деятельности, нейропротективный эффект сверхэкспрессии супероксиддисмутазы-1 [17, 19]. Данная методика чаще использовалась в исследованиях ОИГМ на крупных животных, а у мышей — для изучения апоптоза в нейронах СА1 гиппокампа, каудопутамена, переднего и заднего мозга [20, 21]. Оклюзия нисходящей части аорты или нижней полой вены позволяет комплексно оценить влияние острой ишемии на внутренние органы и ЦНС, а различные варианты этой модели позволяют минимизировать внецеребральные проявления тотальной ишемии. [16, 22].

Гипоксическая аноксия новорожденных грызунов использовалась для исследований роли различных молекулярно-клеточных мишеней в патогенезе ишемических повреждений ГМ, а также оценки современных средств таргетной терапии для определения новых фармакологических стратегий в лечении этой патологии. В частности, с использованием этой модели установлена роль аноксии в развитии синдрома гиперреактивности ЦНС, изучались механизмы созревания нервной ткани, определено значение гиппокампа в реализации пространственной памяти. Кроме того, выявлено изменение числа корковых и гиппокампальных нейронов в ГМ [14, 23, 24], закономерности калий-индуцированного высвобождения аминокислот, открытие глутаматных рецепторов ионных каналов и механизмы нормализации метаболических нарушений при реперфузии ГМ [19, 22]. Недостаток модели заключается в том, что в эксперимент вводят нормально рожденных животных, испытавших физиологический родовой стресс, который недостаточно полно отражает патогенез ишемического поражения ЦНС у человека [14, 23, 25]. Разработана также модель ОИГМ, когда в эксперимент включают 13 – 21-дневных грызунов. В этих исследованиях изучена способность крыс к обучению на разных этапах онтогенеза в зависимости от активности каспазы-3 в ГМ, содержания моноаминергических медиаторов, влияющих на возрастные особенности поведения животных. При этом были выявлены взаимосвязи между выраженностью нарушений поведенческих функций и структурой нейрохимической моторной асимметрии. Изучалось также влияние различных пептидов на мнестическую функцию, нейромедиаторный баланс, изменения в работе генетического аппарата клеток ЦНС [26, 27].

Модель внутриутробной ишемии (аноксии) плода беременных грызунов является одной из наиболее приближенных к реальным условиям асфиксии в родах у человека и позволяет исследовать ее краткосрочные и долгосрочные последствия (причины летального исхода, задержка психомоторного развития), а также роль энергетического и электролитного дефицита у новорожденных в патогенезе ишемического поражения ЦНС. В этих исследованиях изучались молекулярно-клеточные мишени для терапевтического воздействия с целью предотвращения или ограничения последствий асфиксии за счет использования блокаторов межклеточных каналов и рецепторов к факторам роста, ингибиторов апоптоза, а также влияние гипотермии на развитие воспалительного процесса в постишемический период. Основной недостаток модели связан с проблемами точного определения гестационного возраста крыс [14, 25].

Билатеральная окклюзия общей сонной артерии у монгольских песчанок (*Meriones unguiculatus*) является особой разновидностью моделирования полной ОИГМ. Важной особенностью этих животных является наличие незамкнутого виллизиева круга, поэтому при окклюзии общей сонной артерии кровоснабжение переднего мозга полностью прекращается и развивается диффузная ОИГМ, сопровождающаяся гибелью нейронов и глиальных клеток [22]. Билатеральная окклюзия общих сонных артерий проявляется ишемией переднего мозга и может осуществляться путем наложения микрохирургических зажимов или лигатур на сосуды, либо поднятием их на лигатурах. Фазы повреждения ГМ определяются в зависимости от степени нарушений мозговой гемоперфузии, метаболического статуса ГМ и его электрофизиологических изменений. В ряде исследований был проведен гистологический и морфометрический анализ клеточных повреждений на различных срезах ГМ и получены сравнительные характеристики плотности ткани лобной доли и области СА1 и СА3, отмечены умеренные некробиотические изменения с признаками активации регенераторных процессов [22, 26, 28]. Существует вариант данной методики в комбинации с артериальной гипотензией до уровня систолического артериального давления 50 мм рт. ст. У крыс линии SHR-SP с помощью данной модели обнаружены структурные нарушения митохондрий в пирамидных нейронах области СА1 гиппокампа [29]. Важнейший недостаток этой модификации заключается в развитии генерализованных метаболических нарушений в жизненно важных органах. [14, 27]. Билатеральная частичная окклюзия общей сонной артерии может использоваться и для моделирования хронической гипоперфузии ГМ [22, 28].

Необходимо отметить, что мозг крыс и мышей имеет анатомические и физиологические различия, в том числе в соотношении белого и серого вещества. Кроме того, мозг крысы, по сравнению с человеком, имеет значительно больше коллатералей между крупными церебральными сосудами и тяжелые повреждения мозговой ткани наблюдаются при окклюзии проксимальных сосудов [30]. Следовательно, стоит ожидать, что не все механизмы ишемического повреждения ГМ, а также результаты тестирования фармакологических средств и их терапевтические возможности будут релевантными [31–33].

*Модели неполной глобальной ОИГМ.* Модели неполной глобальной ОИГМ переднего и заднего отделов головного мозга имеют общую особенность, которая заключается в диффузном характере повреждения с преимущественной гибелью нейронов в высокочувствительных к ишемии отделах ГМ. Это, прежде всего, пирамидные нейроны полей СА1 и СА3 гиппокампа, мелкие нейроны стриатума и базальных ганглиев, а также нейроны II, III и V слоев неокортекса. Существуют разновидности этой модели с сохранением определенного уровня мозгового кровотока за счет естественных коллатералей и неравномерного снижения кровотока в различных анатомических отделах ГМ [22, 28, 34]. Моделирование проводится перевязкой общей сонной артерии или её клипированием продолжительностью от 10–15 мин до 3 сут, если предполагается реперфузия ГМ. При использовании коагуляции артерий необходимо учитывать последствия термического воздействия на сосуды и ткани ГМ, что может привести в эксперимент их дополнительное повреждение [35].

Модель кровоизлияние/гипотония реализуется путем кровопотери в объеме 2% от массы животного или введением гипотензивных препаратов. Существует модель с созданием условий гипобарической гипоксии в барокамере на фоне артериальной гипотензии на уровне систолического артериального давления 40 мм рт. ст. При этом уровень гипобарической гипоксии, скорость снижения давления в барокамере и длительность воздействия этих факторов являются модифицируемыми. Переносимость комбинации гипоксического стресса и артериальной гипотензии определяется сроками наступления судорог и длительностью пребывания животных в гипобарических условиях. В различных модификациях данного метода используются грызуны разного возраста, а также беременные крысы [19, 24, 25]. Недостаток модели состоит в сложности оценки кумулятивных эффектов комплекса повреждающих факторов и повторных ишемических стимулов на структуры ГМ, а также в необходимости приобретения специального оборудования [8, 22].

Модели ОИГМ «венозного» генеза позволяют получить разной степени выраженности диффузные отеки ГМ с формированием очаговых неврологических расстройств, которые достаточно точно отражают выраженность морфологических изменений в ГМ человека, развивающихся при нарушениях венозного кровотока. Модели используются для изучения состояний после удаления опухолей ГМ различных локализаций, резекций парасагиттальных менингиом, острого нарушения мозгового кровообращения, изучения патогенеза этих состояний и эффективности методов их терапии [36]. Окклюзия корковых вен и верхнего сагиттального синуса у свиней проводится введением баллона, управляемого с помощью катетера и фибринового клея, что приводит к обструкции мостовых и корковых вен [36, 37]. У крыс индукция этого состояния выполняется аппликацией различных химических веществ. В частности, описана сравнительно простая и воспроизводимая модель, в которой тромбоз венозного сагиттального синуса ГМ у крыс после трепанации черепа индуцировали нанесением хлорного железа. При этом в короткие сроки после его аппликации формировался цитотоксический отек ГМ с последующим вазогенным отеком, связанным с реканализацией венозного сагиттального синуса. Морфологическим субстратом ОИГМ являлся очаг некроза с последующим замещением зоны повреждения рубцовой тканью с кистозной дегенерацией. В качестве эффективного метода устранения неврологического дефицита в этих случаях предлагалось использовать трансплантацию мезенхимальных стволовых клеток [36, 38].

Окклюзия ипсилатеральной общей сонной и среднемозговой артерий воспроизводит эпизоды ишемии и реперфузии различной длительности [22, 36, 39]. Моделирование проводится одним этапом, что исключает вероятность коллатерального кровоснабжения ГМ за счёт ветвей подключичных и плечевых артерий и генерализованных метаболических нарушений в других органах. В некоторых модификациях используют методы визуализации средней мозговой артерии для верификации ее топографических и анатомических вариантов (магистральный, рассыпной, смешанный) и точной локализации трепанационного отверстия [22, 36]. Метод «трехсосудистой» окклюзии выполняется с помощью обратимого ограничения кровотока в общей сонной артерии и одновременной коагуляцией обеих позвоночных артерий или необратимой окклюзии базилярной артерии. На этой модели изучены особенности метаболизма, механизмы репаративных процессов и фармакологическая эффективность различных лекарственных средств при поражениях коры и ствола ГМ, полей СА1, СА3, СА4, зубчатой извилины, пара-

медианных зон гиппокампа, III, V и VI слоев заднего неокортекса и полосатого тела [14, 28]. Данная модель имеет ряд существенных недостатков, так как электрокоагуляция позвоночной артерии затруднена вследствие её большой топической вариабельности и сложного хирургического доступа. При коагуляции артерий возможна также их неполная окклюзия и сильное кровотечение. Кроме того, многоэтапность моделирования затрудняет интерпретацию результатов исследования [8, 22, 28]. Одним из недостатков данного метода, помимо указанных выше, является сложный хирургический доступ к базилярной артерии в основании черепа крысы [14]. Предложена одноэтапная модель с наложением микрососудистых зажимов на обе общие сонные и позвоночные артерии между поперечными отростками 2 и 3 шейных позвонков. Наличие кровотока в этих случаях контролировалось визуально посредством прокола сосуда или введением красящего вещества (синий Эванса) в бедренную вену крысы [22, 34].

*Модели локальной ОИГМ.* Локальная (фокальная, фокусная) церебральная ишемия артериального или венозного генеза моделирует снижение притока крови к определенным регионам ГМ. Данную методику воспроизводят с реперфузией или без нее. Главной характеристикой морфофункциональных последствий этого воздействия является формирование ишемического ядра, зоны пенумбры с погибшими и выжившими нейронами. Степень повреждения ГМ зависит в этом случае от полноценности и длительности окклюзии, количества коллатералей и объема поражения. [40-45]. В ряде исследований с использованием этой модели изучали повреждение проводящих путей ГМ, метаболический стресс, ионный дисбаланс, высвобождение глутамата, дисфункцию нейронов в зоне ишемической полутени [46, 47]. Важную роль в развитии данного экспериментального направления сыграли работы, выполненные в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, в которых была показана связь между деполяризацией перинфарктной зоны и угнетением коры ГМ [48-51]. После транзиторной или длительной фокальной ишемии в зоне пенумбры определяли чувствительность нейронов к каспазе-3 и другим проапоптотическим протеинам [52, 53]. «Однососудистая» окклюзия общей сонной или внутренней сонной артерии, в том числе с применением гипотензивных препаратов, воспроизводит фокальное повреждение ГМ, включая явления межполушарной асимметрии как у взрослых, так и у новорожденных крыс. В моделях с использованием временной или постоянной лигации этих артерий важно минимизировать кровотечение и сделать хирурги-

ческую процедуру рациональной, что является важным условием для периода реабилитации. С помощью этой модели исследовали патофизиологические механизмы повреждения и восстановления незрелой мозговой ткани и были приведены доказательства специфического морфофункционального паттерна этих изменений [46, 52, 54]. Термическая коагуляция внутренней сонной артерии является одноэтапной, простой в исполнении и не требует специального микрохирургического оборудования и навыков, легко воспроизводима в лабораторных условиях.

Окклюзия или коагуляция средней мозговой артерии приводит к острому нарушению кровотока и повреждению части мозга в бассейне кровоснабжения этой артерии [55, 56], в неокортексе и небольшой области каудопутамена. На этой модели проводилось исследование опиоидергической стресс-лимитирующей системы, содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ,  $\beta$ -эндорфина, гемореологические нарушения [35, 56]. Данная модель является релевантной для изучения различных патофизиологических аспектов ишемического инсульта [23, 26, 46, 49]. Эндovasкулярная окклюзия средней мозговой артерии может быть выполнена с помощью монофиламентной нити для изучения ишемического и реперфузионного повреждения ГМ или с использованием нейлоновой нити с силиконовым наконечником. Недостатком данной модели является повреждение ГМ в регионах, не кровоснабжаемых средней мозговой артерией при наличии коллатералей между глубокими артериями и сосудами таламуса, гипоталамуса и гиппокампа [22, 29, 46].

Перманентная модель окклюзии средней мозговой артерии у 10-ти дневных крыс является малоинвазивной и может быть использована для изучения изменений ГМ в зоне гиппокампа и кортикальной зоне, в том числе травматического генеза. При моделировании ОИГМ в перинатальном периоде воспроизводится повреждение ипсилатерального стриатума и париеготемпорального кортекса без контралатеральных изменений в течение периода острой ишемии. Модель используется для изучения механизмов повреждения ГМ при эпилепсии, параличах, а также изменений, связанных с задержкой умственного и физического развития, и при других формах моторных и когнитивных нарушений, чему посвящены экспериментальные работы, выполненные в Научном центре неврологии РАН [57, 58]. Кроме того, использование данной модели информативно для оценки отдаленных результатов лечения при ранних инсультах, исследования патофизиологии восстановительных процессов, возможных терапевтических стратегий. Данная модель ОИГМ

является релевантной для исследования поведенческих реакций как на ранних этапах онтогенеза (пренатальная гипоксия), так и в экспериментах со взрослыми животными [16, 39, 50, 51]. Недостатками модели являются артефакты, связанные с вагусной стимуляцией, риском кровотечения или слабой реперфузией ткани ГМ. Модель не может воспроизвести изменения, характерные для перинатального ишемического инсульта новорожденных, развивающиеся в результате эмболии из плаценты, когда активность процесса имеет позднюю симптоматику, а также когда невозможно моделировать патологию с врожденными неврологическими нарушениями [16, 23, 26].

Преимущества двухсосудистой окклюзии позвоночных артерий объясняются сходством ангиоархитектоники ГМ крыс и человека, а также близостью основных гемодинамических параметров при избирательной острой ишемии заднего мозга. Важными критериями для оценки адекватности модели полной окклюзии позвоночных артерий служат данные электрической активности ГМ и показатели микроциркуляции в склере глаза, что позволяет повысить процент выживших животных, участвующих в эксперименте [7, 8, 46].

Фотоиндуцированный тромбоз представляет собой модель локальной ишемии, при которой развивается инфаркт ГМ с известным фиксированным объемом зоны пенумбры. Несомненное преимущество данного подхода состоит в фиксированном объеме зоны ишемии, тогда как все прочие модели фокальной ишемии не позволяют столь точно стандартизировать размер зоны риска, что связано с индивидуальными особенностями кровоснабжения ГМ. При этом, в состоянии острой ишемии оказывается объем ткани, находящийся внутри кольца лазера, вне зависимости от особенностей кровоснабжения ГМ [11, 22]. Модель фототромбоза была впервые предложена В. D. Watson и соавт. и в течение последних десятилетий широко используется в «НИИ общей патологии и патофизиологии» для выявления морфофункциональных нарушений, возникающих при ишемическом повреждении коры головного мозга и при исследовании препаратов, обладающих нейропротекторными свойствами [59–63]. Модель может быть использована в неонатальном периоде, для изучения механизмов реперфузии, как важнейшего компонента прогрессирования локального повреждения ГМ. Некоторые авторы предлагают использовать полуинвазивные методы для визуализации динамики патологического процесса через краниальное окно в соматосенсорном кортексе мышей *in vivo* [14, 46]. Недостатком этой методики является формирующийся вазогенный отек ГМ [11].

*Модели мультифокальной ОИГМ.* Мультифокальная церебральная ОИГМ воспроизводит клинические ситуации, возникающие при множественной эмболии артерий ГМ мелкими тромбоемболами, отрывающимися от створок митрального или аортального клапанов, что имеет место в случаях инфекционного эндокардита, сепсиса и ДВС-синдрома. Модели множественной тромбоемболии позволяют изучить эффективность различных антикоагулянтов и антитромбоцитарных препаратов при лечении ишемического инсульта. Недостатками данных моделей является их низкая воспроизводимость в отношении локализации и объема повреждения ГМ [8, 22, 46]. Эмболизация сосудов проводится сгустками ауто- или гетерологичной крови, фибриновыми микроэмболами, полиэтиленовыми микросферами, вязким силиконовым маслом, поливинилсилоксаном, латексными и керамическими макросферами, которые вводятся в общую сонную или в среднюю мозговую артерию. Отличительной особенностью метода является мультифокальность поражения: микроскопические очаги повреждения ГМ при введении тромбоемболов в среднюю мозговую артерию наблюдались, кроме бассейна данной артерии, в бассейнах передней и задней мозговой артерии и даже в противоположном полушарии [7, 46]. Практикуется также введение ауто тромба во внутреннюю сонную артерию. В тромбоемболических моделях исследуются изменения реологических свойств крови, что является полезным при разработке как реперфузионных, так и нейропротекторных подходов к лечению ишемического инсульта [22]. Недостатки метода состоят в сложности контроля за величиной эмбола и, следовательно, зоной ишемии, а также в формировании выраженного отека и кровоизлияний в ГМ [46]. Выполнена также модель ОИГМ путем инъекции лаурата натрия во внутренний каротидный синус [6]. Эндотелин-1 – индуцированное сужение артерий и вен вызывает вазоспастическую окклюзию отдельного сосуда при аппликации эндотелина, а также путем его введения в стриатум, белое вещество в субкортикальной зоне или во внутреннюю капсулу. У крыс и мышей эндотелин, введенный внутривенно на фоне блокады синтеза оксида азота, вызывает экстрасистолию и атриоventрикулярный блок. Ганглиоблокаторы, холиноблокаторы и бета-адреноблокаторы снижают аритмогенный потенциал эндотелина, что свидетельствует о важной роли вегетативной регуляции в развитии нарушений ритма сердца [9, 11]. Преимущество модели заключается в высокой воспроизводимости ишемических повреждений в кортикальной и субкортикальной зоне и низкой летальности животных в эксперименте. Недостатки модели состоят в том, что зона острой ишемии не подлежит контролю, а индукция астроцитоза и аксо-

нального разветвления может осложнить интерпретацию результатов [6, 14, 64]. Химический метод мультифокальной ОИГМ выполняется инъекцией взвеси сульфата бария в правую сонную артерию, а также аппликацией хлорного железа [32].

### Заключение

Решение крупных проблем современной медицины, к которым несомненно относится ишемический инсульт, возможно только на основе интеграции достижений фундаментальной науки и клинической практики. Комплексные исследования различных клинко-патологических аспектов ОИГМ являются примером такого взаимодействия. В данном обзоре представлен научный анализ преимуществ и недостатков экспериментальных моделей ОИГМ, которые чаще всего используются для изучения механизмов патогенеза острых цереброваскулярных расстройств и разработки новых фармакологических средств для их лечения. При всем многообразии существующих методических подходов к ОИГМ важнейшей проблемой остается выбор её релевантной модели, соответствующей целям предстоящих исследований, а также технологические ресурсы научной лаборатории. Важным аспектом исследований ОИГМ является использование современных средств прижизненной визуализации ишемических повреждений ГМ, что позволяет оценить динамику патологического процесса *in vivo* и отвечает требованиям гуманного обращения с животными.

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

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

### Литература

1. Клочихина О.А., Стаховская Л.В. Анализ эпидемиологических показателей инсульта по данным территориально-популяционных регистров 2009-2012 гг. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2014; 114 (6): 63-9.
2. Billot L, Woodward M, Arima H, Hackett M.L., Muñoz Venturilli P., et al. Statistical analysis plan for the head position in stroke trial (HeadPoST): an international cluster cross-over randomized trial. *Int. J. Stroke*. 2017; 12 (6): 667-70.
3. Суслина З.А., Гулевская Т.С., Максимова М.Ю., Моргунов В.А. *Нарушения мозгового кровообращения: диагностика, лечение, профилактика*. М.: МЕДпресс-информ. 2016.
4. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В. Проблема инсульта в Российской Федерации: время активных совместных действий. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2007; 107 (8): 4-10.
5. Tang Z., Zhou T., Luo Y., Xie C., Huo D., et al. Risk factors for cerebrovascular disease mortality among the elderly in Beijing: a competing risk analysis. *PLOS ONE*. 2014; 9 (2): e87884.

6. Casals J.B., Pieri N.G., Feitosa M.L., Ercolin A.C., Roballo K.C., Barreto R.S. The use of animal models for stroke research: a review. *Comparative Medicine*. 2011; 61(4): 305-13.
7. Васильев И.А., Ступак В.В., Черных В.А., Зайдман А.М., Половников Е.В. и др. Экспериментальные модели сосудистых поражений головного мозга. *Успехи современного естествознания*. 2015; 1 (3): 366-9.
8. Мяснищева О.В., Покровский М.В., Гуреев В.В., Анциферов О.В., Мартынов М.А. Экспериментальные модели ишемического повреждения головного мозга. *Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация*. 2014; 11 (182): 123-6.
9. Лобанова Н.Н., Медведев Н.И., Попов В.И., Мурашев А.Н. Моделирование глобальной ишемии головного мозга путем билатеральной окклюзии сонных артерий у бодрствующих гипертензивных крыс (SHR-SP). *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2008; 146 (12): 617-30.
10. Беленцов А.С., Романова Е.В., Сарапульцев Г.П., Медведева С.Ю. Разработка и тестирование экспериментальной одноэтапной модели ишемического инсульта у крыс. *Электронный научно-образовательный Вестник. Здоровье и образование в XXI веке*. 2014; 16 (5): 2-6.
11. Fluri F., Schuhmann M.K., Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug design, development and therapy*. 2015; 9: 3445-54.
12. Mergenthaler P., Meisel A. Do stroke models model stroke? *Disease Models & Mechanisms*. 2012; 5: 718-25.
13. Thomsen B.B., Gredal H., Wirenfeldt M., Kristensen B.W., Clausen B.H., Larsen A.E. Spontaneous ischaemic stroke lesions in a dog brain: neuropathological characterisation and comparison to human ischaemic stroke. *Acta. Vet. Scand*. 2017; 59(7): 2-9.
14. Моргунов А.В., Кувачёва Н.В., Таранушенко Т.Е., Хилажева Е.Д., Устинова С.И., Салмина А.Б. Способы экспериментального моделирования перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга *in vivo*. *Вопросы современной педиатрии*. 2014; 13 (5): 31-6.
15. Холоденко И.В., Ярыгин К.Н., Губский Л.В., Кониева А.А., Таирова Р.Т. и др. Внутривенная ксенотрансплантация мезенхимальных стволовых клеток плаценты человека крысам: сравнительная оценка хоуминга в головном мозге в двух моделях экспериментального ишемического инсульта. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2012; (3): 123-8.
16. Shmonin A.A., Baisa A. E., Melnikova E.V., Vavilov V.N., Vlasov T.D. Protective effects of early ischemic preconditioning in focal cerebral ischemia in rats: the role of collateral blood circulation. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2012; 42(6): 643-50.
17. Kofler J., Hurn P.D., Traystman R. J. SOD1 overexpression and female sex exhibit region-specific neuroprotection after global cerebral ischemia due to cardiac arrest. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2005; 25: 1130-7.
18. Zhou X, Qi Y., Chen T. Long-term pre-treatment of antioxidant Ginkgo biloba extract EGB-761 attenuates cerebral-ischemia-induced neuronal damage in aged mice. *Biomed. Pharmacother*. 2017; 85: 256-63
19. Bramlett H.M., Dietrich W.D. Pathophysiology of ischemic and traumatic brain injury: similarities and differences. *Meditsina neotlozhykh sotoyaniy*. 2006; 5(6): 36-43.
20. Vahidinija Z., Alipour N., Atlasi M.A., Naderian H., Beyer C., Azami T.A. Gonadal steroids block the calpain-1-dependent intrinsic pathway of apoptosis in an experimental rat stroke model. *Neurol Res*. 2017; 39(1): 54-64.
21. Zhou H., Yang W.S., Li Y., Ren T, Peng L., et al. Oleoylethanolamide attenuates apoptosis by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B and ERK1/2

- signaling pathways in mice with acute ischemic stroke. *Naunyn schmiedebergs arch pharmacol.* 2017; 390(1): 77-84.
22. Шербак Н.С., Выболдина Т.Ю., Галагудза М.М., Митрофанова Л.Б., Нифонтов Е.М. и др. Влияние раннего и позднего ишемического preconditionирования головного мозга на выраженность повреждения нейронов гиппокампа и степень неврологического дефицита у крыс. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2012; 98 (8): 990-9.
  23. Larphaveesarp A., Gonzalez F.F. Transient middle cerebral artery occlusion model of neonatal stroke in P10 Rats. *Journal of Visualized Experiments* 2017; 122: 1-6.
  24. Grunt S., Mazenauer L., Buerki S.E., Boltshausen E., Mori A.C. et al. Incidence and outcomes of symptomatic neonatal arterial ischemic stroke. *Pediatrics.* 2015; 135 (5): 220-8.
  25. Аладина В.А., Куроян А.В. Морфология плаценты у беременных крыс с экспериментальным ишемическим инсультом. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2015; (5): 46 – 7.
  26. Карантыш Г.В., Абрамчук В.А., Рыжак Г.А., Менджеричский А.М. Пептидная регуляция поведения и медиаторного баланса у старых крыс в условиях окклюзии сонных артерий. *Фундаментальные исследования.* 2013; (6): 1406-10.
  27. Mokhtari T., Akbari M., Malek F., Kashani I.R., Rastegar T. et al. Improvement of memory and learning by intracerebroventricular microinjection of T3 in rat model of ischemic brain stroke mediated by upregulation of BDNF and GDNF in CA1 hippocampal region. *Daru.* 2017; 25(1): 4.
  28. Мартынова О.В., Тверской А.В., Покровский М.В. Мартынов М.А. Шкилева И.Ю. и др. Морфологические изменения нейронов головного мозга крыс при двух-, -четырёхсосудистой модели ишемического повреждения головного мозга крыс и их коррекция тадалафилом в эксперименте. *Современные проблемы науки и образования.* 2016; (6): 242.
  29. Amki E.M., Clavier T., Perzo N., Bernard R., Guichet P.O., Castel H. Hypothalamic, thalamic and hippocampal lesions in the mouse MCAO model: potential involvement of deep cerebral arteries? *J. Neurosci Methods.* 2015; 30: 254: 80-5.
  30. Agafonova I.G., Kotelnikov V.N., Geltser B.I., Kolosova N.G., Stonik V.A. The morphofunctional characteristic of cerebral and renal arteries after induced arterial hypertension in rats using magnetic resonance imaging. *Applied Magnetic Resonance.* 2017; 48: 1–9.
  31. Mohammadi M.T. Overproduction of nitric oxide intensifies brain infarction and cerebrovascular damage through reduction of claudin-5 and ZO-1 expression in striatum of ischemic brain. *Pathol. Res. Pract.* 2016; 212(11): 959-64.
  32. Лычко В.С., Малахов, В.А, Потапов А.А. Морфологические изменения мозговой ткани у крыс с экспериментальной моделью ишемического инсульта в динамике лечения иммунобиологическим препаратом криоцелл-криокорд. *Современные технологии в медицине.* 2015; 7 (4): 58-63.
  33. Тюренков И.Н., Вологова Е.В., Куркин Д.В., Мазина Н.В., Бакулин Д.А. и др. Нейропротективное и антиоксидантное действие нейроглутама при церебральной ишемии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015; 159 (3): 344-7.
  34. Lu D., Wu Y., Qu Y., Shi F., Hu J., et al. A modified method to reduce variable outcomes in a rat model of four-vessel arterial occlusion. *Neurol Res.* 2016; 38 (12): 1102-10.
  35. Левичкин В.Д, Трофименко А.И., Каде А.Х., Павлюченко И.И., Мясникова В.В. и др. Характеристика цитокинового профиля и оксидативного статуса у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом. *Современные проблемы науки и образования.* 2014; (6): 1116.
  36. Цветовский С.Б., Васильев И.А., Ступак В.В., Самохин А.Г., Половников Е.В., Черных Е.Р. Влияние мезенхимальных стромальных клеток на электрофизиологическую активность головного мозга крыс в модели очагового нарушения венозного кровообращения. *Российский нейрохирургический журнал им. А.Л. Поленова.* 2012; 4 (4): 5-9.
  37. Liu B., Zhang Y., Jiang Y., Li L., Li C., Li J. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus protects against cerebral ischemic injury by PPAR  $\gamma$  upregulation. *Neurol. Res.* 2017; 39(1): 23-9.
  38. Зинькова Н.Н., Гилерович Е.Г, Соколова И.Б., Вийде С.К., Шведова Е.В. и др. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток. *Цитология.* 2007; 49 (7): 566-75.
  39. Zhang L., Ma J., Jin X., Jia G., Jiang Y., Li C. L-PGDS Mediates Vagus nerve stimulation-induced neuroprotection in a rat model of ischemic stroke by suppressing the apoptotic response. *Neurochem Res.* 2017; 42(2): 644-55.
  40. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989; 20(1): 84-91.
  41. Takano K., Tatlisumak T., Bergmann A.G., Gibson D.G., Fisher M. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. *J. Neurol. Sci.* 1997; 153(1): 8-11.
  42. Belayev L., Alonso O.F., Busto R., Zhao W., Ginsberg M.D. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke.* 1996; 27: 1616-22
  43. Биленко М.В. *Ишемические и реперфузионные повреждения органов.* М.; Медицина, 1989.
  44. Güzel A., Rölz R., Nikkhah G., Kahlert U., Maciaczyk J. A microsurgical procedure for middle cerebral artery occlusion by intraluminal monofilament insertion technique in the rat: a special emphasis on the methodology. *Exp Transl Stroke Med.* 2014; 6: 6-10.
  45. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. Wachtel M.S., Ginsberg M.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985; 17 (5): 497-504.
  46. Holm L. *Focal ischemic reperfusion stroke model in rats and the role of galanin:* diss. Sweden; 2011.
  47. Агафонова И.Г., Колосова Н.Г., Рассказов В.А. Сравнительный анализ изменения мозгового кровообращения у крыс с индуцированным острым нарушением мозгового кровообращения методом магнитно -резонансной томографии. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2012; (1): 104-7.
  48. Силачев Д.Н., Учеваткин А.А., Пирогов Ю.А., Зоров Д.Б., Исаев Н.К. Сравнение магнитно-резонансной томографии и трифенилтетразолиевого выявления повреждений головного мозга как методов исследования экспериментальной фокальной ишемии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2009; 147(2): 223-6.
  49. Савченко Е.С., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Силачев Д.Н., Бабенко В.А. и др. Оценка изменения количества нейронов, астроцитов и клеток микроглии в головном мозге после ишемического инсульта методами иммуногистохимии и иммуноблоттинга. *Цитология.* 2016; 58(7): 534-42.
  50. Силачев Д.Н., Манских В.Н., Гуляев М.В., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д. и др. Ишемия головного мозга вызывает патологические изменения, сходные с наблюдаемыми при болезни Аль-

штеймера. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; (4): 53-8.

51. Серединин С.Б., Силачев Д.Н., Гудашева Т.А., Пирогов Ю.А., Исаев Н.К. Исследование нейропротекторного действия дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 при индукции экспериментальной фокальной ишемии в бассейне средней мозговой артерии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011; 151(5): 518-9.

52. Белоусова М.А., Корсакова Е.А., Городецкая Е.А., Каленикова Е.И., Медведев О.С. Новые антиоксиданты как нейропротекторы при ишемических повреждениях головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2014; 77(11): 36-44.

53. Шумихина Г.В., Данилова Т.Г. Оценка воздействия перманентной экстравазальной окклюзии левой общей сонной артерии на нейроны переднего мозга белых крыс. *Вестник Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого*. 2016; 92(6): 128-31.

54. Pei L., Meng S., Yu W., Wang Q., Song F., Ma L. Inhibition of microRNA-383 ameliorates injury after focal cerebral ischemia via targeting PPAR $\gamma$ . *Cell Physiol Biochem*. 2016; 39(4): 1339-46.

55. Milani D., Cross J.L., Anderton R.S., Blacker D.J., Knuckey N.W., Meloni B.P. Neuroprotective efficacy of poly-arginine R18 and NA-1 (TAT-NR2B9c) peptides following transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurosci Res*. 2017; 114: 9-15.

56. Sabbaghziarani F., Mortezaee K., Akbari M., Kashani I.R., Soleimani M. et al. Stimulation of neurotrophic factors and inhibition of proinflammatory cytokines by exogenous application of triiodothyronine in the rat model of ischemic stroke. *Cell Biochem Funct*. 2017; 35 (1): 50-5.

57. Шугалев Н.П., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Ольшанский А.С., Мирошниченко Е.В. Воспроизведение реакций пассивного избегания после введения нейротензина в прилежащее ядро мозга у крыс на фоне действия резерпина. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2012; 62(3): 357.

58. Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Ольшанский А.С., Бабкин Г.А., Иллариошкин С.Н. Оценка эффектов новых пептидных соединений у экспериментальных животных с токсическими моделями болезни Альцгеймера *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2016; 10(2): 33-41.

59. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wechtel M.S., Ginsberg M.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol*. 1985; 17 (5): 497-504.

60. Романова Г.А., Силачев Д.Н., Шакова Ф.М., Кващенко Ю.Н. Особенности обучения в водном лабиринте Морриса у крыс с ишемическим повреждением префронтальной области коры головного мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2008; (4): 19-21.

61. Мухина И.В., Бугрова М.Л., Романова Г.А., Шакова Ф.М., Продиус П.А. Ультраструктурные изменения контрлатерального участка перифокальной зоны локального ишемического очага, вызванного фотоиндуцированным тромбозом префронтальной коры мозга крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2010; (4): 43-8.

62. Свиридкина Н.Б., Шакова Ф.М., Комиссарова С.В., Дубровин И.П., Турьгина С.А. и др. Морфофункциональное исследование действия антиростатической гипокинезии при очаговом ишемическом повреждении коры головного мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; (2): 22-6.

63. Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Романова Г.А., Хаспеков Л.Г. Морфологическое исследование нейропротекторных свойств

дипептидного миметика фактора роста нервов (ГК-2Н) при фокальном ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 4: 17-20.

64. Morris G.P., Wright A.L., Tan R.P., Gladbach A., Ittner L.M., Visser B. A comparative study of variables influencing ischemic injury in the longa and koizumi methods of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in mice. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0148503.

### References

1. Klochikhina O.A., Stakhovskaya L.V. Analysis of epidemiological indicators of stroke according to territorial-population registers 2009-2012. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2014; 114(6): 63-9. (in Russian)

2. Billot L, Woodward M, Arima H, Hackett M.L., Muñoz Venturelli P., et al. Statistical analysis plan for the head position in stroke trial (HeadPoST): an international cluster cross-over randomized trial. *Int. J. Stroke*. 2017; 12 (6): 667-70.

3. Suslina Z.A., Gulevskaya T.S., Maksimova M.Yu., Morgunov V.A. *Disorders of cerebral circulation: diagnosis, treatment, prevention. [Narusheeniya mozgovogo krovoobrashcheniya: diagnostika, lechenie, profilaktika]*. Moscow; MEDpress-inform. 2016. (in Russian)

4. Gusev E.I., Skvortsova V.I., Stakhovskaya L.V. The problem of stroke in the Russian Federation: the time of active joint action. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2007; 107(8): 4-10. (in Russian)

5. Tang Z., Zhou T., Luo Y., Xie C., Huo D., et al. Risk factors for cerebrovascular disease mortality among the elderly in Beijing: a competing risk analysis. *PLOS ONE*. 2014; 9 (2): e87884.

6. Casals J.B., Pieri N.G., Feitosa M.L., Ercolin A.C., Roballo K.C., Barreto R.S. The use of animal models for stroke research: a review. *Comparative Medicine*. 2011; 61(4): 305-13.

7. Vasil'ev I.A., Stupak V.V., Chernykh V.A., Zaydman A.M., Polovnikov E.V. et al. Experimental models of cerebral vascular lesions. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2015; 1(3): 366-9. (in Russian)

8. Myasishcheva O.V., Pokrovskiy M.V., Gureev V.V., Antsiferov O.V., Martynov M.A. Experimental models of ischemic brain damage. *Nauchnye vedomosti. Seriya Meditsina. Farmatsiya*. 2014; 11(182): 123-6. (in Russian)

9. Lobanova N.N., Medvedev N.I., Popov V.I., Murashev A.N. Modeling of global cerebral ischemia by bilateral occlusion of carotid arteries in awake hypertensive rats (SHR-SP). *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2008; 146(12): 617-30. (in Russian)

10. Belentsov A.S., Romanova E.V., Sarapul'tsev G.P., Medvedeva S. Yu. Development and testing of an experimental one-stage model of ischemic stroke in rats. *Elektronnyy nauchno-obrazovatel'nyy Vestnik. Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*. 2014; 16(5): 2-6. (in Russian)

11. Fluri F., Schuhmann M.K., Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug design, development and therapy*. 2015; 9: 3445-54.

12. Mergenthaler P., Meisel A. Do stroke models model stroke? *Disease Models & Mechanisms*. 2012; 5: 718-25.

13. Thomsen B.B., Gredal H., Wirenfeldt M., Kristensen B.W., Clausen B.H., Larsen A.E. Spontaneous ischaemic stroke lesions in a dog brain: neuropathological characterisation and comparison to human ischaemic stroke. *Acta. Vet. Scand*. 2017; 59(7): 2-9.

14. Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Taranushenko T.E., Khilazheva E.D., Ustinova S.I., Salmina A.B. Methods of experimental modeling of

- perinatal hypoxic-ischemic brain injury in vivo. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2014; 13(5): 31–6. (in Russian).
15. Kholodenko I.V., Yarygin K.N., Gubsky L.V., Konieva A.A., Tairova R.T. et al. Intravenous xenotransplantation of mesenchymal stem cells of human placenta in rats: a comparative assessment of homing in the brain in two models of experimental ischemic stroke. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2012; 3: 123-8. (in Russian).
  16. Shmonin A.A., Baisa A. E., Melnikova E.V., Vavilov V.N., Vlasov T.D. Protective effects of early ischemic preconditioning in focal cerebral ischemia in rats: the role of collateral blood circulation. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2012; 42(6): 643-50.
  17. Kofler J., Hurn P.D., Traystman R.J. SOD1 overexpression and female sex exhibit region-specific neuroprotection after global cerebral ischemia due to cardiac arrest. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2005; 25: 1130–7.
  18. Zhou X, Qi Y., Chen T. Long-term pre-treatment of antioxidant Ginkgo biloba extract EGb-761 attenuates cerebral-ischemia-induced neuronal damage in aged mice. *Biomed. Pharmacother*. 2017; 85: 256-63.
  19. Bramlett H.M., Dietrich W.D. Pathophysiology of ischemic and traumatic brain injury: similarities and differences. *Meditsina neotlozhnykh sotonyaniy*. 2006; 5(6): 36-43.
  20. Vahidinia Z., Alipour N., Atlasi M.A., Naderian H., Beyer C., Azami T.A. Gonadal steroids block the calpain-1-dependent intrinsic pathway of apoptosis in an experimental rat stroke model. *Neurol Res*. 2017; 39(1): 54-64.
  21. Zhou H., Yang W.S., Li Y., Ren T, Peng L., et al. Oleoylethanolamide attenuates apoptosis by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B and ERK1/2 signaling pathways in mice with acute ischemic stroke. *Naunyn schmiedebergs arch pharmacol*. 2017; 390(1): 77-84.
  22. Shcherbak N.S., Viboldina T.Yu., Galagudza M.M., Mitrofanova L.B., Nifontov E.M. et al. The effect of early and late ischemic preconditioning of the brain on the severity of damage to the hippocampal neurons and the degree of neurologic deficiency in rats. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2012; 98(8): 990-9. (in Russian).
  23. Larphaveesarp A., Gonzalez F.F. Transient middle cerebral artery occlusion model of neonatal stroke in P10 Rats. *Journal of Visualized Experiments* 2017; 122: 1-6.
  24. Grunt S., Mazenauer L., Buerki S.E., Boltshausen E., Mori A.C. et al. Incidence and outcomes of symptomatic neonatal arterial ischemic stroke. *Pediatrics*. 2015; 135 (5): 220-8.
  25. Alad'ina V.A., Kuroyan A.V. Morphology of the placenta in pregnant rats with experimental ischemic stroke. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*, 2015; 5: 46-7. (in Russian).
  26. Karantysh G.V., Abramchuk V.A., Ryzhak G.A., Mendzherickij A.M. Peptide regulation of behavior and mediator balance in old rats in conditions of occlusion of carotid arteries. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013; 6: 1406-10. (in Russian).
  27. Mokhtari T., Akbari M., Malek F., Kashani I.R., Rastegar T. et al. Improvement of memory and learning by intracerebroventricular microinjection of T3 in rat model of ischemic brain stroke mediated by upregulation of BDNF and GDNF in CA1 hippocampal region. *Daru*. 2017; 25(1): 4.
  28. Martynova O.V., Tverskoy A.V., Pokrovskiy M.V. Martynov M.A. Shkileva I.Yu. et al. Morphological changes in brain neurons of rats with two, four-cavity models of ischemic damage to rat brain and their correction by tadalafil in the experiment. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; 6: 242. (in Russian).
  29. Amki E.M., Clavier T., Perzo N., Bernard R., Guichet P.O., Castel H. Hypothalamic, thalamic and hippocampal lesions in the mouse MCAO model: potential involvement of deep cerebral arteries? *J. Neurosci Methods*. 2015; 30: 254: 80-5.
  30. Agafonova I.G., Kotelnikov V.N., Geltser B.I., Kolosova N.G., Stonik V.A. The morphofunctional characteristic of cerebral and renal arteries after induced arterial hypertension in rats using magnetic resonance imaging. *Applied Magnetic Resonance*. 2017; 48: 1–9.
  31. Mohammadi M.T. Overproduction of nitric oxide intensifies brain infarction and cerebrovascular damage through reduction of claudin-5 and ZO-1 expression in striatum of ischemic brain. *Pathol. Res. Pract*. 2016; 212(11): 959-64.
  32. Lychko V.S., Malakhov, V.A, Potapov A.A. Morphological changes in brain tissue in rats with an experimental model of ischemic stroke in the dynamics of treatment with an immunobiological drug cryocell-cryocord. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2015; 7(4): 58-63. (in Russian).
  33. Tyurenkov I.N., Volotova E.V., Kurkin D.V., Mazina N.V., Bakulin D.A. et al. Neuroprotective and antioxidant effect of neuroglutamate in cerebral ischemia. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2015; 159(3): 344-7. (in Russian).
  34. Lu D., Wu Y., Qu Y., Shi F., Hu J., et al. A modified method to reduce variable outcomes in a rat model of four-vessel arterial occlusion. *Neurol Res*. 2016; 38 (12): 1102-10.
  35. Levichkin V.D, Trofimenko A.I., Kade A.Kh., Pavlyuchenko I.I., Myasnikova V.V. et al. Characterization of cytokine profile and oxidative status in rats with experimental ischemic stroke. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2014; 6: 1116. (in Russian).
  36. Cvetovskiy S.B., Vasil'ev I.A., Stupak V.V., Samohin A.G., Polovnikov E.V., Chernykh E.R. Influence of mesenchymal stromal cells on the electrophysiological activity of rat brain in the model of focal disturbance of venous circulation. *Rossiyskiy neyrokhirurgicheskii zhurnal im. A.L. Polenova*. 2012; 4(4): 5-9. (in Russian).
  37. Liu B., Zhang Y., Jiang Y., Li L., Li C., Li J. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus protects against cerebral ischemic injury by PPAR  $\gamma$  upregulation. *Neurol. Res*. 2017; 39(1): 23-9.
  38. Zin'kova N.N., Gilerovich E.G, Sokolova I.B., Viyde S.K., Shvedova E.V. et al. Therapy of ischemic cerebral stroke in rats using mesenchymal stem cells. *Tsitologiya*. 2007; 49(7): 566-75. (in Russian).
  39. Zhang L., Ma J., Jin X., Jia G., Jiang Y., Li C. L-PGDS Mediates Vagus nerve stimulation-induced neuroprotection in a rat model of ischemic stroke by suppressing the apoptotic response. *Neurochem Res*. 2017; 42(2): 644-55.
  40. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20(1): 84-91.
  41. Takano K., Tatlisumak T., Bergmann A.G., Gibson D.G., Fisher M. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. *J. Neurol. Sci*. 1997; 153(1): 8-11.
  42. Belayev L., Alonso O.F., Busto R., Zhao W., Ginsberg M.D. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke*. 1996; 27: 1616-22.
  43. Bilenko M.V. *Ischemic and reperfusion injury of organs. [Ishemicheskie i reperfusionnyye povrezhdeniya organov]*. Moscow; Meditsina; 1989. (in Russian).

44. Güzel A., Rölz R., Nikkhhah G., Kahlert U., Maciaczyk J. A microsurgical procedure for middle cerebral artery occlusion by intraluminal monofilament insertion technique in the rat: a special emphasis on the methodology. *Exp Transl Stroke Med.* 2014; 6: 6-10.
45. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S., Ginsberg M.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985; 17 (5): 497-504.
46. Holm L. *Focal ischemic reperfusion stroke model in rats and the role of galanin*: diss. Sweden; 2011.
47. Agafonova I.G., Kolosova N.G., Rasskazov V.A. Comparative analysis of cerebral circulation changes in rats with induced acute cerebrovascular accident by magnetic resonance imaging. *Tikhookeanskii meditsinskiy zhurnal.* 2012; 1: 104-7. (in Russian).
48. Silachev D.N., Uchevatkin A.A., Pirogov Yu.A., Zorov D.B., Isayev N.K. Comparison of magnetic resonance imaging and triphenyltetrazolium detection of brain injuries as methods of investigating experimental focal ischemia. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2009; 147(2): 223-6. (in Russian).
49. Savchenko E.S., Pevzner I.B., Zorova L.D., Silachev D.N., Babenko V.A. et al. Estimation of the change in the number of neurons, astrocytes and microglial cells in the brain after ischemic stroke by immunohistochemistry and immunoblotting. *Citologiya.* 2016; 58(7): 534-42. (in Russian).
50. Silachev D.N., Manskih V.N., Gulyaev M.V., Pevzner I.B., Zorova L.D. et al. The ischemia of the brain causes pathological changes similar to those observed in Alzheimer's disease. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2014; 4: 53-8. (in Russian).
51. Seredenin S.B., Silachev D.N., Gudasheva T.A., Pirogov Yu.A., Isaev N.K. Study of the neuroprotective effect of the dipeptide mimetic of the growth factor of the nerve GK-2 induction of experimental focal ischemia in the basin of the middle cerebral artery. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2011; 151(5): 518-9. (in Russian).
52. Belousova M.A., Korsakova E.A., Gorodetskaya E.A., Kalenikova E.I., Medvedev O.S. New antioxidants as neuroprotectors for ischemic brain damage and neurodegenerative diseases. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2014; 77(11): 36-44. (in Russian).
53. Shumikhina G.V., Danilova T.G. Evaluation of the effects of permanent extravasal occlusion of the left common carotid artery on the neurons of the forebrain of white rats. *Vestnik Novgorodskogo gosudarstvennogo universiteta im. Yaroslava Mudrogo.* 2016; 92 (6): 128-31. (in Russian).
54. Pei L., Meng S., Yu W., Wang Q., Song F., Ma L. Inhibition of microRNA-383 ameliorates injury after focal cerebral ischemia via targeting PPAR $\gamma$ . *Cell Physiol Biochem.* 2016; 39(4): 1339-46.
55. Milani D., Cross J.L., Anderton R.S., Blacker D.J., Knuckey N.W., Meloni B.P. Neuroprotective efficacy of poly-arginine R18 and NA-1 (TAT-NR2B9c) peptides following transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurosci Res.* 2017; 114: 9-15.
56. Sabbaghziarani F., Mortezaee K., Akbari M., Kashani I.R., Soleimani M. et al. Stimulation of neurotrophic factors and inhibition of proinflammatory cytokines by exogenous application of triiodothyronine in the rat model of ischemic stroke. *Cell Biochem Funct.* 2017; 35 (1): 50-5.
57. Shugalev N.P., Stavrovskaya A.V., Yamshikova N.G., Olshansky A.S., Miroschnichenko E.V. Reproduction of passive avoidance reactions after administration of neurotensin to the adjacent nucleus of the brain in rats against the background of the action of reserpine. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova.* 2012; 62(3): 357. (in Russian).
58. Stavrovskaya A.V., Yamshchikova N.G., Olshansky A.S., Babkin G.A., Illarionishkin S.N. Evaluation of the effects of new peptide compounds in experimental animals with toxic models of Alzheimer's disease *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy nevrologii.* 2016; 10(2): 33-41. (in Russian).
59. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wechtel M.S., Ginsberg M.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985; 17 (5): 497-504.
60. Romanova G.A., Silachev D.N., Shakova F.M., Kvashennikova Yu.N. Features of training in the water maze labyrinth in rats with ischemic injury of the prefrontal cortex. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2008; 4: 19-21. (in Russian).
61. Mukhina I.V., Bugrova M.L., Romanova G.A., Shakova F.M., Prodius P.A. Ultrastructural changes in the contralateral region of the perifocal zone of a local ischemic focus caused by photoinduced thrombosis of the prefrontal cerebral cortex. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2010; 4: 43-8. (in Russian).
62. Sviridkina N.B., Shakova F.M., Komissarova S.V., Dubrovin I.P., Turygina S.A. et al. Morphofunctional study of the effect of antiorthostatic hypokinesia in focal ischemic injury of the cerebral cortex. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2012; 2: 22-6. (in Russian).
63. Barskov I.V., Stelmashuk E.V., Romanova G.A., Khaspekov L.G. Morphological study of neuroprotective properties of the dipeptide mimetics of nerve growth factor (GK-2H) in focal ischemic injury of the prefrontal cerebral cortex of rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2013; 4: 17-20. (in Russian).
64. Morris G.P., Wright A.L., Tan R.P., Gladbach A., Ittner L.M., Visser B. A comparative study of variables influencing ischemic injury in the longa and koizumi methods of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in mice. *PLoS One.* 2016; 11(2): e0148503.

**Сведения об авторах:**

**Гельцер Борис Израилевич**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН;

**Слабенко Эллада Владимировна**, канд. мед. наук, доцент;

**Заяц Юлия Витальевна**, аспирант;

**Котельников Владимир Николаевич**, доктор мед. наук, доцент, e-mail: vkotelnikov@hotmail.com

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Плюхин Д.В.<sup>1</sup>, Асташина Н.Б.<sup>2</sup>, Соснин Д.Ю.<sup>2</sup>, Мудрова О.А.<sup>2</sup>

## Экспериментальная модель периимплантита

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, г. Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614990, г. Пермь, Россия, ул. Петропавловская, д. 26

**Цель исследования** — разработка и оценка эффективности экспериментальной модели периимплантита, как осложнения при дентальной имплантации.

**Методика.** Предложена экспериментальная модель для изучения процесса формирования осложнений (периимплантита) после дентальной имплантации. Периимплантит моделировали на белых крысах в 2 этапа. На первом этапе 50 крысам экстрагировали первый моляр верхней челюсти слева. На втором этапе осуществляли имплантацию. Использовали модели - импланты, изготовленные не фабричным способом из чистого титана. Животные были разделены на 2 группы. Основную группу составили 25 крыс с моделированием периимплантита. Периимплантит моделировали путем создания нестабильности положения импланта за счет наложения лигатуры из хлопковой нити на область его шейки. Группу сравнения составили 24 крысы с установкой импланта без моделирования условий для формирования периимплантита.

**Результаты.** Приведено подробное описание модели эксперимента. Результаты оценивали через 12 нед после имплантации. В основной группе периимплантит развился у 86,4% животных (19 из 22), в группе сравнения у 17,4% (4 из 23).

**Заключение.** Предложенный способ является эффективной экспериментальной моделью для формирования периимплантита, что позволяет использовать ее для изучения патофизиологии формирования и оценки различных методов профилактики и лечения данного осложнения.

**Ключевые слова:** дентальная имплантация; периимплантит; моделирование периимплантационных осложнений; осложнения дентальной имплантации.

**Для цитирования:** Плюхин Д.В., Асташина Н.Б., Соснин Д.Ю., Мудрова О.А. Экспериментальная модель периимплантита. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 153-158.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.153-158.

**Для корреспонденции:** Соснин Дмитрий Юрьевич, проф. каф. клинической лаб. диагностики, доктор мед. наук, ФГБОУ ВО ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, e-mail: sosnin\_dm@mail.ru

**Финансирование.** Работа не имеет финансовой поддержки.

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

**Поступила** 14.08.2018

Pliukhin D.V.<sup>1</sup>, Astashina N.B.<sup>2</sup>, Sosnin D.Yu.<sup>2</sup>, Mudrova O.A.<sup>2</sup>

## AN EXPERIMENTAL MODEL OF PERI-IMPLANTITIS

<sup>1</sup> South Ural State Medical University, Voroyskogo Str., 64, Chelyabinsk 454092;

<sup>2</sup> E.A. Vagner Perm State Medical University, Petropavlovskaya Str. 26, Perm 614990, Russia

**Aim.** To present an experimental model of complications following dental implantation (peri-implantitis).

**Methods.** Peri-implantitis was modeled on white rats (n=50) in two steps. At the first step, the first molar was extracted from the left side of the upper jaw. At the second step, the implantation was performed. Non-commercial implants made of pure titanium were used. The animals were divided into two groups. The main group consisted of 25 rats with peri-implantitis modeled by creating instability of the implant position by ligation of the implant neck area with a cotton thread. The comparison group (n=24) consisted of rats with an installed implant without modeling peri-implantitis.

**Results.** A detailed description of the experimental model was provided. The outcome was evaluated at 12 weeks after implantation. In the main group, peri-implantitis developed in 86.4% of rats in the experimental group vs. 17.4% in the comparison group.

**Conclusion.** The suggested method is an effective experimental model of peri-implantitis, which allows studying the pathophysiology of peri-implantitis and evaluating different methods for prevention and treatment of this complication.

**Keywords:** dental implantation; peri-implantitis; modeling of peri-implantation complications; complications of dental implantation.

**For citation:** Pliukhin D.V., Astashina N.B., Sosnin D.Yu., Mudrova O.A. An experimental model of peri-implantitis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 153-158. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.153-158

**For correspondence:** Sosnin Dmitriy Yur'evich, e-mail: sosnin\_dm@mail.ru

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

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

**Received** 14.08.2018

Одним из наиболее эффективных способов замещения дефектов зубных рядов является дентальная имплантация. В последние годы значительно расширились возможности и перспективы применения рассматриваемого метода лечения пациентов, как при частичном, так и при полном отсутствии зубов [1, 2]. Расширение показаний к применению дентальных имплантатов привело к увеличению числа местных осложнений, и как следствие — неудачных исходов лечения [1–4].

Несмотря на то, что имплантация в последние годы характеризуется высоким уровнем удовлетворительных результатов в раннем послеоперационном периоде, актуальной проблемой остается прогнозирование отдаленных осложнений, которые связаны, как правило, с развитием воспалительных процессов в тканях, окружающих имплант [3, 5, 6]. На сегодняшний день выделяют 2 основных воспалительных процесса, осложняющих периимплантационный период: периимплантационный мукозит и периимплантит [5–7]. При этом под понятием периимплантационный мукозит понимают воспалительный процесс в окружающих мягких тканях, а под периимплантитом — воспалительные реакции со стороны твердых тканей, окружающих имплантат, сопровождающиеся нарушением опорной функции кости. При этом эти два процесса соотносятся между собой как гингивит и пародонтит у пациентов без применения имплантации. По данным различных авторов мукозит наблюдается чаще. Его частота после имплантации варьирует от 32% до 52% [6]. Периимплантит регистрируется реже, с частотой от 14 до 30 % [6]. Но основной причиной неудачных имплантаций является именно развитие периимплантита [7]. Частота отторжений имплантатов вследствие развития периимплантита закономерно увеличивается по мере расширения клинических показаний к применению данного метода ортопедического лечения стоматологических заболеваний.

Изучение патофизиологических процессов, ведущих к развитию осложнений, в частности к формированию периимплантита, а также всесторонний анализ

полученных данных, будет способствовать повышению эффективности дентальной имплантации [6, 8, 9]. В связи с этим представляет интерес разработка экспериментальных моделей формирования таких осложнений.

**Цель исследования:** разработка и оценка эффективности экспериментальной модели формирования осложнений в виде периимплантита при дентальной имплантации.

## Методика

Исследование выполнено с соблюдением этических принципов проведения медицинских исследований с участием лабораторных животных в качестве субъектов, изложенных в Хельсинской декларации ВОЗ. На его проведение получено одобрение этического комитета Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера.

**Экспериментальные животные.** Экспериментальные исследования проводились на 40 аутбредных белых крысах «Вистар», самцах. Возраст животных составлял 8–28 нед, масса 190–273 г. Общая продолжительность эксперимента — 20 нед. В начале эксперимента участвовали 50 крыс, к концу 2-го этапа эксперимента выжили 45 крыс (**табл. 1**).

На первом этапе у всех животных под ингаляционным наркозом экстрагировали первый моляр верхней челюсти слева.

После 1-го этапа умерла 1 крыса (гнойно-септические осложнения вследствие неудачной экстракции зуба). Оставшимся 49 крысам через 8 нед после экстракции зуба была проведена операция имплантации. Перед 2-м этапом эксперимента животные были разделены на основную группу (25 крыс), у которых моделировали периимплантит и группу сравнения (24 крысы), которым устанавливали имплант.

После начала эксперимента животные размещались по 2 особи в клетке в стандартных условиях вивария. Первые сутки после операций (экстракция моляра на первом этапе и имплантация на втором этапе) животные были лишены пищи при свободном досту-

пе к воде. В последующие 14 сут гранулированный корм был заменен на порошкообразный и мягкий корм. Гранулированный и твердый корм начинали давать животным только с 15-х сут эксперимента.

Конечные результаты эксперимента по моделированию периимплантита оценивали на 84-е сут (12-я нед) с момента операции имплантации.

Для имплантации использовали имплантаты винтового типа, изготовленные из чистого титана. Общая длина 4 мм из них: резьба — 2,2 мм, шейка импланта — 2 мм диаметр шейки — 2 мм; ширина — 1,6 мм, апекс импланта — 1,4 мм. Шаг резьбы-0,1 мм (рисунок).

Для формирования периимплантита использовали модель создания нестабильности имплантации за счет наложения лигатуры на область шейки импланта. Применяли белую шелковую нестерильную крученую нить № 2 по ГОСТ 396-84 (ООО «Моснитки», Россия) диаметром 325 мкм. Выбор шелковой нити обусловлен особенностями материала. Шелк даже в неинфи-

цированном виде способен вызывать асептическое воспаление. Шелк обладает выраженной сорбционной способностью и фитильными свойствами, поэтому может служить резервуаром и проводником микроорганизмов. Все это обуславливает дополнительное повреждение окружающих тканей и препятствует репаративным процессам в очаге повреждения [10].

Лигатуру предварительно накладывали на область головки импланта, обматывая 3 раза (в первую окружность борозды) таким образом, чтобы лигатура после завершения операции размещалась между головкой и слизистой оболочкой десны. Это обеспечивало нестабильность интеграции импланта в костную ткань с последующим развитием предпосылок к формированию осложнений, что вело к развитию периимплантита.

*Статистическая обработка.* Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA v. 7 (StatSoft Inc., США). Сравнение частот в двух несвязанных выбор-

A



Имплантат, использованный в эксперименте (A – внешний вид, B – чертеж).

B

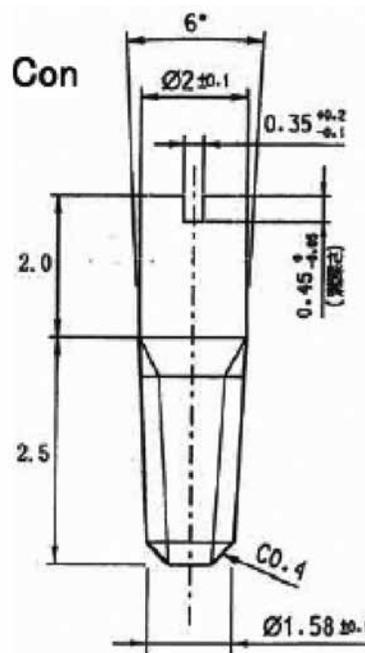


Таблица 1

**Динамика численности экспериментальных животных в ходе исследования**

	Начало первого этапа	Конец первого этапа		Начало второго этапа	Конец второго этапа
Количество животных	50	49	основная группа	25	22
			группа сравнения	24	23

ках осуществляли с помощью таблиц сопряженности 2×2 используя критерий хи-квадрат.

Таблица 2

Результаты формирования перимплантита у экспериментальных животных

Результаты	Основная группа (n = 22)	Группа сравнения (n=23)
Признаки периимплантита есть	19 (86,4 %)	4 (17,4%)
Признаки периимплантита отсутствуют	3 (13,6 %)	19 (82,6%)

### Результаты и обсуждение

Результаты моделирования периодонтита существенно различались в экспериментальных группах. К концу 2-го этапа выжило 45 из 50 животных (табл. 1). В абсолютных показателях количество погибших животных в группах различалось, но различие не было статистически значимым ( $\chi^2 = 1,378788; p < 0,240309$ ).

Осмотр животных для оценки состояния характеризующего развитие постимплантационных осложнений осуществляли еженедельно. Для диагностики периимплантита использовали следующие критерии [1, 3, 5]:

- подвижность импланта под воздействием механических факторов;

- отечность и гиперемия слизистой вокруг импланта.

Окончательное решение о формировании периимплантита принималось на 12-й нед после имплантации. Результаты представлены в таблице (табл. 2).

Результаты моделирования периодонтита статистически значимо различались в группах экспериментальных животных.

Частота развития периимплантита в основной группе в 4,75 раза превысила частоту его развития в группе сравнения ( $\chi^2 = 69,72368; p < 0,000000$ ).

Выбор титана как материала для изготовления импланта обусловлен его свойствами. Именно титан наиболее часто используется для изготовления различных протезов, устанавливаемых в ткани живых организмов, в том числе и в ортопедической стоматологии [11]. Это обусловлено его инертностью и отсутствием воспалительной реакции со стороны костной ткани и слизистой после его имплантации. Именно титан используется для изготовления различными производителями имплантов.

Выбор нити и модели с ее наложением на область импланта соприкасающуюся с костной тканью и слизистой обусловлен рядом обстоятельств. Ведущим моментом в формировании периимплантита является развитие воспалительного процесса в периимплантных тканях вследствие воспалительной реакции и нестабильности механического соединения импланта в костной ткани [5–7]. Для формирования механической нестабильности положения имплантата и развития воспалительных осложнений имплантат устанавливали с предварительно наложенной лигатурой. Такой метод создания нестабильности импланта широко используется в экспериментальных исследова-

ниях при моделировании воспалительной реакции и нарушения закрепления импланта в костной ткани. В частности, в ортопедической стоматологии применяется наложение нитей из различных материалов на пришеечную часть импланта : хлопковой нити, шелковой нити, нити из синтетических полимеров (нейлон, полиэстер и другие) [11–14], а также металлической нити из нержавеющей стали [15]. В литературе приводятся данные о зависимости прогрессирования периодонтита от структурных различий поверхности используемых материалов [13].

В литературе описаны экспериментальные модели формирования периимплантита у различных животных: приматов [16], собак [15, 17, 18], мышей [19–22], а также крыс [23, 24]. По нашему мнению, для эксперимента наиболее подходящей моделью являются крысы. В отличие от собак и приматов они не требуют больших экономических затрат на содержание и характеризуется достаточно быстрым периодом взросления. В отличие от мышей у крыс большие размеры челюстей, что облегчает выполнение операции имплантации.

### Заключение

Таким образом, предложенный способ является эффективной экспериментальной моделью для формирования периимплантита, что позволяет использовать ее для изучения патогенеза формирования осложнений и оценки различных методов профилактики и лечения данного осложнения.

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

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

### Литература

1. Гуськов А. В., Митин Н.Е., Зиманков Д. А., Мирнигматова Д. Б., Гришин М. И. Дентальная имплантация: состояние вопроса на сегодняшний день (обзор литературы). *Клиническая стоматология*. 2017; 82: 32-4.

2. Gaviria L., Salcido J.P., Guda T., Ong J.L. Current trends in dental implants. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2014; 40(2): 50-60. <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2014.40.2.50>
3. Блинова А.В., Рюмшин Р.А., Румянцев В.А. Перимплантит – основное осложнение дентальной имплантации (обзор литературы). *Верхневолжский медицинский журнал.* 2018; 17(1): 13-8.
4. Wilson T.G. The positive relationship between excess cement and peri-implant disease: a prospective clinical endoscopic study. *J. Periodontol.* 2009; 80(9): 1388-92. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090115>.
5. Lee C.T., Huang Y.W., Zhu L., Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017; 62: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.04.011>.
6. Машченко И.С., Гударьян А.А., Ширинкин С.В. Факторы риска и прогнозирования развития воспалительных осложнений и локального вторичного остеопороза в костных структурах челюстей при дентальной внутрикостной имплантации у здоровых пациентов. *Медицині перспективи.* 2013; 18(1): 19-27.
7. Михальченко Д.В., Яковлев А.Т., Бардак Е.Ю., Михальченко А.В. Проблема воспаления в перимплантатных тканях и факторы, влияющие на его течение (обзор литературы). *Волгоградский научно-медицинский журнал.* 2015; 4: 15-8.
8. Асташина Н.Б. Обоснование возможности применения новых имплантационных систем на этапах комплексного лечения больных с дефектами челюстных костей. *Институт стоматологии.* 2010; 1(46): 90-1.
9. Monije A., Insua A., Rakis M., Nart J., Moyano-Cuevas J.L., Wang H.L. Estimation of the diagnostic accuracy of clinical parameters for monitoring peri-implantitis progression: an experimental canine study. *J Periodontol.* 2018; Jul 16. [Epub ahead of print] <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0081>.
10. Бонцевич Д.Н. *Хирургический шовный материал.* 2005, Москва, Интеграция; 2005.
11. Lindhe J., Berglundh T., Ericsson I., Liljenberg B., Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res.* 1992; 3(1): 9-16. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1992.030102.x>.
12. Marinello C.P., Berglundh T., Ericsson I., Klinge B., Glantz P.O., Lindhe J. Resolution of ligature-induced peri-implantitis lesions in the dog. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 475-9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1995.tb00180.x>.
13. Baron M., Haas R., Dörtbudak O., Watzek G., Experimentally induced peri-implantitis: A review of different treatment methods described in the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000; 15(4): 533-44.
14. Washio K., Tsutsumi Y., Tsumanuma Y., Yano K., Srithanyarat S.S., Takagi R., et al. *In vivo* periodontium formation around titanium implants using periodontal ligament cell sheet. *Tissue Eng Part A.* 2018; 24(15-16): 1273-82. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2017.0405>.
15. Lin X., Liu T., Wu G., Zheng Y., Wismeijer D., Liu Y. Peri-implantitis induced by stainless steel ligature in beagle dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2017. 37(3): e170-e179. <https://doi.org/10.11607/prd.3153>.
16. Fritz M.E., Braswell L.D., Koth D., Jeffcoat M., Reddy M., Cotsonis G. Experimental peri-implantitis in consecutively placed, loaded root-form and plate-form implants in adult *Macaca mulatta* monkeys. *J Periodontol.* 1997; 68(11): 1131-5. <https://doi.org/10.1902/jop.1997.68.11.1131>.
17. Martins O., Ramos J.C., Baptista I.P., Dard M.M. The dog as a model for peri-implantitis. A Review. *J Invest Surg.* 2014; 27(1): 50-6. <https://doi.org/10.3109/08941939.2013.828805>.
18. Fickl S., Kebschull M., Calvo-Guirado J.L., Hürzeler M., Zuhr O. Experimental peri-implantitis around different types of implants – a clinical and radiographic study in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015; 17(2): e661-9. <https://doi.org/10.1111/cid.12303>.
19. Becker S.T., Föge M., Beck-Broichsitter B.E., Gavrilova O., Bolte H., Rosenstiel P., et al. Induction of periimplantitis in dental implant. *J Craniofac Surg.* 2013; 24(1): e15-8. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e318266fb2d>.
20. Piri F.Q., Hiyari S, Leung H.Y., Barroso A.D, Jorge A.C, Perussolo J., et al. A Murine Model of Lipopolysaccharide-Induced Peri-Implant Mucositis and Peri-Implantitis. *J Oral Implantol.* 2015; 41(5): e158-e164. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-14-00068>.
21. Piri FQ, Hiyari S, Barroso AD, et al. Ligature-Induced Peri-Implantitis in Mice. *Journal of periodontal research.* 2015;50(4):519-524. doi:10.1111/jre.12234.
22. Hiyari S., Wong R.L., Yaghsezi A., Naghibi A., Tetradis S., Camargo P.M., et al. Ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in mice. *J Clin Periodontol.* 2018; 45(1): 89-99. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12817>.
23. Koutouzis T., Eastman C., Chukkappalli S., Larjava H., Kesavalu L. A novel rat model of polymicrobial peri-implantitis: a preliminary study. *J. Periodontol.* 2017; 88(2): e32-e41. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160273>.
24. Schwarz F., Sculean, A., Engebretson, S.P., Becker, J. Animal models for peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontology 2000.* 2015; 68(1): 168-81. <https://doi.org/10.1111/prd.12064>.

## References

1. Gus'kov A.V., Mitin N.E., Zimankov D.A., Mirnigamova D.B., Grishin M.I. Dental implantation: the state of the issue for today (review of the literature). *Klinicheskaya stomatologiya.* 2017; 82: 32-4. (in Russian)
2. Gaviria L., Salcido J.P., Guda T., Ong J.L. Current trends in dental implants. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2014; 40(2): 50-60. <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2014.40.2.50>.
3. Blinova A.V., Rymshin R.A., Rumyantsev V.A. Peri-implantitis is the main complication of dental implantation. *Verkhnevolskiy meditsinskiy zhurnal.* 2018; N1: 13-8. (in Russian)
4. Wilson T.G. The positive relationship between excess cement and peri-implant disease: a prospective clinical endoscopic study. *J. Periodontol.* 2009; 80(9): 1388-92. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090115>
5. Lee C.T., Huang Y.W., Zhu L., Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017; 62: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.04.011>.
6. Mashchenko I.S., Gudar'yan A.A., Shirinkin S.V. Risk factors and prognosis for the development of inflammatory complications and local secondary osteoporosis in the bone structures of the jaws in dental intraosseous implantation in healthy patients. *Medichni perspektivi.* 2013; 18(1): 19-27. (in Russian)
7. Mikhal'chenko D.V., Yakovlev A.T., Badrak E.Yu., Mikhal'chenko A.V. The problem of inflammation in peri-implant tissues and the factors influencing its course (literature review). *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal.* 2015; 4: 15-8. (in Russian)
8. Astashina N.B. Substantiation of the possibility of using new implantation systems at the stages of complex treatment of patients with jaw bone defects. *Institut stomatologii.* 2010; 1(46): 90-1. (in Russian)
9. Monije A., Insua A., Rakis M., Nart J., Moyano-Cuevas J.L., Wang H.L. Estimation of the diagnostic accuracy of clinical parameters for

- monitoring peri-implantitis progression: an experimental canine study. *J Periodontol.* 2018; Jul 16. [Epub ahead of print] <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0081>.
10. Bontsevich D. N. *Surgical suture material.* Moscow, Integratsiya; 2005. (in Russian)
  11. Lindhe J., Berglundh T., Ericsson I., Liljenberg B., Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res.* 1992; 3(1): 9-16. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1992.030102.x>
  12. Marinello C.P., Berglundh T., Ericsson I., Klinge B., Glantz P.O., Lindhe J. Resolution of ligature-induced peri-implantitis lesions in the dog. *J Clin Periodontol.* 1995; 22:475-9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1995.tb00180.x>
  13. Baron M., Haas R., Dörtbudak O., Watzek G., Experimentally induced peri-implantitis: A review of different treatment methods described in the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000; 15(4): 533-44.
  14. Washio K., Tsutsumi Y., Tsumanuma Y., Yano K., Srithanyarat S.S., Takagi R., et al. *In vivo* periodontium formation around titanium implants using periodontal ligament cell sheet. *Tissue Eng Part A.* 2018; 24(15-16): 1273-82. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2017.0405>.
  15. Lin X., Liu T., Wu G., Zheng Y., Wismeijer D., Liu Y. Peri-implantitis induced by stainless steel ligature in beagle dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2017; 37(3): e170-e179. <https://doi.org/10.11607/prd.3153>.
  16. Fritz M.E., Braswell L.D., Koth D., Jeffcoat M., Reddy M., Cotsonis G. Experimental peri-implantitis in consecutively placed, loaded root-form and plate-form implants in adult *Macaca mulatta* monkeys. *J Periodontol.* 1997; 68(11): 1131-5. <https://doi.org/10.1902/jop.1997.68.11.1131>.
  17. Martins O., Ramos J.C, Baptista I.P., Dard M.M. The dog as a model for peri-implantitis. A Review. *J Invest Surg.* 2014; 27(1): 50-6. <https://doi.org/10.3109/08941939.2013.828805>.
  18. Fickl S., Kebschull M., Calvo-Guirado J.L., Hürzeler M., Zuhr O. Experimental peri-implantitis around different types of implants – a clinical and radiographic study in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015; 17(2): e661-9. <https://doi.org/10.1111/cid.12303>.
  19. Becker S.T., Föge M., Beck-Broichsitter B.E., Gavrilova O., Bolte H., Rosenstiel P., et al. Induction of periimplantitis in dental implant. *J Craniofac Surg.* 2013; 24(1): e15-8. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e318266fb2d>.
  20. Piri F.Q., Hiyari S, Leung H.Y., Barroso A.D, Jorge A.C, Perusollo J., et al. A Murine Model of Lipopolysaccharide-Induced Peri-Implant Mucositis and Peri-Implantitis. *J Oral Implantol.* 2015; 41(5): e158-e164. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-14-00068>.
  21. Piri FQ, Hiyari S, Barroso AD, et al. Ligature-Induced Peri-Implantitis in Mice. *Journal of periodontal research.* 2015; 50(4): 519-524. doi:10.1111/jre.12234.
  22. Hiyari S., Wong R.L., Yaghsejian A., Naghibi A., Tetradis S., Camargo P.M., et al. Ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in mice. *J Clin Periodontol.* 2018; 45(1): 89-99. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12817>.
  23. Koutouzis T., Eastman C., Chukkapalli S., Larjava H., Kesavalu L. A novel rat model of polymicrobial peri-implantitis: a preliminary study. *J. Periodontol.* 2017; 88(2): e32-e41. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160273>.
  24. Schwarz F., Sculean, A., Engebretson, S.P., Becker, J. Animal models for peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontology* 2000. 2015; 68(1): 168-81. <https://doi.org/10.1111/prd.12064>.

#### Сведения об авторах:

**Плюхин Дмитрий Владимирович**, канд. мед. наук, доцент каф. ортопедической стоматологии и ортодонтии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, e-mail: d.pluhin@yandex.ru ;

**Асташина Наталья Борисовна**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, e-mail: caddis@mail.ru;

**Соснин Дмитрий Юрьевич**, доктор мед. наук, проф. каф. клинической лаб. диагностики ФГБОУ ВО ПГМУ им. акад. Е. А. Вагнера Минздрава России, e-mail: sosnin\_dm@mail.ru;

**Мудрова Ольга Александровна**, доктор мед. наук, проф., зав. курсом нейрореабилитологии каф. неврологии с курсом нейрореабилитологии дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, e-mail: moa.perm@yandex.ru