

ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:

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

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

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

ЛР №010215 от 29.04.97.

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

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

5-летний ИФ РИНЦ 0,673

Журнал включен в базу данных Scopus
Журнал «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» индексируется в следующих иностранных изданиях:
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 17.06.2019
Подписано в печать 27.06.2019

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и экспер. тер.
2019. Том 63. № 3. 1–154

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, № 3, 2019

Июль–Август

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
E-mail: path.physiol@yandex.ru

ISSN 0031-2991

Publisher: Irishkin Dmitry
e-mail: genius-media@mail.ru

Pathological physiology
and experimental therapy
2019. Vol. 63. № 3. 1–154

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

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, № 3, 2019

July—August

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)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Ремизова М.И., Гришина Г.В., Гербут К.А., Александрия Л.Р., Рыбакова Л.П.** Влияние регуляторов синтеза оксида азота на состояние оксидантно-антиоксидантной системы при инфузионной терапии геморрагического шока в эксперименте 4
- Покусаева Д.П., Аниховская И.А., Коробкова Л.А., Яковлев М.Ю.** Возрастные и гендерные особенности показателей системной эндотоксинемии и их взаимосвязь с общепризнанными лабораторными факторами риска атеросклероза 13
- Мавзютов А.Р., Гарифутдинов Р.Р., Габдрахманова А.Р., Салахов И.М., Тупиев И.Д.** Липополисахарид *Sinorhizobium meliloti* стимулирует гемопоэз при вторичном иммунодефиците в эксперименте 20
- Тарасова М.В., Елистратова И.В., Морозов С.Г.** Экспрессия рецепторов нейтрофилов периферической крови при обострении атопического дерматита у взрослых мужчин 29
- Труш В.В., Соболев В.И.** Оценка эффективности β_2 -адреноагониста формотерола в компенсации электрофизиологических проявлений стероидной миопатии в модельных экспериментах на животных 35
- Бедина С.А., Трофименко А.С., Мозговая Е.Э., Зборовская И.А.** Энзимное профилирование плазмы крови и лимфоцитов при системной красной волчанке: фокус на ферменты пуринового и пиримидинового метаболизма 48
- Иванов А.С., Тарасенко Е.В., Гармаш И.В., Мяндина Г.И., Аришева О.С., Желудова Е.М., Азова М.М., Теребилина Н.Н., Баронец В.Ю., Кобалава Ж.Д.** Влияние маркеров эндотелиальной дисфункции, цитокинового статуса, гена коллагена COL1A1_1 на развитие фиброза печени у пациентов, злоупотребляющих алкоголем 55
- Казицкая А.С., Ядыкина Т.К., Бугаева М.С., Жукова А.Г., Михайлова Н.Н., Горохова Л.Г.** Патологические механизмы иммунной реактивности на организм фторида натрия 64
- Балботкина Е.В., Спириденко Е.А., Каравашкина Т.А., Кутина А.В.** Влияние ингибитора дипептидилпептидазы-4 на выведение ионов натрия и воды почками у крыс при изменениях водно-солевого баланса 73
- Иванов А.Н., Куртукова М.О., Козадаев М.Н., Суrowцева К.А., Савельева М.С., Бугаева И.О., Параконский Б.В., Блишников В.В., Гладкова Е.В., Бабушкина И.В., Чибрикова Ю.А., Норкин И.А.** Влияние на регенерацию костной ткани локальных изменений ионного и ферментативного гомеостаза скаффолдами из поликапролакона минерализованными ватеритом 81
- Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г.** Роль суммарных РНК лимфоидных и стволовых клеток в коррекции уровня глюкозы в крови при экспериментальном сахарном диабете 88
- Бакулин Д.А., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Логвинова Е.О., Авдиенко К.А., Тюреньков И.Н.** Психоневрологические нарушения у животных с ишемией головного мозга на фоне сахарного диабета и их коррекция новым агонистом GPR119 и его комбинациями с метформином и цитиколином 96
- Филимонова М.В., Макаrchук В.М., Шевченко Л.И., Филимонов А.С.** Исследование влияния ингибитора NOS T1023 в сочетании с γ -излучением и циклофосфамидом на рост и метастазирование карциномы легких Льюис 105

ОБЗОРЫ

- Джусоева Е.В., Колокольцова Т.Д., Сабурин И.Н.** Меланоциты кожи человека: их роль в норме и патологии 110
- Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Воронков Н.С., Бушов Ю.В.** Ангиотензин II и его роль в регуляции толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии. Ингибиторы АПФ и антагонисты АТ1-рецептора ангиотензина II 118
- Шкурлатовская К.М., Орлова А.С., Силина Е.В., Синельникова Т.Г., Олисова О.Ю., Теплюк Н.П., Борзова Е.Ю., Дадаева В.А., Пятилова П.М.** Молекулярно-генетические механизмы мастоцитоза 127

МЕТОДИКА

- Чернядьев С.А., Аретинский В.Б., Сивкова Н.И., Жилияков А.В., Коробова Н.Ю., Горбатов В.И., Медведева С.Ю.** Моделирование ex vivo процесса термотерапии стенки кисты Бейкера в изотермическом режиме 134
- Арзуманян В.Г., Иксанова А.М., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Мальбахова Е.Т.** Экспериментальная модель лечения вагинальных дисбиозов с помощью фракции сывроточных антимикробных пептидов 141
- Колпакова М.Э., Бельдиман Л.Н., Яковлева А.А., Кирик О.В., Коржевский Д.Э., Власов Т.Д.** Применение иммуногистохимической реакции на нестин для определения размеров повреждения мозга при транзиторной окклюзии средней мозговой артерии 148

ORIGINAL ARTICLE

- Remizova M.I., Grishina G.V., Gerbout K.A., Aleksanyan L.R., Rybakova L.P.** The oxidation-antioxidation system in hemorrhagic shock and infusion therapy with regulators of the synthesis of nitric oxide 4
- Pokusaeva D.P., Anikhovskaya I.A., Korobkova L.A., Yakovlev M.Yu.** Age and gender characteristics of indicators of systemic endotoxemia and their relationship with generally accepted laboratory risk factors for atherosclerosis 13
- Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R., Gabdrakhmanova A.R., Salakhov I.M., Tupiyev I.D.** Effect of *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide on blood cell composition in experiment 20
- Tarasova M.V., Elistratova I.V., Morozov S.G.** Neutrophil receptor expression in peripheral blood of adult male patients with exacerbation of atopic dermatitis 29
- Trush V.V., Sobolev V.I.** Efficacy of the β_2 -adrenergic agonist formoterol in compensation of electrophysiological manifestations of steroid myopathy in animal experiments 35
- Bedina S.A., Trofimenko A.S., Mozgovaya E.E., Zborovskaya I.A.** Enzymatic profiling of blood plasma and lymphocytes in systemic lupus erythematosus: focus on purine and pyrimidine metabolizing enzymes 48
- Ivanov A.S., Tarasenko E.V., Garmasch I.V., Myandina G.I., Arisheva O.S., Zheludova E.M., Azova M.M., Terebiline N.N., Baronets V.Yu., Kobalava Zh.D.** Markers of endothelial dysfunction, cytokine status, collagen COL1A1_1 gene on the development of liver fibrosis in alcohol abusers 55
- Kazitskaya A.S., Yadykina T.K., Bugaeva M.S., Zhukova A.G., Mikhailova N.N., Gorokhova L.G.** Pathophysiological mechanisms of immune reactivity of the liver under the conditions of prolonged experimental exposure of sodium fluoride on the body to sodium fluoride 64
- Balbotkina E.V., Spiridenko E.A., Karavashkina T.A., Kutina A.V.** Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor on urinary sodium and water excretion in rats with water-salt disbalance 73
- Ivanov A.N., Kurtukova M.O., Kozadaev M.N., Surowtseva K.A., Savel'eva M.S., Bugaeva I.O., Parakhonskiy B.V., Blinnikova V.V., Gladkova E.V., Babushkina I.V., Chibrikova Yu.A., Norkin I.A.** The effect of local changes in ionic and enzymatic homeostasis induced by polycaprolactone scaffolds mineralized with vaterite on bone tissue regeneration 81
- Gevorgyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G.** The role of lymphoid and stem cell total RNAs in correction of blood glucose level in experimental diabetes mellitus 88
- Bakulin D.A., Kurkin D.V., Volotova E.V., Logvinova E.O., Avdienko K.A., Tyurenkov I.N.** Neurological disorders in animals with cerebral ischemia and diabetes mellitus and their correction by a new agonist GPR119 and its combinations with metformin and citicoline 96
- Filimonova M.V., Makarchuk V.M., Shevchenko L.I., Filimonov A.S.** Effects of the NOS inhibitor T1023 in the combination with γ -irradiation and cyclophosphamide on the growth and metastasis of Lewis lung carcinoma 105

REVIEWS

- Djussoeva E.V., Kolokoltsova T.D., Saburina I.N.** Human skin melanocytes: their role in normal and pathological conditions 110
- Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Tsibulnikov S.Yu., Voronkov N.S., Bushov Yu.V.** Angiotensin II and its role in the regulation of heart tolerance to ischemia/reperfusion impact. ACE inhibitors and angiotensin II AT1 receptor antagonists 118
- Shkurlatovskaia K.M., Orlova A.S., Silina E.V., Sinelnikova T.G., Olishova O.Y., Teplyuk N.P., Borzova E.Y., Dadaeva V.A., Pyatilova P.M.** Molecular and genetic mechanisms mastocytosis 127

METHODS

- Chernyadev S.A., Aretinsky V.B., Sivkova N.I., Zhilyakov A.V., Korobova N.Yu., Gorbатов V.I., Medvedeva S.Yu.** Ex vivo modeling of thermotherapy of Baker's cysts 134
- Arzumanyan V.G., Iksanova A.M., Artemyeva T.A., Butovchenko L.M., Malbakhova Y.T.** Experimental model for treatment of vaginal dysbiosis with a fraction of serum antimicrobial peptides 141
- Kolpakova M.E., Beldiman L.N., Yakovleva A.A., Kirik O.V., Korzhevsky D.E., Vlasov T.D.** The use of an immunohistochemical reaction for nestin determining the size of brain injury after transient occlusion of the middle cerebral artery 148

Ремизова М.И., Гришина Г.В., Гербут К.А., Алексанян Л.Р., Рыбакова Л.П.

Влияние регуляторов синтеза оксида азота на состояние оксидантно-антиоксидантной системы при инфузионной терапии геморрагического шока в эксперименте

ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России»,
191024, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. 2-я Советская, д.16

При различных видах шока, включая геморрагический шок, развивается оксидативный стресс. Большое значение в отношении исхода тяжелой кровопотери имеет состояние оксидантно-антиоксидантной системы организма. **Цель** работы – изучение в эксперименте состояния кровообращения, кислородного режима организма, а также оксидантно-антиоксидантной системы при геморрагическом шоке и его инфузионной терапии. **Методика.** Эксперименты проведены на кроликах, находящимся под тиопенталовым наркозом. Геморрагический шок моделировали кровопусканием с снижением АД до 40–60 мм рт. ст. и последующей гипотензией в течение 30–40 мин, после чего начинали инфузию кровезаменителя. Общий объем кровопотери составлял $18,5 \pm 0,6$ мл/кг массы. Эффективность инфузионной терапии оценивали по показателям системной гемодинамики, микроциркуляции и показателям активности оксидантно-антиоксидантной системы. К инфузионной среде, состоящей из изотонического раствора натрия хлорида и аутокрови, добавляли доноры и стимуляторы синтеза оксида азота – оксаком ($0,7$ мкмоль/кг) и L-аргинин (200 мг/кг). **Результаты.** Кровопотеря вызывала выраженные нарушения системной гемодинамики и микроциркуляции с изменением метаболизма и кислородного режима организма. Содержание продуктов перекисаации в крови нарастало, тем значительнее, чем выраженнее были нарушения кровообращения. Выявлены высокие коррелятивные связи между показателями гемодинамики и величинами малонового диальдегида и церулоплазмينا в крови животных. Показано благоприятное действие на кровообращение и состояние оксидантно-антиоксидантной системы доноров оксида азота – оксакома и L-аргинина, вводимых в составе инфузионной среды. **Заключение.** Применение доноров оксида азота при инфузионной терапии геморрагического шока существенно повышает продолжительность жизни животных. В контроле (изотонический раствор натрия хлорида) выживаемость составляла 42%, при добавлении к инфузионной среде оксакома и L- аргинина, соответственно, 77 % и 59%.

Ключевые слова: геморрагический шок; кровообращение; инфузионная терапия; оксидантно-антиоксидантная система; оксид азота; оксаком; L-аргинин.

Для цитирования: Ремизова М.И., Гришина Г.В., Гербут К.А., Алексанян Л.Р., Рыбакова Л.П. Влияние регуляторов синтеза оксида азота на состояние оксидантно-антиоксидантной системы при инфузионной терапии геморрагического шока в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63 (3): 4–12.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.4-12

Для корреспонденции: Гришина Галина Викторовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. группы экспериментальной трансфузиологии отдела кровезаменителей и компонентов крови ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, e-mail: reger201309@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.07.2018

Remizova M.I., Grishina G.V., Gerbout K.A., Aleksanyan L.R., Rybakova L.P.

The oxidation-antioxidation system in hemorrhagic shock and the infusion therapy with regulators of nitric oxide synthesis in experiment

Russian Research Institute of Hematology and Blood Transfusion,
2nd Sovetskaya Str. 16, St. Petersburg 191024

Different types of shock, including hemorrhagic shock, are associated with oxidative stress. The oxidant-antioxidant system plays a major role during severe blood loss. **The aim** of these experiments was to study circulation, oxygen regimen and oxidant-antioxidant systems in hemorrhagic shock and infusion therapy. **Methods.** Experiments were performed on thiopental-anesthetized rabbits. Hemorrhagic shock was induced by blood loss of 18.5 ± 0.6 ml/kg body weight to reduce blood pressure to 40–60 mm Hg for 30–40 min. Then infusion of a volume expander was started. Effectiveness of the infusion therapy was evaluated by indices of systemic hemodynamics, microcirculation, and the oxidant-antioxidant system. The infusion solution consisting of isotonic sodium chloride was supplemented with a nitric oxide (NO) donor, Oxacom® (0.7 μ mol/kg), and a NO precursor, L-arginine (200

mg/kg). **Results.** Blood loss resulted in considerable changes in systemic hemodynamic, microcirculation, metabolism, and oxygen balance. The content of peroxidation products directly depended on the degree of circulatory disorders. Hemodynamic indices were closely correlated with blood levels of malonic dialdehyde and ceruloplasmin. Oxacom® and L-arginine exerted a beneficial effect on circulation and the oxidant-antioxidant system. **Conclusion.** NO-enhanced infusion therapy increased animal survival. In control experiments (infusion of isotonic sodium chloride), the survival rate was 42% while the sodium chloride solution supplemented with Oxacom® and L-arginine increased the survival rate to 77% and 59%, respectively.

Keywords: hemorrhagic shock; blood circulation; infusion therapy; oxidative-antioxidative system; nitric oxide; oxacom; L-arginine.

For citation: Remizova M.I., Grishina G.V., Gerbout K.A., Aleksanyan L.R., Rybakova L.P. The oxidation-antioxidation system in hemorrhagic shock and infusion therapy with regulators of the synthesis of nitric oxide. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 4-12. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.4-12

For correspondence: Galina V. Grishina, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, «Russian Research Institute of Hematology and Blood Transfusion FMBA of Russia», e-mail: reger201309@mail.ru

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

Information about authors:

Remizova M.I. <https://orcid.org/0000-0002-9906-3807>

Grishina G.V. <https://orcid.org/0000-0003-4842-2504>

Gerbout K.A. <https://orcid.org/0000-0001-5518-5522>

Rybakova L.P. <https://orcid.org/0000-0002-9985-879X>

Aleksanyan L.R. <https://orcid.org/0000-0002-8525-2295>

Received 05.07.2018

При тяжелой кровопотере, как и при травмах различного генеза, происходят нарушения функций по существу всех систем организма. Одно из ведущих мест в патогенезе этих изменений занимает гиповолемия. В ответ на уменьшение объема циркулирующей плазмы и эритроцитной массы организм отвечает рядом компенсаторных реакций, которые если не устранена причина, трансформируются в патологические. При активации адаптационных механизмов с изменением системной гемодинамики и периферического кровообращения вследствие централизации кровообращения развивается циркуляторно-гемическая гипоксия органов и тканей [1] и геморрагический шок (ГШ) [2]. Сопутствующая этому кислородная недостаточность способствует усилению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые определяют повреждение клеточных мембран и даже гибель клеток, что приводит к оксидативному стрессу [3, 4]. Дополнительные условия для запуска свободно-радикальных процессов создаются также и в постишемическом периоде, в результате чего формируется супероксиданион-радикал и оксид азота (NO). Инфузионные растворы, введенные в этот период, могут активизировать процессы реоксигенации и генерировать свободные радикалы, т.е. усиливать процессы перекисидации [5, 6]. В ответ на усиление этих процессов в организме млекопитающих возрастает активность системы антиоксидантной (АО) защиты, в которую входят антиокси-

дантные ферменты – супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза (КАТ), а также белки, связывающие ионы металлов переменной валентности, в частности, церулоплазмин (ЦП).

В последние годы установлено, что NO, обеспечивает эндотелийзависимую регуляцию сосудистого тонуса, обладает антиагрегационными и антиадгезивными свойствами. Одним из защитных действий NO является способность повышать активность АО ферментов и экспрессию кодирующих их генов [4]. В условиях избыточной продукции свободных радикалов и при наличии дефектов системы АО защиты, связанной с дефицитом СОД, супероксиданион окисляет NO до пероксинитрита [6], который обладает выраженным окислительным потенциалом и способен разрушать важнейшие структурные клеточные компоненты. Развивается нитрозильный стресс. Предотвращение инактивации NO супероксидом объясняет способность СОД улучшать микроциркуляцию (МЦ) и нормализовать кровоток после вазоспазма, тромбозов и других нарушений кровообращения [7, 8].

Благодаря многофункциональной роли NO инфузионная терапия, включающая введение регуляторов его синтеза, может повлиять на состояние антиоксидантной системы организма.

Цель исследования – изучение кровообращения, кислородного режима организма, состояния оксидантно-антиоксидантной системы при геморрагическом

шоке и его инфузионной терапии в сочетании с донорами оксида азота.

Методика

Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, и Межгосударственными стандартами ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014 «РУКОВОДСТВО ПО СОДЕРЖАНИЮ И УХОДУ ЗА ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ», соответствующими Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123, Страсбург, 18 марта 1986 г. с приложением от 15.06.2006). Исследования одобрены этическим комитетом ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

Эксперименты выполнены на наркотизированных тиопенталом натрия (15 мг/кг) кроликах самках массой 2500—3500 г. Препаровку сосудов производили под местной анестезией 1% раствором новокаина. Катетеризировали сонную артерию и яремную вену для определения минутного объема кровообращения (МОК) методом термодилуции [9], бедренную артерию — для регистрации артериального давления (АД) и взятия проб артериальной крови, и бедренную вену — для взятия проб смешанной венозной крови. Геморрагический шок моделировали дробным кровопусканием из бедренной артерии в объеме $18,5 \pm 0,6$ мл/кг массы тела животного с последующей гипотензией на уровне 40–50 мм рт. ст. в течение 30—40 мин, после чего начинали инфузию кровезаменителя. Известно, что реинфузия пострадавшему собственной крови является наиболее физиологичным методом восполнения кровопотери, поэтому в состав инфузионного раствора входила аутокровь — 1% от объема вводимого раствора. Такое разведение соответствует содержанию гемоглобина в первом отечественном кровезаменителе на основе модифицированного гемоглобина — геленполе [10].

Тяжесть ГШ и эффективность инфузионной терапии оценивали и по расчетным показателям системной гемодинамики: ударному объему сердца (УО), рабочему индексу левого желудочка (РИЛЖ), общему периферическому сопротивлению кровотоку (ОПС).

О состоянии микроциркуляции судили визуально по характеру микрокровотока в сосудах серозной оболочки тонкого кишечника кролика методом прижизненной контактной микроскопии (люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ-КФ, ЛОМО). Изменения кровотока — количество функционирующих капилляров

(КФК), скорость кровотока и степень агрегации эритроцитов оценивали по балльной шкале выше и ниже исходного уровня [2, 11]. Отсутствие видимых нарушений в приводящих капиллярах и метартериолах принимали условно за «0» баллов. При этом эритроциты в потоке крови были не различимы. С замедлением скорости движения эритроцитов по сосудам и появлением в микрососудах агрегатов клеточных элементов крови величина балла возрастала (2 и 3 балла). Остановка кровотока в микрососудах оценивалась как стаз, величина балла при этом была максимальной и равнялась четырем.

В крови определяли показатели кислородного режима организма на газоанализаторе AVL-800 («Radiometer», Дания) (pO_2 — напряжение кислорода, $HvO_2\%$ — насыщение гемоглобина кислородом и рассчитывали значения системного транспорта кислорода — QO_2 и общего потребления кислорода — VO_2). Состояние оксидантно-антиоксидантной системы (ОС-АОС) в сыворотке крови оценивали по уровню малонового диальдегида (МДА) [12], активности КАТ (КФ 1.П.1.6) [13] и СОД (КФ 1.15.1.1) [14], содержанию церулоплазмина ЦП (КФ 1.16.3.1) [15]. Для оценки степени дисбаланса функционирования ферментов антиоксидантной защиты рассчитывали интегральный показатель соотношения активности СОД/КАТ.

Во всех сериях животным по окончании кровопускания вводили изотонический раствор натрия хлорида (ФР) в объеме, превышающем в 2 раза эксфузированную кровь. В 1-й серии ($n=12$) вводили только ФР, во 2-й — ($n=9$) ФР сочетали с аутокровью (1%), в 3-й серии ($n=6$) — с L-аргинином («Sigma», 200 мг/кг), в 4-й ($n=8$) — с оксаком (0,7 мкмоль/кг). Оксаком — динитрозильный комплекс железа с глутатионом является первым отечественным препаратом — донором NO, созданным под руководством проф. А.Ф. Ванина в НИИ химической физики РАН (Москва) [16, 17].

Состояние гемодинамики, кислородного режима организма, окислительной и антиокислительной системы оценивали до и после окончания кровопотери, а также через 60 мин после завершения инфузии.

Наличие связи между изучаемыми показателями проводили с применением непараметрического корреляционного анализа. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Результаты обработаны методом вариационной статистики в программе Statistica 7.0.

Результаты и обсуждение

АД и МОК в результате кровопотери снижались (табл. 1). МОК в некоторых экспериментах уменьшался почти в 2 раза по сравнению с исходным уровнем.

Изменялись и другие показатели системной гемодинамики: существенно падал УО и РИЛЖ (почти в 3 раза). Одновременно с нарушениями системной гемодинамики изменялся и ток крови в микроциркуляторном русле (табл. 2): наполовину уменьшалось КФК, снижалась скорость движения крови в капиллярах (метартериолах), появились агрегаты форменных элементов крови.

Массивная кровопотеря и длительная гипотензия сопровождалась снижением напряжения кислорода в венозной крови. Рост артерио-венозной разницы, как по напряжению кислорода, так и по насыщению гемоглобина кислородом отражал увеличение потребления кислорода организмом (табл. 3).

Нарушения системного кровообращения и МЦ были столь выраженными, что системный транспорт кислорода смог обеспечить только треть или даже половину потребности кислорода организмом. С ухудше-

нием кровообращения уменьшалось поступление кислорода к жизненно важным органам. Недостаточная доставка кислорода к тканям, потребность в котором в организме вследствие стрессорной реакции возрастала, привела к развитию гипоксии.

Изменения гемодинамики сопровождались нарушениями метаболизма: в венозной крови регистрировали выраженный ацидоз – рН снижался с $7,41 \pm 0,01$ до $7,19 \pm 0,04$, уменьшалось содержание стандартного бикарбоната. В артериальной, как и в венозной, крови развивался значительный дефицит буферных оснований (до $-12,8 \pm 2,1$ ммоль/л).

К окончанию кровопотери у животных 1-й и 4-й серий отмечалась тенденция к увеличению содержания в крови МДА – одного из промежуточных продуктов ПОЛ (табл. 4).

Однако у части кроликов (2-я и 3-я серии) содержание МДА к окончанию кровопотери снижалось поч-

Таблица 1

Системная гемодинамика у кроликов при геморрагическом шоке и инфузии кровезаменителей ФР (1-я серия), ФР с аутокровью (2-я серия), ФР с аутокровью и L-аргинином (3-я серия), ФР с аутокровью и оксакомом (4-я серия), (M±m)

Показатели	Серии	Исходные	Окончание кровопотери	После инфузии, 60 мин
АД, мм рт. ст.	1	104±5	76±4 ⁺	80±4 ⁺
	2	113±4	71±3 ⁺	88±5 ^{+,#}
	3	115±7	69±2 ⁺	84±4 ^{+,#}
	4	119±5	71±6 ⁺	91±5 ^{+,#}
МОК, мл/мин/кг	1	207±15 (100%)	107±14 ⁺ (52%)	181±35 ^{+,#} (79%)
	2	231±16 (100%)	92±9 ⁺ (40%)	132±16 ^{+,#} (57%)
	3	180±18(100%)	105±7 ⁺ (56%)	107±11 ⁺ (61%)
	4	173±16 (100%)	91±10 ⁺ (53%)	122±11 ^{+,#} (71%)
УО, мл/кг	1	0,74±0,10	0,41±0,04 ⁺	0,64±0,08 ^{+,#}
	2	0,85±0,06	0,32±0,03 ⁺	0,53±0,08 ^{+,#}
	3	0,60±0,06	0,32±0,03 ⁺	0,39±0,04 ⁺
	4	0,68±0,09	0,33±0,04 ⁺	0,45±0,04 ⁺
ОПС, дин·сек·см ⁻³ /кг·10 ⁻⁴	1	3,7±0,3	5,9±0,6	3,4±0,3 [#]
	2	4,1±0,4	6,2±0,7	5,7±0,6
	3	5,3±0,5	5,6±0,6	6,0±0,5
	4	6,2±0,5	6,5±0,5	6,3±0,5
РИЛЖ, кГм/кг·мин	1	281±24	99±12 ⁺	180±39 ^{+,#}
	2	348±23	87±14 ⁺	160±23 ^{+,#}
	3	281±44	99±9 ⁺	137±18 ⁺
	4	288±33	96±19 ⁺	152±20 ^{+,#}

Примечание. Статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) по сравнению с исходными данными отмечены значком «+», с данными после окончания кровопотери – «#». 1 – инфузии ФР, 1-я серия; 2 – инфузия ФР с аутокровью, 2-я серия; 3 – инфузия ФР с аутокровью и L-аргинином, 3-я серия; 4 – ФР с аутокровью и оксакомом, 4-я серия.

ти на 10-15%. Причем, происходило это при выраженных к концу кровопотери нарушениях гемодинамики. На фоне развивающихся нарушений кровообращения в крови в большинстве экспериментов не изменялось содержание ЦП.

Представленные результаты (табл. 4) свидетельствуют, что динамика свободнорадикального окисления при ГШ сопровождалась усилением активности лишь отдельных звеньев системы антиоксидантной защиты. При нарастании тяжести шока в 1-й, 3-й и 4-й сериях происходил рост активности КАТ на 13-20% в сравнении с исходным уровнем. Активность СОД повышалась незначительно в 1-й и 4-й сериях.

При кровопотере, особенно пролонгированной, как известно, активизируется ренин-ангиотензин-альдостероновая система [1]. Происходит перераспределение кровотока и усиление работы сердца с целью поддержания АД и кровоснабжения в жизненно важных органах. Выявлены корреляционные связи между объемом кровопотери и рабочим индексом сердца (расчет коэффициента корреляции по Спирману, + 0,75, $p \leq 0,05$). Кроме того, обнаружены корреляционные связи между величиной кровопотери при моделировании ГШ и состоянием ОС-АОС системы к моменту начала лечения. Стабильные и высокие корреляции имеют место между уровнем МДА и МОК (+ 0,69, $p \leq 0,05$), а также между МДА и РИЛЖ (+0,77, $p \leq 0,05$).

Система ренин-ангиотензин имеет исключительное значение в регуляции многих сердечно-сосудистых параметров. Выявленные корреляции свидетельствуют, что по мере увеличения объема кровопотери происходит снижение МОК и РИЛЖ, а также активация процессов ПОЛ.

Таким образом, лечение во всех сериях экспериментов начинали на фоне серьезных нарушений системной гемодинамики, микроциркуляции и метаболизма, вызванных массивной потерей крови и гипотензией.

Возмещение кровопотери приводило к улучшению центральной гемодинамики. АД и МОК возрастали после окончания инфузии (табл. 1), но не достигли исходных величин. Через 60 мин после окончания лечения отмечалось увеличение УО. Приближалось к исходным значениям ОПС. РИЛЖ значительно возрастал и превышал данные до кровопотери, не достигая исходных величин. Снижение ОПС, обусловленное вазодилататорным действием доноров оксида азота [2], приводило к улучшению микроциркуляции (табл. 2): увеличивалось количество функционирующих капилляров, возрастала скорость кровотока в капиллярах, уменьшалось количество агрегатов эритроцитов, что свидетельствовало о восстановлении органной перфузии. Слабее всего микрокровоток восстанавливался в контрольной серии. Реинфузия 1% крови, возвращая

Таблица 2

Микроциркуляция у кроликов при геморрагическом шоке и инфузии кровезаменителей (M±m)

Показатели	Серии	Исходные	Окончание кровопотери	После инфузии, 60 мин
КФК в поле зрения, (в % от исходного)	1	100±0	74±6 ⁺	81±5 [#]
	2	100±0	56±4 ⁺	90±3 ^{*,#}
	3	100±0	56±5 ⁺	100±0 ^{#,^}
	4	100±0	60±7	100±0 ^{#,o}
Скорость движения эритроцитов, баллы	1	0,22±0,11	-2,22±0,45 ⁺	-0,88±0,37 ^{*,#}
	2	0,00±0,00	-2,44±0,11 ⁺	-0,33±0,11 ^{*,#}
	3	0,00±0,00	-3,11±0,11 ⁺	-0,57±0,11 ^{*,#,^}
	4	0,00±0,00	-2,50±0,25 ⁺	-0,13±0,12 ^{*,#,o}
Агрегация эритроцитов, баллы	1	0,25±0,11	2,38±0,34 ⁺	1,29±0,50 ^{*,#}
	2	0,00±0,00	2,00±0,00 ⁺	0,44±0,11 ^{*,#}
	3	0,00±0,00	2,11±0,11 ⁺	0,57±0,11 ^{*,#,^}
	4	0,00±0,00	2,13±0,12 ⁺	0,13±0,12 ^{*,#,o}

Примечание. Здесь и в последующих таблицах статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) по сравнению с исходными данными отмечены значком «+», с данными после окончания кровопотери – #, между данными 1-й и 2-я серий – *, между данными 1-й и 3-й серий – ^, между данными 1-й и 4-й серий – o; 1 – инфузии ФР, 1-я серия; 2 – инфузия ФР с аутокровью, 2-я серия; 3 – инфузия ФР с аутокровью и L-аргинином, 3-я серия; 4 – ФР с аутокровью и оксакомом, 4-я серия.

собственные клеточные элементы и иммунные тела, являлась наиболее физиологичным восполнением кровопотери. При геморрагическом шоке ее необходимо сочетать с инфузией изотонического солевого раствора и медикаментозной коррекцией системного кровообращения и микроциркуляции, что ведет к ликвидации циркуляторной гипоксии.

В 4-й серии, вероятно, в результате действия регулятора синтеза NO отмечалось значительное улучшение капиллярного кровотока и дезагрегации эритроцитов.

После реинфузии улучшался кислородный режим организма: повышались системный транспорт и общее потребление кислорода в тканях (табл. 3). В то же время снижался дефицит буферных оснований ($s - 12,7 \pm 2,5$ до $-6,7 \pm 2,1$ ммоль/л) и нормализовался pH в крови ($s 7,27 \pm 0,02$ до $7,40 \pm 0,01$).

Через 60 мин после лечения, системный транспорт кислорода оставался еще достаточно высоким, что было следствием нормализации гемодинамики по сравнению с ее состоянием перед инфузией кровезаменителей.

Отрицательная корреляционная взаимосвязь установлена между уровнем МДА и МОК ($-0,49$, $p \leq 0,05$), а также между МДА и РИЛЖ ($-0,49$, $p \leq 0,05$). Через 1 ч после инфузии при тенденции к уменьшению проявления гипоксии (возрастании QO_2 , VO_2 , табл. 3), отмечалось незначительное снижение в крови МДА (кроме 2-й серии, табл. 4). Существенно уменьшалось содержание ЦП в сравнении с исходным уровнем (довольно высокими были коррелятивные связи между уровнем ЦП и РИЛЖ $+0,70$, $p \leq 0,05$), что могло происходить вследствие уменьшения АО защиты. Кроме того, ЦП, возможно, расходовался частично на инактивацию МДА [5] и других продуктов ПОЛ (корреляционная взаимосвязь между ЦП и МДА $+0,47$, $p \leq 0,05$).

После инфузии в крови нарастала активность каталазы, особенно в 3-й и 4-й сериях экспериментов, что можно рассматривать как благоприятное влияние лечения (коррелятивные связи между КАТ и МОК $0,43$, $p \leq 0,05$). В сериях с применением доноров NO отмечалась не только активация КАТ (30–40%), но и сниже-

Таблица 3

Кислородный режим организма у кроликов при геморрагическом шоке и инфузии кровезаменителей (M±m)

Показатели	Серии	Исходные	Окончание кровопотери	После инфузии 60 мин
p_vO_2 , мм рт. ст.	1	32,3±3,2	24,1±2,4 ⁺	25,7±2,4 [#]
	2	32,4±4,3	19,6±1,6 ⁺	24,6±1,8 ⁺
	3	35,9±2,1	21,8±1,6 ⁺	23,3±1,8 ⁺
	4	35,6±2,5	21,4±2,9 ⁺	28,3±3,2 ^o
$p_aO_2 - p_vO_2$	1	59,8±2,3	81,5±3,0	72,2±4,3
	2	60,8±6,8	90,3±8,1 ⁺	67,6±6,3
	3	54,2±2,3	77,2±6,8 ⁺	74,2±9,0 [#]
	4	53,3±4,5	82,0±5,7 ⁺	75,9±8,4 ⁺
$Hb_aO_2 - Hb_vO_2, \%$	1	38,2±5,6	53,4±7,5 ⁺	62,9±6,9 [#]
	2	43,0±7,1	74,9±3,1 ⁺	62,8±3,8 ⁺
	3	32,3±3,9	66,0±11,2 ⁺	60,6±11,8 ⁺
	4	31,8±7,6	75,3±5,3 ⁺	66,4±7,1 ⁺
$QO_2, \text{мл (мин·кг)}^{-1}$	1	32,8±3,9	16,3±1,8 ⁺	25,2±7,1 [#]
	2	38,6±2,7	13,9±1,6 ⁺	18,6±2,2 ⁺
	3	28,5±4,7	13,4±1,4 ⁺	14,9±2,9 ^{+,#}
	4	28,2±2,7	12,2±1,2 ⁺	16,2±1,7 ^{+,#}
$VO_2, \text{мл (мин·кг)}^{-1}$	1	12,1±2,5	8,1±1,1 ⁺	8,0±0,6 [#]
	2	15,1±3,3	10,6±1,5	12,2±1,4
	3	8,2±1,5	9,2±0,7	9,6±1,8
	4	8,2±1,5	9,3±0,7	10,5±0,9 [#]

Примечание. ФР (1-я серия), ФР с аутокровью (2-я серия), ФР с аутокровью и L-аргинином (3-я серия), ФР с аутокровью и оксакомом (4-я серия), остальные обозначения, как в табл. 2.

ние продуктов перекисидации в крови, уменьшение содержания МДА (кроме 2-й серии) и ЦП (10—15%).

Возможно, что некоторое повышение МДА происходило за счет его вымывания в сосудистое русло из тканей ранее ишемизированных в результате кровопотери и пролонгированной гипотензии. Это подтверждается уменьшением ОПС и существенным улучшением МЦ, происходящим под влиянием доноров оксида азота.

Подвижное равновесие между ПОЛ и активностью АО механизмов присуще всем уровням организации живых систем. Оно смещено вправо в состоянии физиологического покоя, обычной жизнедеятельности организма.

Под влиянием чрезвычайных раздражителей (в данном случае кровопотери) процессы биологического окисления, а также ПОЛ заметно усиливаются, создавая предпосылки для смещения равновесия в направлении активации ПОЛ.

Буферная емкость антиоксидантных систем достаточно велика, поэтому смещение равновесия влево вы-

является не сразу, а по мере истощения антиоксидантных резервов, чем можно объяснить обнаруженное в представленных экспериментах усиление лишь отдельных ферментов АО защиты. Существующие методы оценки интенсивности ПОЛ по накоплению вторичных (МДА) и конечных (основания Шиффа) продуктов считаются инерционными и не всегда улавливают быстрых изменений состояния равновесия между активностью ПОЛ и АО. Возможно, именно этим объясняются полученные в нашем исследовании неоднозначные данные о взаимосвязи между содержанием МДА и активностью ферментов АО защиты.

В постинфузионном периоде, судя по представленным результатам, несмотря на улучшение гемодинамики, уменьшение проявлений нарушений кислородного режима организма и ацидоза, АО система продолжала находиться в состоянии напряжения. Активность СОД после кровопотери имела тенденцию к снижению (в контроле максимально), а КАТ к увеличению. Поэтому коэффициент сбалансированности ферментов-ан-

Таблица 4

Показатели оксидантно-антиоксидантной системы при геморрагическом шоке и его инфузионной терапии ФР (1-я серия), ФР с аутокровью (2-я серия), ФР с аутокровью и L-аргинином (3-я серия), ФР с аутокровью и оксакомом (4-я серия), (M±m)

Показатели	Серии	Исходные (100%)	Окончание кровопотери	После инфузии, 60 мин
Содержание церулоплазмينا (г/л)	1	0,47±0,07	0,48±0,08 (102%)	0,46±0,08 (98%)
	2	0,35±0,04	0,33±0,06 (94%)	0,33±0,03 (94%)
	3	0,37±0,08	0,29±0,05 (78%)	0,26±0,12 ⁺ (70%)
	4	0,37±0,04	0,37±0,04 (100%)	0,32±0,04 (86%)
МДА (мкмоль/л)	1	7,3±0,5	7,7±0,7 (105%)	7,6±0,7 (104%)
	2	7,9±0,8	6,5±0,5 ⁺ (82%)	6,7±0,7 (85%)
	3	7,1±0,5	6,5±0,5 (92%)	6,2±0,6 (87%)
	4	5,2±0,4	5,3±0,6 (102%)	4,6±0,4 (89%)
Активность каталазы (усл. ед. акт.)	1	5,3±0,5	6,1±0,3 (115%)	6,4±0,3 (121%)
	2	5,8±0,5	5,3±0,6 (91%)	5,8±0,4 (100%)
	3	4,8±0,4	5,8±0,4 ⁺ (120%)	6,7±0,4 ⁺ (139%)
	4	4,7±0,5	5,3±0,3 (113%)	6,1±0,4 (130%)
СОД (усл. ед. акт.)	1	49±2	51±4 (104%)	43±6 (88%)
	2	37±4	37±3 (100%)	38±4 (103%)
	3	51±6	48±4 (94%)	47±5 (92%)
	4	46±5	48±6 (104%)	49±4 (106%)
Коэффициент СОД/КАТ	1	10,1±0,9	8,7±0,5 (86%)	7,0±0,8 (69%)
	2	7,3±1,7	8,2±1,5 (112%)	7,0±0,9 (96%)
	3	11,8±2,4	9,0±1,4 (76%)	7,2±1,0 ⁺ (61%)
	4	10,0±1,1	9,3±1,2 (93%)	8,2±0,9 (82%)

Примечание. Цифры в скобках – показатель в процентах от исходного.

тиоксидантов СОД/КАТ, который служит важным прогностическим признаком течения шока, также уменьшался, т.е. при кровопотере сопряженное действие рассматриваемой ферментной цепи было нарушено.

Через 60 мин после инфузии во всех экспериментах продолжало снижаться в крови содержание ЦП вследствие потребления его как антиоксиданта в условиях активации процессов ПОЛ. ЦП расходовался частично на инактивацию МДА [5]. Имеются сведения, что ЦП может предотвращать ПОЛ, функционируя в качестве перехватчика супероксидного радикала [4, 5]. Отмечалось нарастание в крови активности каталазы, что можно рассматривать как благоприятное влияние проводимого лечения. Активность СОД незначительно возрастала только во 2-й и 4-й сериях. Выявлена положительная взаимосвязь между уровнем СОД и КАТ (+ 0,87, $p \leq 0,05$).

Таким образом, в состоянии оксидантно-антиоксидантной системы при экспериментальном геморрагическом шоке наблюдался дисбаланс, который удалось в некоторой степени корригировать.

При поиске путей совершенствования лечения ГШ возрастает интерес экспериментаторов и клиницистов к регуляторам синтеза NO. Известно, что оксаком обладает антиоксидантными свойствами и способностью усиливать окислительное фосфорилирование в митохондриях, в частности сердечной мышцы [16–18]. Именно этим свойством оксакома можно объяснить выявленные в представленных экспериментах возрастание МОК и РИЛЖ после лечения. В целом действие оксакома на кровообращение выражено, скорее всего, в способности его обратимо связывать молекулы эндогенного NO, обеспечивая при экстремальных состояниях их сохранность, перемещая их в клетки жизненно важных органов [16]. Можно полагать, что увеличение продукции NO из L-аргинина также повышало уровень NO и поддерживало нормальную перфузию жизненно важных органов. Известно, что аргинин через орнитин может превращаться в глютаминовую кислоту, обладающую антиоксидантной активностью; кроме того, L-аргинин стимулирует выделение гистамина из клеток крови, снижает активность норадреналина и способствует действию эндогенных вазодилататоров [19].

Таким образом, при введении регуляторов синтеза NO наблюдалось повышение лечебного эффекта инфузионной терапии. Большая часть животных полностью выходила из состояния геморрагического шока и жила более 24 ч. Они считались выжившими. В представленных экспериментах в 1 серии выживаемость была самой низкой – 42% животных, во 2-й – 45%, в 3-й – 59%, в 4-й – 77%. Тем не менее, выраженный гемодинамический эффект ФР позволяет использовать его как само-

стоятельную инфузионную среду, а также как раствор для введения различных медикаментозных средств с целью выявления их противошоковых лечебных свойств.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности сочетанного введения регуляторов NO с кровезаменителями для повышения эффективности инфузионной терапии геморрагического шока. Регуляторы синтеза NO могут явиться дополнительным эффективным средством его лечения.

Литература

1. Ярочкин В.С., Панов В.П., Максимов П.И. *Острая кровопотеря*. М.; Медицинское информационное агентство; 2004.
2. Ремизова М.И., Гербут К.А., Гришина Г.В., Нагорная К.Н. Действие доноров оксида азота на микроциркуляцию при инфузионной терапии геморрагического шока в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 58(4): 91–5.
3. Landmesser U., Harrison D.G., Drexler H. Oxidant stress a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. *European J Clinical Pharmacology*. 2006; 62(13): 13–9.
4. Путилина Ф.Е., Галкина О.В., Ещенко Н.Д., Диге Г.П., Краковская И.Е. Свободнорадикальное окисление. СПб; 2008.
5. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. *Перекисное окисление и стресс*. СПб; Наука; 1991.
6. Ferdinandy P., Schulz R. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *British Journal Pharmacology*. 2003; 138: 532–42.
7. Гришина Г.В., Ремизова М.И., Гербут К.А., Рыбакова Л.П., Алексанян Л.Р. Влияние L-аргинина на систему кровообращения и состояние оксидантно-антиоксидантной системы организма при инфузионной терапии геморрагического шока в эксперименте. *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. 2017; 18(2): 540–50.
8. Киричук В.Ф., Андронов Е.А., Иванов А.Н., Мамонтова Н.В. Оксид азота и микроциркуляторное звено системы гемостаза. *Успехи физиологических наук*. 2008; 39(4): 83–91.
9. Гуревич М.И., Берштейн С.А., Голов Д.А., Повжитков М. М. Определение сердечного выброса методом терморазведения. *Физиологический журнал СССР*. 1967; 53: 350–54.
10. Селиванов Е.А., Пшенкина Н.Н., Мурзина Е.В., Софронов Г.А., Ханевич М.Д., Сарычев В.А. Кровезаменители с газотранспортной функцией на основе гемоглобина. *Medline.ru*. 2011; 12(3): 990–1013.
11. Кочетыгов Н.И., Куликов А.М. Системная гемодинамика и микроциркуляция при лечении ожогового шока кровезамещающими растворами. *Проблемы гематологии и переливания крови*. 1982; 6: 26–30.
12. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекиси липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. *Лабораторное дело*. 1988; 11: 41–3.
13. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16–8.
14. Ravin H., Harvard M. Rapid test for hepatolenticular degeneration. *Lancet*. 1956; 1: 726–27.
15. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы.

- тазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопросы медицинской химии*. 1990; 36(2): 88-91.
16. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолосодержащими лигандами как основа для создания лекарств разнообразного терапевтического действия: физико-химическое и биологическое обоснование этого направления. *Биофизика*. 2017; 62(4): 629-56.
 17. Мартусевич А.К., Ванин А.Ф. Экзогенный оксид азота как модулятор состояния биосистем и основа для создания инновационных медицинских технологий. *Биорадикалы и антиоксиданты*. 2016; 3(3): 206-7.
 18. Гришина Г.В., Алексанян Л.Р., Гербут К.А., Рыбакова Л.П., Ремизова М.И., Капустин С.И. Активность оксидантно-антиоксидантной системы организма при геморрагическом шоке и инфузии солевого раствора в сочетании с донором оксида азота. *Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа*. 2017; 3(4): 930-32.
 19. Silva E.P. Jr, Borges L.S., Mendes-da-Silva C., Hirabara S.M., Lambertucci R.H. L-Arginine supplementation improves rats' antioxidant system and exercise performance. *Free Radic Research*. 2017; 51(3): 281-93.
- References**
1. Yarochkin V.S., Panov V.P., Maximov P.I. *Acute blood loss [Ostraya krovopoteriya]*. Moscow; Medical informacionnoe agency; 2004. (in Russian)
 2. Remizova M.I., Gerbut K.A., Grishina G.V., Nagornaya K.N. Influence of nitric oxide donors on the microcirculation in infusion therapy of the experimental hemorrhagic shock. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya [Pathological Physiology and Experimental Therapy]*. 2014; 58 (4): 91-5. (in Russian)
 3. Landmesser U., Harrison D.G., Drexler H. Oxidant stress a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2006; 62(13): 13-9.
 4. Putilina F.E., Galkina O.V., Eschenko, N.D., Dizhe G. P., Krasovskaya I. E. *Free radical oxidation [Svobodnoradicalnoye okisleniye]*. St. Petersburg; 2008. (in Russian)
 5. Baraboy V.A., Brehman I.I., Golotin V.G., Kudryashov Y.B. *Perekisnoe okisleniye i stress [Peroxidation and stress]*. St. Petersburg; Nauka; 1992. (in Russian)
 6. Ferdinandy P., Schulz R. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *British Journal Pharmacology*. 2003; 138: 532- 42.
 7. Grishina G.V., Remizova M.I., Gerbut K.A., Rybakova L.P., Aleksanyan L.R. Effect of L- arginine on blood circulation and the state of oxidative-antioxidative system of organism with infusion therapy in experimental hemorrhagic shock. *Medline.ru. Rossiyskiy biomeditsinskiy zhurnal*. 2017; 18(2): 540-50. (in Russian)
 8. Kirichuk V.F., Andronov E.A., Ivanov O.M., Mammoth N.V. Nitric oxide and circulatory link haemostatic. *Yspekhi Physiologicheskikh nauk*. 2008; 39 (4): 83-91. (in Russian)
 9. Gurevich M.I., Berstein S.A., Head D.A., Povzhitkov M. M. Determination of cardiac output by the method termorazvedenie. *Fiziologicheskij zhurnal SSSR*. 1967; 53: 350-54. (in Russian)
 10. Selivanov E.A., Pshenkina N.N., Murzina E.V., Sofronov G.A., Khanevich M.D., Sarychev V.A. *Oxygen carrying hemoglobin-based blood substitutes [Krovezameniteli s gazotransportnoy funktsiyey na osnove gemoglobina]*. *Medline.ru*. 2011; 12(3): 990-1013. (in Russian)
 11. Kochetygov N.I., Kulikov A.M. Systemic hemodynamic and microcirculation in the treatment of burn shock blood substitute's solutions. *Problems Hematology Blood Transfusiology*. 1982; 6: 26-30. (in Russian)
 12. Andreeva L.I., Kozhemyakin L.A., Kiskun A.A. Modification method for determining lipid peroxide test with thiobarbituric acid. *Laboratornoe Delo*. 1988; 11: 41-3. (in Russian)
 13. Koroljuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokorev V. E. Method of Catalase determination. *Laboratornoe Delo*. 1988; 1: 16-8. (in Russian)
 14. Ravin H., Harvard M. Rapid test for hepatolenticular degeneration. *Lancet*. 1956; 1: 726-27.
 15. Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Kovalev Zh.V. Simple and sensitive method for the determination of superoxide dismutase activity, based on the oxidation of quercetin. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1990; 36(2): 88-91. (in Russian)
 16. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a base for new-generating drugs with diverse therapeutic activities: physico-chemical and biological characteristics of the complexes underlying this field (Review). *Biofizika*. 2017; 62(4): 629-56. (in Russian)
 17. Martousevitch A.K., Vanin A.F. Exogenous nitric oxide as a modulator of Biosystems and state the basis for the creation of innovative medical technologies. *Bioradikaly I Antioksidanty*. 2016; 3(3): 206-7. (in Russian)
 18. Grishina G.V., Aleksanyan L.R., Gerbut K.A., Rybakova L.P., Remizova M.I., Kapustin S.I. The activity of oxidative-antioxidative system of organism with hemorrhagic shock and saline infusion in combination with nitric oxide donor. *Gematologiya. Transfuziologiya. Vostochnaya Evropa*. 2017; 3(4): 930-32. (in Russian)
 19. Silva E.P. Jr, Borges L.S., Mendes-da-Silva C., Hirabara S.M., Lambertucci R.H. L-Arginine supplementation improves rats' antioxidant system and exercise performance. *Free Radic Research*. 2017; 51(3): 281-93.

Сведения об авторах:

Ремизова Марина Иосифовна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр., руководитель группы экспериментальной трансфузиологии отдела кровезаменителей и компонентов крови ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, e-mail: remizova391@mail.ru;

Гришина Галина Викторовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. группы экспериментальной трансфузиологии, e-mail: reger201309@mail.ru;

Гербут Константин Андреевич, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. гр. группы экспериментальной трансфузиологии отдела кровезаменителей и компонентов крови;

Рыбакова Лариса Петровна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии;

Алексанян Лусинэ Робертовна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. биохимии.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Покусаева Д.П.¹, Аниховская И.А.¹, Коробкова Л.А.², Яковлев М.Ю.^{1,3}

Возрастные и гендерные особенности показателей системной эндотоксинемии и их взаимосвязь с общепризнанными лабораторными факторами риска атеросклероза

¹Федерального государственного бюджетного научного учреждения«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;²Автономная некоммерческая организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»,
121205, г. Москва, Россия, ул. Нобеля, д. 3;³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования«Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России,
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

В последние годы большое внимание уделяется роли микробиоты в атерогенезе с позиций воспалительной теории. На основании экспериментальных и клинических данных была сформулирована эндотоксиновая теория атеросклероза. Подтверждением важной роли кишечного липополисахарида в атерогенезе является возрастная динамика показателей системной эндотоксинемии и липидного профиля. **Цель** исследования – выявление взаимосвязи между показателями системной эндотоксинемии и факторами риска атеросклероза, в аспекте возрастных и гендерных различий. **Методика.** Обследовано 113 пациентов среднего возраста. Все пациенты прошли оценку факторов риска развития атеросклероза по шкале SCORE. Пациенты были отнесены к средней группе риска (до 5%), оценивали себя как «здоровые», жалоб на момент обследования не предъявляли. Индекс массы тела был до 30 кг/м². Определялись показатели липидного профиля (анализатор «StatFax 3300», США, реактивы «Analyticon», Германия): уровень общего холестерина, липопротеинов высокой плотности и уровень триглицеридов, рассчитывался индекс атерогенности и концентрация липопротеинов низкой плотности. Определялись параметры системной эндотоксинемии: концентрации липополисахарида (микро-ЛАЛ-тест), уровень антител к гидрофобной и гидрофильной частям молекулы ЛПС методом «СОИС-ИФА». **Результаты.** Выявлена прямая значимая корреляция концентрации общего холестерина, липопротеинов низкой плотности и липопротеинов высокой плотности в зависимости от возраста. При построении регрессионной модели зависимости показателей системной эндотоксинемии от пола и возраста пациентов не выявлено. При визуальной оценке графиков обращает внимание наличие у женщин тенденции к возрастному повышению уровня липополисахарида и снижению концентрации антител к гидрофильной части молекулы липополисахарида. Обнаружены гендерные различия показателей липидного профиля и уровня липополисахарида. **Заключение.** Статистически значимая возрастная динамика показателей липидного профиля при тенденции к нарастанию уровня липополисахарида, а также снижение концентрации антител к гидрофильной части молекулы липополисахарида, имеющие определённые гендерные различия, свидетельствует о целесообразности продолжения исследований с увеличением числа обследованных в расширенном возрастном диапазоне.

Ключевые слова: атеросклероз; эндотоксин; факторы риска; системная эндотоксинемия; антиэндотоксиновый иммунитет; холестерин; липидный профиль.

Для цитирования: Покусаева Д.П., Аниховская И.А., Коробкова Л.А., Яковлев М.Ю. Возрастные и гендерные особенности показателей системной эндотоксинемии и их взаимосвязь с общепризнанными лабораторными факторами риска атеросклероза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 13-19.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.13-19

Для корреспонденции: Покусаева Дарья Павловна, аспирант лаб. системной эндотоксинемии и шока ФГБНУ НИИОПП, e-mail: pokusaeva.d@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.04.2019

Pokusaeva D.P.¹, Anikhovskaya I.A.¹, Korobkova L.A.², Yakovlev M.Yu.^{1,3}

Age and gender characteristics of indicators of systemic endotoxemia and their relationship with generally accepted laboratory risk factors for atherosclerosis

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation;² Skolkovo Institute of Science and Technology, Nobelya str. 3, Moscow 121205, Russian Federation;³ Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovyanova str. 1, Moscow 117997, Russian Federation

Atherosclerosis is a polyetiologic disease. In recent years, much attention has been paid to the role of the microbiota in atherogenesis from the perspective of inflammatory theory. Based on experimental and clinical data, the endotoxin theory of atherosclerosis was formulated. Confirmation of the important role of intestinal lipopolysaccharide in atherogenesis is the age dynamics of systemic endotoxemia parameters and lipid profile. The goal of our study was to identify the relationship between the indicators of systemic endotoxemia and the generally accepted risk factors for atherosclerosis, especially the age dynamics and the influence of gender. **Methods.** We examined 113 patients middle age. All patients were assessed for risk factors for atherosclerosis according to the SCORE scale. Patients were assigned to the average risk group (up to 5%), rated themselves as "healthy", did not present any complaints at the time of the survey. The body mass index was up to 30 kg/m². Indicators of the lipid profile were determined («StatFax» 3300 analyzer, USA, «Analyticon» reagents, Germany): the level of total cholesterol, high-density lipoprotein and triglyceride levels, the atherogenic index and the concentration of low-density lipoprotein were calculated. The parameters of systemic endotoxemia were determined: the concentration of lipopolysaccharide using a micro-LAL test, the level of antibodies to the hydrophobic and hydrophilic parts of the lipopolysaccharide molecule using the "SOIS-ELISA" method. **Results.** A direct significant correlation was found between the concentration of total cholesterol, low-density lipoprotein and high-density lipoprotein, depending on age. When constructing a regression model of the age dynamics, the concentrations of lipopolysaccharides, antibodies to the hydrophobic and hydrophilic parts of the lipopolysaccharide molecule were not detected ($p > 0.05$). When adjusted for gender, the age dynamics of systemic endotoxemia was also not observed. When visually assessing the graphs, attention is drawn to the fact that women have an age-related tendency to increase the level of lipopolysaccharide and a decrease in the concentration of antibodies to the hydrophilic part of the lipopolysaccharide molecule. In addition, gender differences in lipid profile and lipopolysaccharide levels were found. **Conclusion.** The significant age-related dynamics of the lipid profile in the presence of a tendency to an increase in the level of lipopolysaccharide and a decrease in the concentration of antibodies to the hydrophilic part of the lipopolysaccharide molecule, which has certain gender differences, revealed the necessity and feasibility of continuing research with an increase in the number of subjects and in the extended age range.

Keywords: atherosclerosis, lipopolysaccharide, endotoxin, risk factors, systemic endotoxemia, anti-endotoxin immunity, endotoxin aggression, lipid profile

For citation: Pokusaeva D.P., Anikhovskaya I.A., Korobkova L.A., Yakovlev M.Yu. Age and gender characteristics of indicators of systemic endotoxemia and their relationship with generally accepted laboratory risk factors for atherosclerosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 13-19. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.13-19

For correspondence: Pokusaeva Daria, Phd, Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology, e-mail: pokusaeva.d@yandex.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Pokusaeva D.P., <https://orcid.org/0000-0001-5960-451X>

Anikhovskaya I.A., <https://orcid.org/0000-0002-9381-4948>

Yakovlev M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7166-9372>

Received 09.04.2019

Введение

Структурные изменения стенки артерий развиваются задолго до клинических проявлений атеросклероза (ишемическая болезнь сердца, инсульт, хроническая ишемия нижних конечностей, др.) [1–2]. Наиболее важными факторами риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) по шкале SCORE (Systemic Coronary Risk Evaluation) являются:

возраст, пол, уровень общего холестерина (ОХС), показатели систолического артериального давления и курение [3, 4]. В последние годы большое внимание уделяется роли микробиоты в атерогенезе с позиции воспалительной теории атеросклероза. Предположение, опубликованное треть века назад [5], об участии эндотоксина (ЭТ) в атерогенезе, нашло прямое и косвенное подтверждение в экспериментальных и клиниче-

ских исследованиях [6-11], что и позволило сформулировать эндотоксिनотическую теорию атеросклероза [12]. Последняя учитывает практически все существующие теории атеросклероза и важные факторы риска заболевания: первичность системной эндотоксинемии (СЭЭ), её патогенной формы – эндотоксикозной агрессии (ЭА) и, обусловленного ею системного воспаления, как в патогенезе, так и в индукции атеросклероза. Вместе с тем, в литературе отсутствуют данные о наличии корреляционных связей между показателями СЭЭ (концентрацией липополисахарида (ЛПС) и антител к гидрофильной (АТ-ЛПС-ФИЛ) и гидрофобной (АТ-ЛПС-ФОБ) частям молекулы ЛПС) с общепринятыми факторами риска развития атеросклероза в возрастном аспекте и гендерной принадлежности. Цель исследования – выявление взаимосвязи между показателями системной эндотоксинемии и факторами риска атеросклероза в аспекте возрастных и гендерных различий.

Методика

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

В исследование включено 113 пациентов: 61 мужчина от 25 до 66 лет и 52 женщины от 39 до 68 лет. Пациенты отбирались из числа проходивших диспансерное наблюдение на Клинической базе НИИОПП (ООО «КДО», г. Москва). Критериями включения в исследование являлось отсутствие: верифицированных хронических заболеваний (или не менее чем 3-месячная их ремиссия), приёма липид-снижающих препаратов, оперативных вмешательств или травм в течение предшествующего исследованию месяца. Все включенные в исследование субъективно оценивали себя «здоровыми», индекс массы тела был в пределах 22,2-28,1 кг/м кв. Из исследования исключались пациенты с острой воспалительной патологией, длительно принимающие противовоспалительную терапию, перенёсшие инфаркт миокарда или острое нарушение мозгового кровообращения в анамнезе, лица с хронической почечной или сердечной недостаточностью, имеющие гемодинамически значимые стенозы артерий, сахарный диабет. Пациенты прошли оценку по шкале SCORE. Риск развития фатальных сердечно-сосудистых событий в течение 10 лет среди обследованных был 2-4%, что соответствует среднему риску. Для проведения лабораторных исследований производили за-

бор венозной крови кубитальным доступом, натощак, в стерильные пробирки. Лабораторные исследования проводились в ООО «КДО». Показатели липидного профиля: ОХС, триглицериды (ТГ), липопротеины высокой плотности (общепринятое сокращение ОХС-ЛПВП) в ммоль/л определялись на биохимическом анализаторе «Stat Fax 3300» (США) при помощи наборов реактивов фирмы «Analyticon» (Германия) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Суммарная фракция липопротеинов низкой плотности (общепринятое сокращение ОХС-ЛПНП, в ммоль/л) рассчитывалась по формуле «ОХС-ЛПНП = ОХС – (ТГ/2,2) – ОХС-ЛПВП», индекс атерогенности (ИА) рассчитывался

$$\text{ИА} = \frac{\text{ОХС} - (\text{ОХС-ЛПВП})}{\text{ОХС-ЛПВП}}$$

Интегральные показатели СЭЭ определяли при помощи авторских методов. Концентрация ЭТ в плазме крови оценивали с применением микро-ЛАЛ-теста¹ в ЕУ/мл. Данный метод основан на способности ЛПС вызывать коагуляцию белковых фракций лизата амёбоцитов краба *Limulus polyphenus*. Выраженность реакции оценивается визуально под микроскопом на основе специально разработанного метода кристаллографии по калибровочной шкале. В исследовании применялись реактивы фирмы «CapeCod» (США). Уровень АТ-ЛПС-ФИЛ и АТ-ЛПС-ФОБ в сыворотке крови определял методом СОИС-ИФА², который представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ. В качестве антигена к АТ-ЛПС-ФОБ использовали ЛПС *Salmonella minnesota RE 595* (Sigma, США), антигеном для определения АТ-ЛПС-ФИЛ являлся *E.coli O55* (Sigma, США). Регистрацию показателей экстинции осуществляли на спектрофотометре «Immunochem 2100» (США) при длине волны 495 нм в условных единицах оптической плотности (у.е.о.п.). Кроме того, рассчитывали отношение АТ-ЛПС-ФИЛ к АТ-ЛПС-ФОБ (норма 2:1).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы RStudio версии 1.1.456. Значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. Нормальность распределения выборки была проверена критерием Колмогорова-Смирнова. Для оценки различий в группах применялись методы параметрической статистики (критерий Стьюдента). Взаимосвязи между параметрами оценивались методами корреляционного анализа с применением критерия Пирсона. Проводил-

¹Патент РФ №2169367.

²Патенты РФ №2609763, №2011993

ся регрессионный анализ для оценки взаимосвязи нескольких факторов.

Результаты и обсуждение

При оценке гендерных различий показателей липидного профиля и параметров СЭЕ выявлены статистически значимые различия концентрации ОХС, ТГ, ОХС-ЛПНП, ОХС-ЛПВП и ЭТ в системном кровотоке между мужчинами и женщинами (табл. 1, критерий Стьюдента). Как видно из таблицы, у женщин отмечается более высокая концентрация ЭТ, которая соответствует более высокому уровню ОХС и ОХС-ЛПНП, а уровень ТГ статистически значимо ниже, чем у мужчин. При этом концентрация ОХС-ЛПВП у женщин значимо выше. Наблюдаемые у женщин изменения липидного профиля считаются более благоприятными при прогнозировании развития атеросклероза. Но как мы видим из таблицы, ошибки среднего имеют большее значение среди женщин для таких переменных как ОХС, ЭТ, ОХС-ЛПВП, ОХС-ЛПНП и ИА, что говорит о большей вариабельности этих параметров.

Более высокие значения ОХС, ОХС-ЛПНП могут быть связаны с большим влиянием возраста на показатели среди женщин.

Для оценки влияния возраста на показатели липидного профиля была построена линейная модель, при которой выявлена статистически значимая прямая корреляция с возрастом для таких показателей как ОХС, ОХС-ЛПНП, ОХС-ЛПВП ($p < 0,01$) без поправки на пол. Для каждого из показателей рассчитан статистически значимый коэффициент, соответствующий

значению среднего изменения параметра при увеличении возраста на 1 год (табл. 2).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии четкой возрастной тенденции к прогрессированию нарушений липидного профиля, проявляющиеся в виде: повышения уровня ОХС, увеличения концентрации липопротеинов низкой плотности и снижении уровня липопротеинов высокой плотности, которые до настоящего времени считаются главными лабораторными маркерами прогрессирования атеросклероза и осложнений им обусловленных.

В предыдущем исследовании при проведении регрессионного анализа нами было выявлено существенное влияние уровня ЭТ и соотношения АТ-ЛПС-ФИЛ/АТ-ЛПС-ФОВ на показатели ИА и концентрацию ОХС в общем кровотоке, что выразалось в приросте уровня ОХС в среднем на 3 единицы при увеличении концентрации ЛПС на одну единицу ($p < 0,0001$) ($n=80$) [11]. Исходя из наличия взаимосвязи показателей липидного профиля и СЭЕ, нами была построена регрессивная модель, в которой оценивалась возрастная динамика концентрации ЛПС, АТ-ЛПС-ФИЛ и АТ-ЛПС-ФОВ. Но учитывая то обстоятельство, что в настоящем исследовании медиана возраста мужчин в среднем на 8 лет меньше женской, то было принято решение о внесении в расчеты поправки на пол обследованных. Было выявлено, что нет корреляционной связи между концентрацией ЭТ в системном кровотоке и возрастом обследованных. Такие изменения так же не зависели от пола волонтеров ($p > 0.05$) (рис. 1).

Согласно источникам литературы [2, 13], существует обратная корреляция уровня АТ-ЛПС-ФИЛ и воз-

Таблица 1

Различия параметров липидного профиля и ЭТ по гендерному признаку

Пол	ОХС, ммоль/л	ЭТ, ЕУ/мл	ОХС-ЛПВП, ммоль/л	ОХС-ЛПНП, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ИА
Мужчины	6.10 ± 1.14	0.99 ± 0.53	1.09 ± 0.24	4.06 ± 1.12	1.97 ± 1.24	4.50 ± 1.71
Женщины	6.89 ± 1.72	1.31 ± 0.99	1.55 ± 0.98	4.82 ± 1.62	1.43 ± 0.67	3.50 ± 2.89
p	<0.01	<0.05	<0.001	<0.01	<0.01	>0.05

Примечание. Статистическая значимость гендерных различий.

Таблица 2

Динамика возрастных изменений липидного профиля

Параметр	Уровень ОХС, ммоль/л	Концентрация ОХС-ЛПНП, ммоль/л	Концентрация ОХС-ЛПВП, ммоль/л
Коэффициент*	0.04774	0.0382	-0.019111
p	0.00263	0.01267	0.0145

Примечание. * – коэффициент ежегодного изменения показателей липидного профиля.

раста. В построенной модели по выявлению возрастной динамики АТ-ЛПС-ФИЛ так же была осуществлена независимая оценка данного показателя у мужчин и женщин. Однако результаты настоящего анализа не выявили снижение концентрации АТ-ЛПС-ФИЛ с увеличением возраста обследованных, ни среди мужчин, ни среди женщин (рис. 2). Так же не было выявлено статистически значимой динамики концентрации АТ-ЛПС-ФОВ с возрастом.

Современные представления о патогенезе атеросклероза рассматривают воспалительную теорию и вза-

имосвязь с гиперхолестеринемией как 2 зависимых процесса, где эндотоксиновому компоненту атерогенеза отводится первостепенная роль [13]. Последнее находит своё подтверждение при визуальной оценке графиков, которое обнаруживает наличие тенденции к возрастному повышению уровня ЭТ и снижению уровня АТ-ЛПС-ФИЛ у женщин при отсутствии критерия значимости, что может быть обусловлено тем обстоятельством, что возрастная медиана у женщин на 8 лет больше, чем у мужчин. Это возраст (57.6 ± 6 лет) изменения гормонального фона, когда эстрогеновая

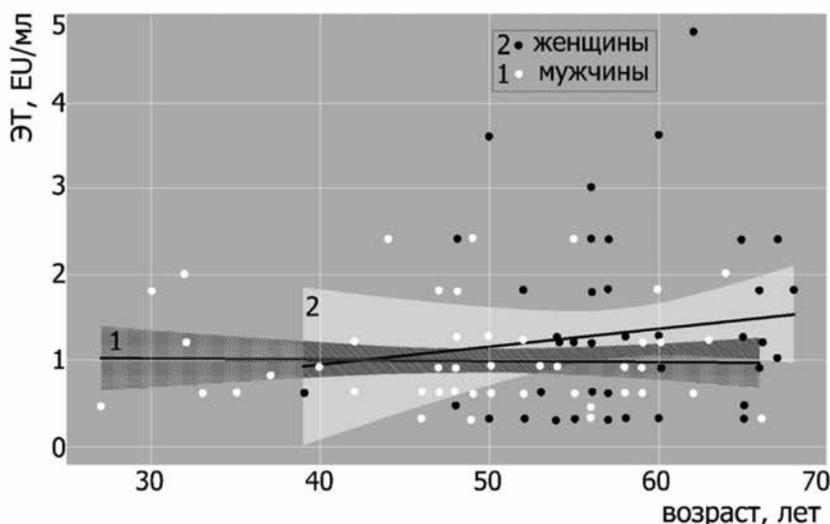


Рис. 1. Зависимость концентрации ЭТ (ЕУ/мл) от пола и возраста обследуемых (1- мужской пол, 2-женский пол).

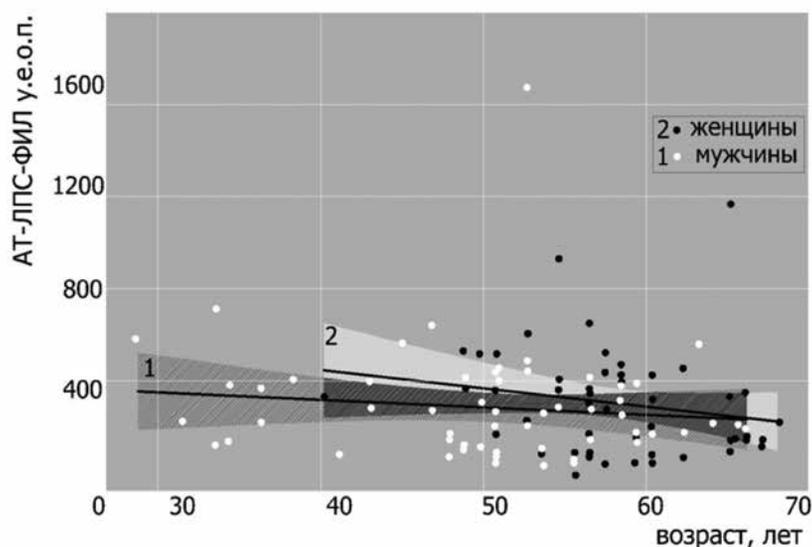


Рис. 2. Динамика концентрации АТ-ЛПС-ФИЛ (у.е.о.п.) с возрастом в зависимости от пола (1- мужской пол, 2-женский пол).

защита «отстывает» и женщины сравниваются с мужчинами по факторам риска в развитии атеросклероза. В нашей выборке отмечается неравномерное распределение количества обследованных в каждом возрастном диапазоне. Статически значимые изменения интегральных показателей СЭЕ, как показали предыдущие исследования [14], происходят каждые 7—10 лет, тогда как возрастной диапазон наших волонтеров 6—8 лет (25—75% перцентилей выборки). Такие особенности выборки влияют на результаты статистической обработки результатов и могут быть причиной «недостижения» критерия значимости при регрессивном анализе зависимости показателей СЭЕ от возраста.

Заключение

Атеросклероз является полиэтиологичным заболеванием. Исследователями отмечается увеличение случаев сердечно-сосудистых заболеваний с возрастом. При использовании шкал оценки риска прогрессирования атеросклероза мужчины имеют менее благоприятный прогноз. Нами оценивалась возрастная динамика показателей липидного профиля и параметров СЭЕ в зависимости от возраста и пола. Полученные нами коэффициенты возрастного прироста уровней показателей липидного профиля при наличии тенденции к нарастанию уровня ЛПС и к снижению концентрации АТ-ЛПС-ФИЛ, имеющие определённые гендерные различия, свидетельствуют о целесообразности продолжения исследований по изучению роли СЭЕ в атерогенезе в расширенном формате (по возрасту и численности выборок).

Литература

1. Конев Ю.В., Лазебник Л.Б. Роль эндотоксина кишечной микрофлоры в патогенезе атеросклероза. *Терапия*. 2015; 2: 19-27.
2. Чижиков Н.В. Лиходед В.Г., Светухин А.М., Яковлев М.Ю. *Эндотоксин кишечной микрофлоры в клинике и патогенезе хронической ишемии нижних конечностей*. Пенза. Издательство ПГПУ им. В.Г. Белинского. 2002.
3. Покусаева Д.П. Механизмы влияния системной эндотоксинемии на развитие и течение атеросклероза на клеточном, системном и организменном уровнях. *Патогенез*. 2018; 16(2): 12—22.
4. Anderson TJ, Gregoire J, Hegele RA, Couture P, Mancini GB, McPherson R, et al. 2012 update of the Canadian Cardiovascular Society guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult. *Can J Cardiol*. 2013; 29(2): 151-67.
5. Яковлев М.Ю. Эндотоксиновый шок. *Казанский медицинский журнал*. 1987; 68(3): 207-11.
6. Яковлев М.Ю. Морфология миокарда при эндотоксиновом шоке. *Архив патологии*. 1985; 47(7): 34-40.
7. Li J, Lin S, Vanhoutte PM, Woo CW, Xu A. Akkermansia Muciniphila Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endo-

8. Wu P, Jia F, Zhang B, Zhang P. Risk of cardiovascular disease in inflammatory bowel disease. *J Exp Ther Med*. 2017; 13(2): 395-400.
9. Geng S., Yuan R, Li L. Chronic Polarization of Inflammatory Monocytes by Super-Low Grade Endotoxin Aggravates the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Circ*. 2017; 136: A20934
10. Horseman M.A., Surani S., Bowman J.D. Endotoxin, Toll-like Receptor-4, and Atherosclerotic Heart Disease. *Curr. Cardiol. Rev*. 2017; 13(2): 86-93.
11. Покусаева Д.П., Аниховская И.А., Коробкова Л.А., Яковлев М.Ю. Коррелятивные взаимосвязи между показателями системной эндотоксинемии и липидного профиля у пациентов без клинических проявлений атеросклероза. *Патогенез*. 2018; 16(4): 182-5.
12. Аниховская И.А., Кубатиев А.А., Яковлев М.Ю. Эндотоксиновая теория атеросклероза. *Физиология человека*. 2015; 41(1): 106-16.
13. Яковлев М.Ю. *Дерматовенерология. Национальное руководство (краткое издание)*. М.; ГЭОТАР-Медиа, 2013. Кишечный эндотоксин и воспаление. Глава 8, с.70-6.
14. Салахов И.М., Аниховская И.А., Майский И.А., Маркелова М.М., О कोरोков П.Л., Хасанова Г.Р. и др. Нормативные показатели системной эндотоксинемии как базисный элемент определения роли липополисахаридов кишечной микрофлоры в общей патологии. *Патогенез*. 2015; 13(1): 18-27.

References

1. Konev Y.V., Lazebnik L.B. The role of endotoxin in the intestinal microbiota in the pathogenesis of atherosclerosis. *Terapiya*. 2015; 2: 19-27. (In Russian)
2. Chizhikov N.V., Likhoded V.G., Svetukhin A.M., Yakovlev M.Yu. Endotoxin of intestinal microflora in the clinic and pathogenesis of chronic lower limb ischemia [Endotoksin kishechnoy mikroflory v klinike i patogeneze khronicheskoy ishemii nizhnikh konechnostey]. Penza, 2002. (In Russian)
3. Pokusaeva D.P. Mechanisms of the effect of systemic endotoxemia on development and course of atherosclerosis at cell, systemic and body levels. *Patogenez*. 2018; 16(2): 12—22. (in Russian)
4. Anderson TJ, Gregoire J, Hegele RA, Couture P, Mancini GB, McPherson R, et al. 2012 update of the Canadian Cardiovascular Society guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult. *Can J Cardiol*. 2013 Feb; 29(2): 151-67.
5. Yakovlev M.Yu. Endotoxin shock. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 1987; 68(3): 207-11. (In Russian)
6. Yakovlev M.Yu. Myocardial morphology in endotoxin shock. *Arhiv patologii*. 1985; 47(7): 34-40. (in Russian)
7. Li J, Lin S, Vanhoutte PM, Woo CW, Xu A. Akkermansia Muciniphila Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in Apoe^{-/-}Mice. *Circulation*. 2016; 133: 2434-46, 249
8. Wu P, Jia F, Zhang B, Zhang P. Risk of cardiovascular disease in inflammatory bowel disease. *J Exp Ther Med*. 2017; 13(2): 395-400.
9. Geng S., Yuan R, Li L. Chronic Polarization of Inflammatory Monocytes by Super-Low Grade Endotoxin Aggravates the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Circ*. 2017; 136: A20934
10. Horseman M.A., Surani S., Bowman J.D. Endotoxin, Toll-like Receptor-4, and Atherosclerotic Heart Disease. *Curr. Cardiol. Rev*. 2017; 13(2): 86-93.

11. Pokusaeva D.P., Anikhovskaya I.A., Korobkova L.A., Yakovlev M. Yu. Correlations of indices of systemic endotoxemia with lipid profile in patients without clinical manifestation of atherosclerosis. *Patogenez*. 2019; 17(2): 182-5. (in Russian)
12. Anikhovskaya I.A., Kubatiev A.A., Yakovlev M.Y. Endotoxin theory of atherosclerosis. *Fiziologiya cheloveka*. 2015; 41(1): 89-97. (In Russian)
13. Yakovlev M.Yu. *Intestinal endotoxin and inflammation. Dermatovenerology. National leadership (short edition) [Dermatovenerologiya. Natsional'noe rukovodstvo (kratkoe izdanie)]*. Moscow; GEOTAR-Media; 2013. Chapter 8, pg.70-76. (In Russian)
14. Salakhov I.M., Anikhovskaya I.A., Maysky I.A., Markelova M.M., Okorokov P.L., Hasanova G.R., Jurkiv V.A. The normative data of systemic endotoxemia as the basic element of role definition of lipopolysaccharides of gut organisms in general pathology. *Patogenez*. 2015; 13(1): 18-27. (In Russian)

Сведения об авторах:

Покусаева Дарья Павловна, аспирант лаб. системной эндотоксинемии и шока ФГБНУ НИИОПП, e-mail: pokusaeva.d@yandex.ru;

Аниховская Ирина Альфредовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. системной эндотоксинемии и шока ФГБНУ НИИОПП;

Коробкова Лаура Александровна, магистрант Центра наук о жизни Автономной некоммерческой организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий», e-mail: korobkova.laura@gmail.com;

Яковлев Михаил Юрьевич, доктор мед. наук, зав. лаб. системной эндотоксинемии и шока ФГБНУ НИИОПП; проф. каф. патологической анатомии ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, e-mail: yakovlev-lps@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092.9

Мавзютов А.Р.¹, Гарафутдинов Р.Р.^{1,2}, Габдрахманова А.Р.¹, Салахов И.М.³, Тупиев И.Д.¹

Липополисахарид *Sinorhizobium meliloti*: влияние на клеточный состав крови в эксперименте

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России,

450008, г. Уфа, Россия, ул. Ленина, д. 3;

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

450054, г. Уфа, Россия, просп. Октября, д. 71;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Липополисахариды (ЛПС, эндотоксины) грамотрицательных бактерий обладают выраженной биологической активностью, в том числе терапевтической, однако для *S. meliloti* таких данных нет. **Цель** работы – экспериментальное изучение гемопоэтической активности 4 фракций липополисахаридов, выделенных из *S. meliloti*, при индуцированном иммунодефиците у мышей. **Методика.** Сформировано 7 групп лабораторных мышей (по 10 особей в каждой): 1-я группа – интактные (контроль 1), 2-я – 7-я группа – мыши с иммунодефицитным состоянием, индуцированным однократным внутрибрюшинным введением циклофосфамида. Через 1 сут после моделирования иммунодефицита в течение 21 сут ежедневно мышам 3-й группы вводили препарат сравнения Ликолипид® (химическое название: [4-О-(2-ацетиламино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетилмурамил]-L-аланил-D-α-глутамиламид – синтетический аналог бактериальных гликопептидов из группы иммуностимулирующих средств). Мышам 4–7-й групп – вводили исследуемые фракции липополисахаридов – ЛПС-1, ЛПС-2, ЛПС-3 и ЛПС-4 соответственно. Для ликолида разовая доза составляла 0,1 мл (0,05 мг/мл), для исследуемых фракций ЛПС *S. meliloti* – 0,2 мл (10 пг/мл). Иммунодефицитным мышам 2-й группы фракции липополисахаридов и препарат сравнения Ликолипид® не вводили. Через 21 сут мышей выводили из эксперимента. Изучали весовые характеристики органов подопытных животных и лейкоцитарную формулу. **Результаты.** Введение мышам на фоне вторичного экспериментального иммунодефицита ликолида сопровождалось снижением количества палочкоядерных нейтрофилов и моноцитопенией; при введении фракции ЛПС-1 возрастало количество сегментоядерных нейтрофилов; ЛПС-2 – имели место снижение содержания палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитоз; ЛПС-3 – наблюдали снижение содержания палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитоз на фоне значимого увеличения количества сегментоядерных нейтрофилов; ЛПС-4 – констатировалось увеличение числа базофилов, снижение содержания палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитоз на фоне значимого увеличения количества сегментоядерных нейтрофилов. **Заключение.** Фракции ЛПС *Sinorhizobium meliloti* проявляют модулирующие эффекты, схожие с механизмами «экстренного миелопоза» при физиологичном варианте течения бактериальных инфекций.

Ключевые слова: ЛПС, *Sinorhizobium meliloti*, модулирующий эффект, «экстренный миелопоз».

Для цитирования: Мавзютов А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Габдрахманова А.Р., Салахов И.М., Тупиев И.Д. Липополисахарид *Sinorhizobium meliloti* стимулирует гемопоз при вторичном иммунодефиците в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(3): 20-28.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.20-28

Для корреспонденции: Мавзютов Айрат Радикович, доктор мед. наук, зав. каф. фундаментальной и прикладной микробиологии, e-mail: ufalab@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.08.2018

Mavzyutov A.R.¹, Garafutdinov R.R.^{1,2}, Gabdrakhmanova A.R.¹, Salakhov I.M.³, Tupiyev I.D.¹

Effect of *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide on blood cell composition in experiment

¹Bashkir State Medical University,

Lenina Str. 3, Ufa 450008, Russia;

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,

Prospekt Oktyabrya 71, Ufa 450054, Russia;

³Institute of General Pathology and Pathophysiology,

Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315

Lipopolysaccharides (LPS, endotoxins) of gram-negative bacteria have a pronounced biological activity, including therapeutic activity; however, there is no such data for *S. meliloti*. **Aim.** To conduct an experimental study of hematopoietic activity of four lipopoly-

saccharide fractions isolated from *S. meliloti* under induced immunodeficiency in mice. **Methods.** 7 groups of 10 laboratory mice each were formed: group 1, intact mice (control 1); groups 2-7, mice with immunodeficiency induced by a single intraperitoneal injection of cyclophosphamide. Mice of group 3 were daily injected with a comparison agent, Licopid® (Chemical name: [4-O-(2-acetylamino-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-N-acetylmuramyl]-L-alanyl-D-α-glutamyl amide; single dose, 0.1 ml (0.05 mg/ml)) for 21 days starting one day after the induction of immunodeficiency. Mice of groups 3-7 were injected with the studied *S. meliloti* LPS fractions, LPS-1, LPS-2, LPS-3, and LPS-4, respectively (single dose, 0.2 ml (10 pg/ml)). Immunodeficient mice of group 2 received neither the comparison agent, Licopid® nor LPS fractions. The mice were euthanized at 21 days. Weight characteristics of animal organs and white blood count were studied. **Results.** Administration of Licopid® to mice with secondary experimental immunodeficiency was associated with decreased count of stab neutrophils and monocytopenia; LPS-1 fraction increased the count of segmented neutrophils; LPS-2 decreased the count of stab neutrophils and induced lymphocytosis; LPS-3 decreased the count of stab neutrophils and induced lymphocytosis associated with a significant increase in the count of segmented neutrophils; LPS-4 induced basophilia, decreased count of stab neutrophils, and lymphocytosis associated with a significant increase in the count of segmented neutrophils. **Conclusion.** *Sinorhizobium meliloti* LPS fractions exerted modulating effects similar to the mechanisms of "emergency myelopoiesis" in the physiological course of bacterial infections.

Keywords: LPS, *Sinorhizobium meliloti*, modulating effect, "emergency myelopoiesis".

For citation: Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R., Gabdrakhmanova A.R., Salakhov I.M., Tupiyev I.D. Effect of *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide on blood cell composition in experimen. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2019; 63(3): 20-28. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.20-28

For correspondence: Ayrat R. Mavzyutov, PhD, MD (Medicine), Head of Fundamental and Applied Microbiology Department, Bashkir State Medical University; 3 Lenin str., Ufa 450008, Russian Federation, e-mail: ufalab@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Mavzyutov A.R., <https://orcid.org/0000-0001-5943-1882>

Garafutdinov R.R., <https://orcid.org/0000-0001-9087-7364>

Gabdrakhmanova A.R., <https://orcid.org/0000-0001-7549-1957>

Salakhov I.M., <https://orcid.org/0000-0002-6977-9804>

Tupiyev I.D., <https://orcid.org/0000-0001-6738-1344>

Received 13.08.2018

Введение

Одним из основных механизмов развития воспалительных процессов являются цитокин-опосредованные реакции макроорганизма на грамотрицательные бактерии, среди которых самой тяжелой реакцией является сепсис [1-3]. Непосредственными медиаторами данного процесса служат липополисахариды (ЛПС) клеточной стенки бактерий. Их поступление в кровоток запускает каскад системных реакций [4], которые могут осложнять течение диабета [5], беременности и многих других патологических процессов [6].

Негативные эффекты ЛПС преимущественно связывают с одним из его компонентов – липидом А [7]. Вместе с тем показано, что структура и, соответственно, биологическая активность ЛПС отличается относительной видовой специфичностью и в небольших концентрациях как ЛПС, так и отдельные его фракции обладают выраженной иммуномодулирующей активностью [8, 9]. Указанное стало основанием для предположения, что грамотрицательные бактерии, не являющиеся симбионтами или патогенами человека, могут включать варианты ЛПС, не вызывающие сис-

темных воспалительных реакций, но сохраняющие биологическую активность. К таким микроорганизмам могут быть отнесены достаточно полно охарактеризованные в настоящее время *Sinorhizobium meliloti* [11]. Однако для *S. meliloti* таких данных нет.

Цель работы – экспериментальное изучение гемопоэтической активности 4 фракций липополисахарида, выделенных из *S. meliloti*, при индуцированном иммунодефиците у мышей.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986), Приказа МЗ РФ за № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики. Для получения и исследования биологической активности фракций ЛПС непатогенных грамотрицательных бактерий использовали культуру *Sinorhizobium meliloti*, штамм Л-14 из коллекции микроорганизмов «Симбионт» (ИБГ УНЦ РАН, г. Уфа),

выделенный из клубеньков люцерны посевной РБ и любезно предоставленный нам для последующих экспериментов. Чистую культуру *Sinorhizobium meliloti* наращивали в чашках Петри на твердой (агаризованной) среде LB при 28 °C в течение 4 сут, собирая в стерильных условиях 3 порции биомассы через 48, 72 и 96 ч [12].

В эксперименте использованы беспородные белые лабораторные мыши массой 20 – 30 г. Животные содержались в условиях вивария ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России при естественном световом режиме на стандартном рационе питания в соответствии с существующими рекомендациями [13]. В качестве показателей нормы при работе с лабораторными животными мы вначале также ориентировались на данные, приведенные в соответствующем руководстве [14]. Для решения поставленных в работе задач было сформировано 7 экспериментальных групп (по 10 особей в каждой): 1-я группа – мыши интактные, у мышей 2-й–7-й групп моделировали иммунодефицит однократным внутрибрюшинным введением циклофосфамида [8]. Иммунодефицитные мыши 2-й группы не получали иммуномодулирующей терапии. Животные остальных групп получали либо одну из фракций ЛПС для оценки их иммуномодулирующих свойств, (группы 4-я – 7-я), либо препарат сравнения (3-я группа). Контрольным препаратом для сравнения биологической (иммуномодулирующей) активности фракций ЛПС служил Ликопид® (*Химическое название: [4-О-(2-ацетиламино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетилмурамил]-L-аланил-D-α-глутамиламид*), синтетический аналог бактериальных гликопептидов из фармакотерапевтической группы - иммуностимулирующее средство. Разовую мышиную дозу рассчитывали в соответствии с инструкцией по терапевтическому применению препарата для взрослых (0,14–0,28 мг/кг). Доза составила 0,1 мл свежеприготовленного раствора препарата сравнения (0,05 мг/мл) для одного подопытного животного при средней массе в 30 г – 0,17 мг/кг.

Препарат сравнения и исследуемые фракции ЛПС-1, ЛПС-2, ЛПС-3, ЛПС-4 вводили в рассчитанных дозировках внутрибрюшинно соответственно через 1 сут после индуцирования иммунодефицита, затем ежедневно в течение 21 сут. Для исследуемых фракций ЛПС разовая доза составляла 0,2 мл (концентрация 10 пг/мл).

Приготовление микропрепаратов и подсчет лейкоцитарной формулы осуществляли по принятым для общеклинических исследований методикам [15].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 10. Вычисляли среднюю арифметическую (M), стандартное отклонение

(σ), медиану (Me) и межквартильный размах (Q1-Q3). Статистическую значимость различий количественных признаков между группами определяли с помощью непараметрических критериев Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Одним из комплексных показателей первой линии доказательств отсутствия побочных эффектов биологически активных соединений, связанных, в частности, с воспалительной реакцией, являются весовые (взвешивание) и/или объемные характеристики внутренних органов (измерение соответствующих коэффициентов их массы) [17]. Массу органов определяли после удаления адипозной и соединительной ткани. При сравнении полученных нами данных с единичными доступными источниками в литературе по нормам для лабораторных мышей были выявлены значимые различия. Это послужило основанием для того, чтобы в последующем литературные данные для расчетов не использовать, а приводить их только из сообщений объективности (табл. 1).

Результаты определения весовых характеристик органов представлены в табл. 1. Введение циклофосфана (группа 2-я, иммунодефицитные мыши без лечения) приводило к статистически значимому увеличению массы селезенки – на 41%. Однако при введении ликопида, ЛПС-1 и ЛПС-3 масса селезенки при индуцированном циклофосфаном иммунодефиците возвращалась к значениям интактных животных.

Масса сердца, печени и почек при введении циклофосфана значимо не изменялись. Вместе с тем при одновременном введении ЛПС-3 на фоне иммунодефицита статистически значимо уменьшалась масса печени, а для фракций ЛПС-1, ЛПС-2- ЛПС-3 и ЛПС-4 – значимо снижалась и масса почек.

Исследование крови. Удобной моделью для комплексной оценки биологической активности исследуемых соединений, безусловно, является система кровотока. Количественные и функциональные изменения клеток крови дают возможность фиксации нарушений ведущих генетически заложенных программ функционирования всех клеток организма – пролиферация, дифференцировка и апоптоз [18]. В связи с этим наблюдения были проведены исследования изменений лейкоцитарной формулы (табл. 2).

В частности у мышей при индуцировании иммунодефицита циклофосфаном (группа 2) в сравнении с интактными мышами (группа 1) уменьшалось количество всех клеток крови. Однако снижение количества

эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, моноцитов было статистически значимым, а снижение числа базофилов и лимфоцитов – не значимым. (табл. 3).

У иммунодефицитных мышей, не получавших лечения, количество базофилов увеличивалась в пределах их нормального содержания даже в сравнении с нормой только при введении фракции ЛПС-4. Тогда как относительно иммунодефицитных мышей, не получавших лечения, к значимому увеличению числа базофилов приводило введение как всех фракций липополисахаридов (ЛПС-1, ЛПС-2, ЛПС-3 и ЛПС-4), так и препарата сравнения Ликопада (табл. 2).

Количество эозинофилов при введении циклофосфана значительно снижалось, но восстанавливалось до нормы благодаря введению как иммуномодулятора ликопада, так и фракций ЛПС-1, ЛПС-2, ЛПС-3 и ЛПС-4) «ожидаемых» иммуномодуляторов. Однако в сравнении с показателями иммунодефицитных мышей

биологическая активность была показана для всех указанных выше соединений кроме ЛПС-1 (табл. 2).

Количество палочкоядерных нейтрофилов на фоне развившегося вторичного иммунодефицита существенно снижалось, но ни одной из исследованных субстанций не восстанавливалось до нормы. В сравнении с иммунодефицитными мышами, не получавшими лечения, изменения концентрации указанных клеток были значимыми при введении фракций ЛПС-2, ЛПС-3 и ЛПС-4, но не ликопада и ЛПС-1 (табл. 2).

При введении циклофосфана происходило значимое уменьшение количества сегментоядерных нейтрофилов. Нормальное содержание указанных клеток восстанавливалось при инъекциях ликопада и ЛПС-2, тогда как введение фракций ЛПС-1, ЛПС-3 и ЛПС-4 приводило к превышению нормальных показателей. Относительно иммунодефицитных мышей, не получавших лечения, все исследованные субстанции значимо увеличивали количество клеток данного типа (табл. 2).

Таблица 1

Весовые характеристики органов мыши в норме и в эксперименте с фракциями ЛПС *Sinorhizobium meliloti*

Показатель	Масса органа [13]	Группы мышей						
		1 (n=10)	2 (n=10)	3 (n=10)	4 (n=10)	5 (n=10)	6 (n=10)	7 (n=10)
		Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопад	ЛПС-1	ЛПС-2	ЛПС-3	ЛПС-4
Селезенка								
M±σ Me/ [Q1-Q3]	0,152±0,0031	0,178±0,04 0,18 [0,135-0,165]	0,252±0,04 0,28 [0,205-0,25] P₁₋₂=0,047	0,228±0,07 0,27 [0,155-0,215] P₂₋₃=0,4 P₁₋₃=0,21	0,194±0,06 0,18 [0,135-0,16] P₂₋₄=0,076 P₁₋₄=0,68	0,288±0,1 0,27 [0,205-0,26] P₂₋₅=0,75 P₁₋₅=0,047	0,164±0,06 0,15 [0,125-0,145] P₂₋₆=0,028 P₁₋₆=0,53	0,276±0,06 0,25 [0,24-0,25] P₂₋₇=0,75 P₁₋₇=0,01
Сердце								
M±σ Me/ [Q1-Q3]	0,12±0,007	0,184±0,05 0,18 [0,14-0,165]	0,214±0,04 0,19 [0,185-0,19] P₁₋₂=0,754	0,196±0,05 0,18 [0,155-0,175] P₂₋₃=0,251 P₁₋₃=0,75	0,178±0,04 0,18 [0,14-0,17] P₂₋₄=0,14 P₁₋₄=0,83	0,154±0,04 0,15 [0,12-0,135] P₂₋₅=0,047 P₁₋₅=0,25	0,148±0,02 0,14 [0,135-0,14] P₂₋₆=0,009 P₁₋₆=0,21	0,142±0,02 0,15 [0,12-0,135] P₂₋₇=0,009 P₁₋₇=0,14
Печень								
M±σ Me/ [Q1-Q3]	1,360±0,114	1,574±0,18 1,59 [1,425-1,58]	1,42±0,29 1,3 [1,2-1,25] P₁₋₂=0,251	1,48±0,22 1,5 [0,265-1,43] P₂₋₃=0,676 P₁₋₃=0,4	1,444±0,2 1,43 [1,28-1,36] P₂₋₄=0,602 P₁₋₄=0,25	1,958±0,38 1,78 [1,66-1,765] P₂₋₅=0,047 P₁₋₅=0,06	1,196±0,27 1,17 [0,975-1,18] P₂₋₆=0,175 P₁₋₆=0,03	1,404±0,19 1,29 [1,265-1,285] P₂₋₇=0,875 P₁₋₇=0,21
Почки								
M±σ Me/ [Q1-Q3]	0,33±0,021	0,43±0,03 0,44 [0,405-0,435]	0,374±0,09 0,37 [0,285-0,33] P₁₋₂=0,531	0,352±0,08 0,37 [0,265-0,325] P₂₋₃=0,251 P₁₋₃=0,08	0,276±0,05 0,26 [0,24-0,25] P₂₋₄=0,06 P₁₋₄=0,009	0,306±0,04 0,33 [0,26-0,295] P₂₋₅=0,175 P₁₋₅=0,009	0,298±0,08 0,27 [0,22-0,3] P₂₋₆=0,175 P₁₋₆=0,009	0,348±0,04 0,36 [0,315-0,355] P₂₋₇=0,6 P₁₋₇=0,012

Индукция экспериментального иммунодефицита у мышей циклофосфаном не приводило к значимому изменению концентрации лимфоцитов в крови. Однако введение мышам исследуемых групп фракций ЛПС-2, ЛПС-3 и ЛПС-4 статистически значимо сопровождалось лимфоцитозом (табл. 2).

Введение мышам циклофосфамида сопровождалось статистически значимой моноцитопенией, концентрация моноцитов восстанавливалась до нормы при введении фракций ЛПС-2, ЛПС-3 и ЛПС-4, но не ликопида или ЛПС-1. В сравнении с иммунодефицитными мышами без лечения (группа 2) биологическую активность сохраняли фракции ЛПС-3 и ЛПС-4 (табл. 2).

Таким образом, при введении мышам на фоне вторичного экспериментального иммунодефицита в качестве биологически активного препарата ликопида (группа 3) в лейкоформуле сохранялась сниженное число палочкоядерных нейтрофилов и моноцитопе-

ния; При введении фракции ЛПС-1 выявлялось сниженное содержание палочкоядерных нейтрофилов и моноцитопения, но значимо увеличивалось количество сегментоядерных нейтрофилов; При введении ЛПС-2 – сниженное содержание палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитоз; ЛПС-3 – сниженное содержание палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитоз на фоне значимого увеличения количества сегментоядерных нейтрофилов; При введении ЛПС-4 отмечалось увеличение числа базофилов, сниженное содержание палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитоз на фоне значимого увеличения количества сегментоядерных нейтрофилов (табл. 2).

Бактериальные липополисахариды (эндотоксины, ЛПС) достаточно давно находятся в зоне пристального внимания исследователей. Это обусловлено многообразием и эффективностью их биологического действия. Наиболее грозным проявлением является сеп-

Таблица 2

Влияние фракций ЛПС *Sinorhizobium meliloti* на количество клеток крови белых мышей с вторичным иммунодефицитом

Показатель	Лейкоформула белых мышей в норме [14]	Группа мышей						
		1 (n=10) Контроль интактные	2 (n=10) Контроль б/лечения	3 (n=10) Ликопид	4 (n=10) ЛПС-1	5 (n=10) ЛПС-2	6 (n=10) ЛПС-3	7 (n=10) ЛПС-4
Базофилы								
M±σ Me/[Q1-Q3]	0,0-2,0	1,2±0,84 1/[0,5-1]	0,4±0,55 0,5/[0-1] p ₁₋₂ =0,14	1,8±0,84 2/[1-1,5] p ₂₋₃ =0,03 p ₁₋₃ =0,35	2±0,71 2/[1,5-2] p ₂₋₄ =0,02 p ₁₋₄ =0,18	1,8±0,84 2/[1-1,5] p ₂₋₅ =0,02 p ₁₋₅ =0,35	2,4±0,9 3/[1,5-2,5] p ₂₋₆ =0,03 p ₁₋₆ =0,08	2,4±0,55 2/[2-2] p ₂₋₇ =0,009 p ₁₋₇ =0,047
Эозинофилы								
M±σ Me/[Q1-Q3]	0,0-4,0	2,6±1,15 3/[1,5-2,5]	0,8±0,84 1/[0-0,5] p ₁₋₂ =0,04	2,4±0,55 2/[2-2] p ₂₋₃ =0,022 p ₁₋₃ =0,68	2±1 2/[1-1,5] p ₂₋₄ =0,09 p ₁₋₄ =0,4	2,4±0,5 2/[2-2] p ₂₋₅ =0,02 p ₁₋₅ =0,68	2,4±0,5 2/[2-2] p ₂₋₆ =0,02 p ₁₋₆ =0,6	2,4±0,89 3/[1,5-2,5] p ₂₋₇ =0,04 p ₁₋₇ =0,75
Палочкоядерные								
M±σ Me/[Q1-Q3]	1,0-5,0	4±0,7 4/[3,5-4]	0,8±0,84 1/[0-0,5] p ₁₋₂ =0,009	2±1 2/[1-1,5] p ₂₋₃ =0,095 p ₁₋₃ =0,016	1,6±0,89 1/[1-1] p ₂₋₄ =0,21 p ₁₋₄ =0,012	2,2±0,45 2/[2-2] p ₂₋₅ =0,03 p ₁₋₅ =0,012	2,4±0,89 3/[1,5-2,5] p ₂₋₆ =0,04 p ₁₋₆ =0,022	2,2±0,45 2/[2-2] p ₂₋₇ =0,03 p ₁₋₇ =0,012
Сегментоядерные								
M±σ Me/[Q1-Q3]	13,0-30,0	21,6±3,71 21/[18,5-20,5]	14,2±4,27 15/[10-12,5] p ₁₋₂ =0,02	26±7,25 28/[24,5-26,5] p ₂₋₃ =0,02 p ₁₋₃ =0,35	28,6±4,83 29/[27-28,5] p ₂₋₄ =0,009 p ₁₋₄ =0,047	29,2±2,39 15/[28-31] p ₂₋₅ =0,009 p ₁₋₅ =0,75	32,4±6,88 32/[26,5-31,5] p ₂₋₆ =0,009 p ₁₋₆ =0,03	33±6,89 31/[27,5-29,5] p ₂₋₇ =0,009 p ₁₋₇ =0,012
Лимфоциты								
M±σ Me/[Q1-Q3]	60,0-78,0	63,6±7,35 63/[57-62]	55,2±6,02 55/[49,5-53] p ₁₋₂ =0,09	58,6±6,88 55/[54-55] p ₂₋₃ =0,46 p ₁₋₃ =0,25	58±5,39 55/[54-55] p ₂₋₄ =0,46 p ₁₋₄ =0,25	74,8±4,44 72/[71,5-72] p ₂₋₅ =0,009 p ₁₋₅ =0,012	80,4±3,85 79/[76,5-79] p ₂₋₆ =0,009 p ₁₋₆ =0,012	78,6±4,28 81/[74,5-77,5] p ₂₋₇ =0,009 p ₁₋₇ =0,009
Моноциты								
M±σ Me/[Q1-Q3]	2,0-5,0	3,4±1,34 4/[2-3]	1,2±0,84 1/[0,5-1] p ₁₋₂ =0,03	1,6±0,55 2/[1-1,5] p ₂₋₃ =0,46 p ₁₋₃ =0,047	1,6±0,55 2/[1-1,5] p ₂₋₄ =0,46 p ₁₋₄ =0,05	2,4±1,14 2/[1,5-2] p ₂₋₅ =0,12 p ₁₋₅ =0,25	3,8±1,1 4/[3-4] p ₂₋₆ =0,02 p ₁₋₆ =0,68	3,8±0,84 4/[3-3,5] p ₂₋₇ =0,009 p ₁₋₇ =0,68

сис [2-7, 19]. Наряду с этим в настоящее время всё больше данных за то, что ЛПС грамотрицательных бактерий могут рассматриваться и в качестве универсального физиологического регулятора системы кроветворения и, соответственно, иммунной системы, неотъемлемой частью которой она является. У человека и животных регуляция происходит с начальных этапов гемопоэза и формирования иммунитета и продолжается в течение всей жизни [1, 8, 9, 20]. Возможность терапевтического применения ЛПС и/или их фракций, в том числе и в качестве стимуляторов гемопоэза и/или иммуномодуляторов весьма перспективно. Однако механизмы переключения и/или перехода эффектов ЛПС из разряда физиологических в категорию патологических ещё очень далеки от понимания.

Показано, что направленность и интенсивность эффектов ЛПС носят дозозависимый характер [21], внутри вида это определяется особенностями генетического детерминирования биосинтеза молекулы ЛПС [22] и её структурными особенностями [23]. При этом долгое время априори подразумевалось, что «цитокиновая буря» или сепсис связаны с липополисахаридами преимущественно патогенных для человека и животных видов грамотрицательных бактерий [18]. Однако относительно недавно было установлено, что ЛПС является одним из наиболее патогенетически значимых факторов и для многочисленных видов бактерий рода *Acinetobacter*, медицинское значение которых в качестве возбудителей госпитальных инфекций, чаще связывали с резистентностью к антибактериальным препаратам [24].

В этой связи научный интерес могут представлять сравнительные данные о биологической активности ЛПС грамотрицательных бактерий, не являющихся патогенами или симбионтами человека и животных, к которым могут быть отнесены представители рода *Sinorhizobium*, также включающие в состав клеточной стенки липополисахариды и являющиеся жизненно важными азотфиксирующими симбионтами бобовых [25, 26].

Необходимо отметить, что поиск новых биологически активных соединений является одной из наиболее сложных задач экспериментальной биологии и медицины, поскольку в данной области концентрируется целый ряд проблем фундаментальной науки. Выбор в качестве экспериментальной модели вторичного иммунодефицита у мышей, в том числе обусловленного изменениями клеточного состава крови, на наш взгляд, методологически совершенно оправдан, поскольку стимуляция в состоянии нормы неминуемо приведет к отклонению от неё. В связи с этим стимулирующая активность в эксперименте может быть установлена только в направлении восстановления физиологических показателей [8].

В результате определения весовых характеристик установлено (табл. 1), что введение циклофосфана (группа 2-я) у иммунодефицитных мышей статистически значимо увеличивает (на 41%) массу селезенки и значимо снижает содержание в крови палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов. Это согласуется с представлением о цитотоксичности циклофосфана и развитием которого является угнетение кроветворения преимущественно в результате истощения костномозгового гранулоцитарного резерва. При введении экспериментальным животным ликопада в сравнении с группой 2-й, в которой данный препарат не вводился, происходило значимое увеличение количества базофилов, эозинофилов и сегментоядерных нейтрофилов. Увеличение числа базофилов могло явиться следствием развития клеточной воспалительной реакции замедленного типа. Дегрануляция базофилов, в свою очередь стимулирует хемотаксис эозинофилов, количество которых при введении ликопада увеличивалось. С данным положением согласуется наблюдаемое повышение на этом фоне количества сегментоядерных нейтрофилов [18].

При введении фракции ЛПС-1 имела место тенденция, показанная, в том числе, и для ликопада. Однако, несмотря на более существенное увеличение количества базофилов, это не сопровождалось сочетанным повышением количества эозинофилов. Последнее могло быть связано с менее выраженной в данном случае дегрануляцией базофилов.

При введении иммунодефицитным мышам фракции ЛПС-2 картина крови соответствовала клеточной воспалительной реакции замедленного типа, сопровождавшаяся дегрануляцией базофилов с последующей эозинофилией. Существенное возрастание количества и палочкоядерных, и сегментоядерных нейтрофилов могло указывать на более выраженную в сравнении с ликопадом стимуляцию данной фракцией костного мозга

Наиболее выраженная гемопоэтическая активность была показана для фракций ЛПС-3 и ЛПС-4, что характеризовалось значительным увеличением количества всех клеточных элементов белой крови. Указанное могло быть следствием ещё более выраженной, нежели у других фракций, стимуляции костного мозга в сочетании с наиболее интенсивной для данного эксперимента клеточной воспалительной реакцией замедленного типа, реактивным лимфоцитозом и моноцитозом. Последнее могло быть следствием стимуляции данными фракциями пролиферативной активности клеточных элементов моноцитопоэза в костном мозге, наблюдаемой при хронических инфекциях, сопровождающихся формированием гранулем [18].

Полученные данные в целом согласуются с тем, что при тяжелой бактериальной инфекции, связанной с внутривенным введением мышам *Escherichia coli*, наблюдается выраженная стимуляция гранулоцитопоэза на уровне костного мозга, что рассматривается в качестве важной составляющей начальных этапов иммунного ответа. Молекулярную основу этого составляет усиление экспрессии стволовыми клетками костного мозга, предшественниками гранулоцитопоэза мышей, антигена-1 ("stem cell antigen-1" (Sca-1)) и целого ряда различных Toll-подобных рецепторов, которые активно взаимодействуют с молекулой ЛПС. Указанное сопровождается воспалительной реакцией и стимуляцией гуморального ответа. Последнее стало основанием для рассмотрения ЛПС и провоспалительных цитокинов в качестве «примитивных прекурсоров» гемопоэза [27]. Это отличает патологические варианты гранулоцитопоэза, наблюдаемые при бактериальных инфекциях, при которых, наряду с гранулоцитозом, имеет место ингибирование других клеточных линий, преимущественно лимфоидных и эритроидных ростков [28].

Отдельные составляющие выявленных модулирующих эффектов фракций ЛПС *Sinorhizobium meliloti* могут быть схожи с механизмами «экстренного миелопоэза», наблюдаемыми при физиологичном течении бактериальных инфекций. При этом быстрое увеличение количества иммунокомпетентных клеток происходит в результате непосредственной стимуляции пролиферативной активности гематопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников через взаимодействие ЛПС и/или его структурных компонентов с Toll-рецепторами. Это сопровождается продукцией факторов роста и цитокинов зрелыми клетками костного мозга и паракринными эффектами активированных через Toll-рецепторы стволовых клеток [29].

Безусловно, медико-биологическое значение ЛПС грамотрицательных бактерий чрезвычайно велико, поскольку в патологии человека наиболее критичным исходом сепсиса является иммунопаралич со всеми вытекающими отсюда трагическими последствиями. Вместе с тем, в последние годы в этом направлении обозначились определенные позитивные перемены. В частности *ex vivo* была показана терапевтическая перспектива применения при сепсисе γ -интерферона (IFN- γ) и гранулоцито-макрофагально-колониестимулирующего фактора (GM-CSF). Однако позднее исследование проведенные на волонтерах, дали неоднозначные результаты [30]. Во-многом проведение поисковых работ в данном направлении осложняется проблемой экспериментального моделирования, в том числе сепсиса, когда попадает цельная субстанция ЛПС. Одно из решений данной проблемы эксперимен-

тальной биологии и медицины, исходя из результатов нашей работы, может заключаться в применении для экспериментов *in vivo* фракций ЛПС, например, *Sinorhizobium meliloti*, демонстрирующих сходную с цельными ЛПС грамотрицательных бактерий биологическую активность, но не являющихся токсичными.

Заключение

Результаты исследования биологической активности фракций ЛПС *Sinorhizobium meliloti* свидетельствуют, что некоторые из них (ЛПС-2, ЛПС-3 и ЛПС-4) стимулируют гемопоэз по типу иммуномодуляторов вследствие значимого повышения количества лимфоцитов.

Литература

1. Bengmark S. Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacological Research*. 2013; 69(1): 87–113.
2. Жеребцова Н.Ю., Валишин Д.А., Мавзютов А.Р. Провоспалительные цитокины при острых кишечных инфекциях, вызванных энтеробактериями у детей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007; 3: 48-52.
3. Aziz M., Jacob A., Yang W.-L., Matsuda A., Wang P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *Journal of Leucocyte Biology*. 2013; 93: 329-42;
4. Rosadini C.V., Kagan J.C. Early innate immune responses to bacterial LPS. *Curr Opin Immun*. 2017; 44: 14-9.
5. Gomes J.M.G., Costa J.A., Alfenas R.C.G. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism*. 2017; 68: 133-44.
6. Мавзютов А.Р., Бондаренко К.Р., Еникеев А.Н., Бондаренко В.М. Системная эндотоксемия как патогенетический фактор осложнения беременности. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2012; 5: 16-21.
7. Kato N., Sugiyama T., Naito S., Arakawa Y., Ito H., Kido N. et al. Molecular structure of bacterial endotoxin (Escherichia coli Re lipopolysaccharide): implications for formation of a novel heterogeneous lattice structure. *Molecular Microbiology*. 2000; 36(4): 796-805.
8. Мавзютов А.Р., Князева О.А., Гарафутдинов Р.Р., Габдрахманова А.Р. Влияние липополисахарида *Escherichia coli* на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови мышей с индуцированным иммунодефицитом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 3: 84-90.
9. Kuzmich N.N., Sivak K.V., Chubarev V.N., Porozov Y.B., Savateeva-Lyubimova T.N., Peri F. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines (Basel)*. 2017; 5(4). pii: E34. doi: 10.3390/vaccines5040034.
10. Gao J., Guo Z.I. Progress in the synthesis and biological evaluation of lipid A and its derivatives. *Med Res Rev*. 2017. doi: 10.1002/med.21447.
11. Geddes B.A., Oresnik I.J. Physiology, genetics, and biochemistry of carbon metabolism in the alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Can J Microbiol*. 2014; 60(8): 491-507. doi: 10.1139/cjm-2014-0306.
12. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В., ред. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. М.; Профиль-2С, 2010.

13. Юшков Б.Г., Черешнев В.А. *Понятие нормы в физиологии (физиологические константы лабораторных животных)*. 2016.
14. Хиггинс К. (Эммануэль В.Л., ред.). *Расшифровка клинических лабораторных анализов*. 3-е. изд. М.; БИНОМ. Лаборатория знаний; 2008.
15. Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р. Выделение препаративных количеств липополисахаридов *E. coli* методом жидкостной колоночной хроматографии. *Вестник Башкирского университета*. 2017; 22(2): 351-55.
16. Хабриев Р.У. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.; 2005.
17. Долгов В.В., ред. *Клиническая лабораторная диагностика: в 2 т.* Т. 1. М.; ООО "Лабдиаг"; 2017.
18. Лиходей В.Г., Юшук Н.Д., Яковлев М.Ю. Роль эндотоксина грамотрицательных бактерий в инфекционной и неинфекционной патологии. *Архив патологии*. 1996; 58(2): 8-13.
19. Wyns H., Plessers E., De Backer P., Meyer E., Croubels S. In vivo porcine lipopolysaccharide inflammation models to study immunomodulation of drugs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2015 Aug 15; 166(3-4): 58-69. doi:10.1016/j.vetimm.2015.06.001. Epub 2015 Jun 7.
20. Салахов И.М., Аниховская И.А., Майский И.А., Маркелова М.М., Окорочков П.Л., Хасанова Г.Р. и др. Нормативные показатели системной эндотоксемии как базисный элемент определения роли липополисахаридов кишечной микрофлоры в общей патологии. *Патогенез*. 2015; 13(1): 18-27.
21. Книрель Ю.А., Анисимов А.П. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства. *Acta naturae*. 2012; 4(3): 49-61.
22. Huang J.X., Azad M.A.K., Yuriev E., Baker M.A., Nation R.L., Li J. et al. Molecular Characterization of Lipopolysaccharide Binding to Human α -1-Acid Glycoprotein. *Journal of Lipids*. 2012; Article ID 475153: 15 pages. doi:10.1155/2012/475153/ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539403/.
23. Wong D., Nielsen T.B., Bonomo R.A., Pantapalangkoor P., Luna V., Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev*. 2017; 30: 409-47. https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16.
24. Arnold M.F.F., Shabab M., Penterman J., Boehme K.L., Griffiths J.S., Walker G.C. Genome-wide sensitivity analysis of the microsym-biont *Sinorhizobium meliloti* to symbiotically important, defensin-like host peptides. *mBio*. 2017; 8: e01060-17. https://doi.org/10.1128/mBio.01060-17.
25. Acosta-Jurado S, Navarro-Gómez P, Murdoch P.dS., Crespo-Rivas J.-C., Jie S., Cuesta-Berrio L. et al. Exopolysaccharide Production by *Sinorhizobium fredii* HH103 Is Repressed by Genistein in a NodD1-Dependent Manner. *PLoS ONE*. 2016; 11(8): e0160499. doi:10.1371/journal.pone.0160499
26. Shi X., Siggins R.W., Stanford W.L., Melvan J.N., Basson M.D., Zhanga P. Toll-Like Receptor 4/Stem Cell Antigen 1 Signaling Promotes Hematopoietic Precursor Cell Commitment to Granulocyte Development during the Granulopoietic Response to *Escherichia coli* Bacteremia. *Infection and Immunity*. 2013; 81(6): 2197-205.
27. Ueda Y., Kondo M., Kelsøe G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J. Exp. Med*. 2005; 201: 1771-80.
28. Skirecki T., Kawiak J., Machaj E., Pojda Z., Wasilewska D., Czubak J. et al. Early severe impairment of hematopoietic stem and progenitor cells from the bone marrow caused by CLP sepsis and endotoxemia in a humanized mice model. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; 6(142): 1-14. DOI 10.1186/s13287-015-0135-9.
29. Leentjens J., Kox M., Koch R.M., Preijers F., Joosten L.A.B., van der Hoeven J.G. et al. Reversal of Immunoparalysis in Humans *In Vivo* A Double-Blind, Placebo-controlled, Randomized Pilot Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2012; 186(9): 838-45.
30. Kiers D., Koch R.M., Hamers L., Gerretsen J., Thijs E.J.M., van Ede L. et al. Characterization of a model of systemic inflammation in humans *in vivo* elicited by continuous infusion of endotoxin. *Scientific Reports*. 2017; 7: 40149. DOI: 10.1038/srep40149. www.nature.com/scientificreports

References

1. Bengmark S. Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacological Research*. 2013; 69(1): 87-113.
2. ZHerebcova N.Yu., Valishin D.A., Mavzyutov A.R. Proinflammatory cytokines in children with acute enteric infections caused by enterobacteria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2007; 3: 48-52. (in Russian)
3. Aziz M., Jacob A., Yang W.-L. et al. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *Journal of Leucocyte Biology*. 2013; 93: 329-42.
4. Rosadini C.V., Kagan J.C. Early innate immune responses to bacterial LPS. *Curr. Opin. Immunol*. 2017; 44: 14-9.
5. Gomes J.M.G., Costa J.A., Alfnas R.C.G. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism*. 2017; 68: 133-44.
6. Mavzyutov A.R., Bondarenko K.R., Enikeev A.N., Bondarenko V.M. Systemic endotoxemia as a pathogenetic factor of complication of pregnancy. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012; 5: 16-21. (in Russian)
7. Kato N., Sugiyama T., Naito S., Arakawa Y., Ito H., Kido N. et al. Molecular structure of bacterial endotoxin (*Escherichia coli* Re lipopolysaccharide): implications for formation of a novel heterogeneous lattice structure. *Molecular Microbiology*. 2000; 36(4): 796-805.
8. Mavzyutov A.R., Knyazeva O.A., Garafutdinov R.R., Gabdrakhmanova A.R. Influence lipopolisaccharide *E.coli* on the phagocytic and metabolic activity of neutrophils of trophils of blood of mice with induced immunodeficiency. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; 3: 84-90. (in Russian)
9. Kuzmich N.N., Sivak K.V., Chubarev V.N., Porozov Y.B., Savateeva-Lyubimova T.N., Peri F. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines (Basel)*. 2017; 5(4). pii: E34. doi: 10.3390/vaccines5040034.
10. Gao J., Guo Z.I. Progress in the synthesis and biological evaluation of lipid A and its derivatives. *Med Res Rev*. 2017. doi: 10.1002/med.21447.
11. Geddes B.A., Oresnik I.J. Physiology, genetics, and biochemistry of carbon metabolism in the alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Can J Microbiol*. 2014; 60(8): 491-507. doi: 10.1139/cjm-2014-0306/
12. Karkishchenko N.N., Grachev S.V., eds. *Guidelines to laboratory animals and alternative models in biomedical research. [Rukovodstvo po laboratornym zivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh]*. Moscow; Profil'-2S; 2010. (in Russian)
13. Yushkov B.G., Chereshev V.A. *The concept of norm in physiology (physiological constants of laboratory animals). [Ponyatiye normy v fiziologii (fiziologicheskiye konstanty laboratornykh zivotnykh)]*. 2016. (in Russian)
14. Khiggins K. (Emmanuel' V.L., eds.). *Decoding of clinical laboratory tests. [Rasshifrovka klinicheskikh laboratornykh analizov]*. 3rd. ed. Moscow; BINOM. Laboratoriya znaniy; 2008. (in Russian)

15. Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R. Isolation of preparative amounts of E. coli lipopolysaccharides by liquid column chromatography. *Vestnik Bashkirskogo universiteta*. 2017; 22(2): 351-5. (in Russian)
16. Khabriyev R.U. *Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]*. Moscow; 2005. (in Russian)
17. Dolgov V.V., eds. *Clinical laboratory diagnostics: in 2 vol. [Klinicheskaya laboratornaya diagnostika: v 2 tj]*. V.1. Moscow; OOO "Labdiag"; 2017. (in Russian)
18. Likhoded V.G., Yushchuk N.D., Yakovlev M.Yu. The role of endotoxin of gram-negative bacteria in infectious and noninfectious diseases. *Arkhiv patologii*. 1996; 58(2): 8-13. (in Russian)
19. Wyns H., Plessers E., De Backer P., Meyer E., Croubels S. In vivo porcine lipopolysaccharide inflammation models to study immunomodulation of drugs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2015 Aug 15; 166(3-4): 58-69. doi:10.1016/j.vetimm.2015.06.001. Epub 2015 Jun 7.
20. Salakhov I.M., Anihovskaya I.A., Maysky I.A., Markelova M.M., Okorokov P.L., Hasanova G.R. et al. The normative data of systemic endotoxemia as the basic element of role definition of lipopolysaccharides of gut organisms in general pathology *Patogenez*. 2015; 13(1): 18-27. (in Russian)
21. Knirel' Yu.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide plague microbe *Yersinia pestis*: structure, genetics, biological properties. *Acta naturae*. 2012; 4(3): 49-61. (in Russian)
22. Huang J.X., Azad M.A.K., Yuriev E., Baker M.A., Nation R.L. et al. Molecular Characterization of Lipopolysaccharide Binding to Human α -1-Acid Glycoprotein. *Journal of Lipids*. 2012; Article ID 475153: 15 pages. doi:10.1155/2012/475153/ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539403/
23. Wong D., Nielsen T.B., Bonomo R.A., Pantapalangkoor P., Luna B., Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev*. 2017; 30: 409-47. https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16.
24. Arnold M.F.F., Shabab M., Penterman J., Boehme K.L., Griffiths J.S., Walker G.C. Genome-wide sensitivity analysis of the microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* to symbiotically important, defensin-like host peptides. *mBio*. 2017; 8: e01060-17. https://doi.org/10.1128/mBio.01060-17.
25. Acosta-Jurado S, Navarro-Gómez P, Murdoch P.dS., Crespo-Rivas J.-C., Jie S., Cuesta-Berrio L. et al. Exopolysaccharide Production by *Sinorhizobium fredii* HH103 Is Repressed by Genistein in a NodD1-Dependent Manner. *PLoS ONE*. 2016; 11(8): e0160499. doi:10.1371/journal.pone.0160499.
26. Shi X., Siggins R.W., Stanford W.L., Melvan J.N., Basson M.D., Zhanga P. Toll-Like Receptor 4/Stem Cell Antigen 1 Signaling Promotes Hematopoietic Precursor Cell Commitment to Granulocyte Development during the Granulopoietic Response to *Escherichia coli* Bacteremia. *Infection and Immunity*. 2013; 81(6): 2197-205.
27. Ueda Y., Kondo M., Kelsoe G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J. Exp. Med*. 2005; 201: 1771-80.
28. Skirecki T., Kawiak J., Machaj E., Pojda Z., Wasilewska D., Czubak J. et al. Early severe impairment of hematopoietic stem and progenitor cells from the bone marrow caused by CLP sepsis and endotoxemia in a humanized mice model. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; 6(142): 1-14. DOI 10.1186/s13287-015-0135-9.
29. Leentjens J., Kox M., Koch R.M., Preijers F., Joosten L.A.B., van der Hoeven J.G. et al. Reversal of Immunoparalysis in Humans *In Vivo* A Double-Blind, Placebo-controlled, Randomized Pilot Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2012; 186(9): 838-45.
30. Kiers D., Koch R.M., Hamers L., Gerretsen J., Thijs E.J.M., van Ede L. et al. Characterization of a model of systemic inflammation in humans *in vivo* elicited by continuous infusion of endotoxin. *Scientific Reports*. 2017; 7: 40149. DOI: 10.1038/srep40149. www.nature.com/scientificreports

Сведения об авторах:

Мавзютов Айрат Радикович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. фундаментальной и прикладной микробиологии, проф. каф. лаб. диагностики ИДПО (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России), e-mail: ufalab@mail.ru;

Гарафутдинов Равиль Ринатович, канд. биол. наук, зав. лаб. физико-химических методов анализа биополимеров (Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН), доцент каф. фундаментальной и прикладной микробиологии (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России), e-mail: garafutdinovr@mail.ru;

Габдрахманова Азалия Ранисовна, ассистент каф. фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, e-mail: gab.azaliya@mail.ru;

Саляхов Ильшат Мозгарович, канд. мед. наук вед. науч. сотр. лаб. системной эндотоксинемии и шока, e-mail: 7261314@rambler.ru;

Тупиев Ильдус Джадитович, канд. биол. наук, доцент каф. фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, доцент, e-mail: ildustil@mail.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Тарасова М.В., Елистратова И.В., Морозов С.Г.

Экспрессия рецепторов нейтрофилов периферической крови при обострении атопического дерматита у взрослых мужчин

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

Нейтрофилы периферической крови играют важную роль в патогенезе атопического дерматита. При обострении атопического дерматита изменяется экспрессия рецепторов на поверхности нейтрофилов и сопряженные с ними сигнальные пути.

Цель исследования – изучение экспрессии рецепторов семейства TREM (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells) на поверхности нейтрофилов и моноцитов периферической крови взрослых людей в начале периода обострения заболевания.

Методика. В исследовании приняли участие 70 больных атопическим дерматитом и 22 здоровых донора. Кровь брали из локтевой вены натощак в вакутейенеры с ЭДТА. После удаления эритроцитов лизирующим буфером (Becton Dickinson) лейкоциты окрашивали моноклональными антителами к специфическим рецепторам нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов (BD-bioscience, Germany), а также к рецепторам TREM-1 и sTREM-1 (R&D System, Minneapolis, MN, USA), и TREM-2 (Abcam, UK). Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитометре FACSCalibur по программе CellQuest. При анализе флуоресценции нефракционированных клеток сначала устанавливали гейты основных популяций на каналах FSC/SSC. Затем выделяли гейт нейтрофилов и в нем анализировали экспрессию рецепторов на каналах FL-1A/FL-2A (CD16/TREM-1 и CD16/TREM-2). Определяли процент антиген-положительных клеток и интенсивность флуоресценции в условных единицах. Экспрессию рецепторов TREM-1 и TREM-2 на моноцитах измеряли аналогично в гейте моноцитов. Концентрацию растворимого рецептора sTREM-1 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью антител (R&D System, Minneapolis).

Результаты. Показано повышение экспрессии рецепторов TREM-1 в ранний период обострения атопического дерматита, положительно коррелирующее со степенью активности процесса. Установлено статистически значимое повышение экспрессии рецепторов TREM-2 на нейтрофилах периферической крови больных на ранней стадии обострения по сравнению с донорами и пациентами в стадии ремиссии. Показано, что повышение экспрессии растворимого рецептора sTREM-1 в клетках нейтрофилов, а также повышение его концентрации в сыворотке крови положительно коррелирует с тяжестью течения атопического дерматита по индексу SCORAD. Экспрессия рецепторов TREM-1 на нейтрофилах повышается как при стимуляции клеток бактериальными пептидами, так и при контаминации кожи бактериями, но в любом случае TREM-1 поддерживает воспаление и коррелирует с тяжестью течения атопического дерматита. **Заключение.** Комплексный анализ экспрессии рецепторов семейства TREM позволяет оценить степень активности воспалительного процесса при атопическом дерматите.

Ключевые слова: атопический дерматит; обострение, нейтрофилы, рецепторы, TREM.

Для цитирования: Тарасова М.В., Елистратова И.В., Морозов С.Г. Экспрессия рецепторов нейтрофилов периферической крови при обострении атопического дерматита у взрослых мужчин. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 29-34.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.29-34

Для корреспонденции: Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, директор НИИОПП, e-mail: biopharm@list.ru

Финансирование: Исследование выполнено за счет средств НИИОПП и не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи были частично представлены на конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» в Пущино-на-Оке в мае 2019г.

Поступила 20.05.2019

Tarasova M.V., Elistratova I.V., Morozov S.G.

Neutrophil receptor expression in peripheral blood of adult male patients with exacerbation of atopic dermatitis

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

Peripheral blood neutrophils play an important role in the pathogenesis of atopic dermatitis (AD). AD exacerbation induces changes in the neutrophil surface receptor expression and coupled signaling pathways. **Aim** of this work was to evaluate TREM (triggering

receptor expressed on myeloid cells) receptor expression on neutrophils and monocytes in peripheral blood of adult patients with AD at the beginning of exacerbation period. **Methods:** This study included 70 patients with AD and 22 healthy donors. Blood was withdrawn from the cubital vein in fasting state and collected in vacutainers with EDTA. Following removal of red blood cells with a lysing buffer (Becton Dickinson) leukocytes were stained with monoclonal antibodies to specific receptors of neutrophils, lymphocytes, and monocytes (BD Bioscience, Germany) and to TREM-1, sTREM-1 (R&D System, Minneapolis, MN, USA), and TREM-2 (Abcam, UK) receptors. Cell fluorescence was analyzed using a FACSCalibur flow cytometer with CellQuest software. In analyzing fluorescence of unfractionated cells, gates of major populations were set on FSC/SSC channels. The neutrophil gate was isolated, and receptor expression was analyzed on FL-1A/FL-2A channels (CD16/TREM-1 and CD16/TREM-2). Proportion of antigen-positive cells was determined; fluorescence intensity was measured in conventional units. TREM-1 and TREM-2 receptor expression on monocytes was measured by the same method in the monocyte gate. Serum concentration of soluble sTREM-1 receptor was measured by enzyme immunoassay with antibodies (R&D System, Minneapolis). **Results.** Elevated TREM-1 receptor expression was observed in the early period of AD exacerbation and positively correlated with AD severity. The expression of TREM-2 receptors on peripheral blood neutrophils was significantly increased in patients with early exacerbation of AD compared to donors and patients in remission. Increased expression of the sTREM-1 soluble receptor on neutrophils and its increased serum concentration positively correlated with AD severity. The TREM-1 receptor expression on neutrophils was increased after either a bacterial peptide exposure or stimulation of immune response by skin bacteria. In both cases, TREM-1 supported inflammation and correlated with AD severity. **Conclusion:** A comprehensive analysis of the TREM family receptor expression allows assessing the intensity of inflammation process in atopic dermatitis.

Keywords: atopic dermatitis, exacerbation, neutrophils, receptors, TREM.

For citation: Tarasova M.V., Elistratova I.V., Morozov S.G. Neutrophil receptor expression in peripheral blood of adult male patients with exacerbation of atopic dermatitis. *Pathologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 29-34. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.29-34

For correspondence: *Sergey G. Morozov*, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the "Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of General Pathology and Pathophysiology", 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: biopharm@list.ru.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. Some part of this work has been present on the conference "Receptors and intercellular signaling", Puschino-na-Oke, May 2019, and has been partly printed in the conference abstract book.

Acknowledgments. The study has no sponsorships.

Поступила 20.05.2019

Введение

Атопическим дерматитом (АтД) страдает около 10% населения развитых стран. Изучение патогенеза АтД актуально для выявления новых мишеней действия лекарственных препаратов. Важную роль в патогенезе АтД играют нейтрофилы, в связи с секрецией активных биологических соединений, поддерживающих воспалительный процесс в коже и тканях больных [1]. Нейтрофилы относятся к полиморфноядерным гранулоцитам и играют роль в активации природного иммунного ответа организма на инфекционные патогены за счет продукции активных форм кислорода, провоспалительных цитокинов (интерлейкинов (interleukin, IL), фактора некроза опухолей (tumor necrosis factor, TNF- α) и др.), протеаз (эластазы нейтрофилов и других протеаз из первичных и вторичных гранул нейтрофилов), микроРНК [2], а также за счет эффекторной функции в межклеточных взаимодействиях при адаптивном иммунитете. Разнообразие рецепторов нейтрофилов на поверхности их плазматической мембраны позволяет инициировать сигнальные пути в клетке, включающие активацию G-протеинов, кальциевые сигналы, протеинкиназы, липидные киназы, адаптерные белки, белки цитоскелета и т.д. [3].

Нейтрофилы экспрессируют различные типы рецепторов: это G-протеин-сопряженные рецепторы хемокинов и хемоаттрактантов, Fc-рецепторы, рецепторы адгезии (селектины, лиганды селективов, интегрины), рецепторы цитокинов, рецепторы, сопряженные с сигналами природного иммунитета (TLR, лектины C-типа и др.). К последней группе относится семейство TREM (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells), которое входит в суперсемейство иммуноглобулинов (Ig) и включает рецепторы TREM-1, TREM-2, растворимую форму sTREM-1, а также TREM-подобные транскрипты TREM-LT1, TREM-LT2, которые экспрессируются на нейтрофилах и моноцитах периферической крови [4]. Всё семейство регулирует воспалительную реакцию в ответ на инфекционные агенты.

У человека известны 2 изоформы TREM-1. TREM-1 – это мембранный рецептор, ассоциированный с адаптером DAP12, который стабилизирует TREM-1 на поверхности мембраны в мультимеризованном состоянии [5], и растворимый рецептор sTREM-1, экспрессия которого повышается при инфекции; sTREM-1 повышает уровень мРНК TREM1 в нейтрофилах [6], но при этом работает как контр–регуляторная молекула, то есть ослабляет активность воспалительного процесса, спо-

собствуя выживаемости организма [7]. TREM-1 усиливает провоспалительный ответ на бактериальную инфекцию, его активация повышает число нейтрофилов в периферической крови [8], индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов IL-10 и TNF- α [9], амплифицирует воспалительные сигналы за счет активации NLRP3 инфламмасом [10] и играет важную роль в системных инфекциях [11]. Уровень TREM-1 отражает интенсивность бактериальной инфекции и возвращается к норме после клиренса патогенов [6]. В нейтрофилах человека также идентифицирован сплайсинговый вариант изоформы TREM-1 (TREM-1sv) массой 15-kDa, который ингибирует TREM-1—зависимую продукцию провоспалительных цитокинов [4].

При распознавании TREM-1 и активации нейтрофилов, в последних происходит кислородный взрыв, дегрануляция, секреция цитокинов. Мембранный рецептор TREM-1 участвует в трансэпителиальной миграции нейтрофилов в зону воспаления, при этом он работает синергично с рецепторами TLR (Toll-like receptor) и их сигнальными путями [12], а также изменяет соотношение Т-хелперов первого и второго порядка (Th1/Th2) [13]. TREM-1 регулирует хемотаксис нейтрофилов путем стимуляции продукции супероксидного аниона под влиянием NADPH оксидазы [14].

Экспрессия TREM-2 повышается только на 3-и сут после инфицирования бактериями. Основная роль этого рецептора — супрессия воспаления за счет ингибирования сигнального пути фосфоинозитол-3-киназы (PI3K) и протеинкиназы В (Akt), что снижает активность воспалительного процесса и способствует выживанию организма [15].

В неактивированных нейтрофилах транскрипт TREM-LT2 локализован в внутриклеточных секреторных везикулах и первичных гранулах, его экспрессия повышается в ответ на воспалительные медиаторы. После экзоцитоза первичных гранул TREM-LT2 локализуется на плазматической мембране [16].

Цель исследования — изучение экспрессии рецепторов TREM-1, TREM-2 и sTREM-1 на нейтрофилах и моноцитах периферической крови пациентов в ранний период обострения АтД, а также определение концентрации sTREM-1 в сыворотке крови.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена этическим комитетом НИИОПП. В работе приняли участие во-

еннослужащие-мужчины, в возрасте 18–34 лет, прикрепленные к центральному госпиталю Росгвардии России и 22 здоровых донора. В группу больных вошло 70 пациентов с АтД (индекс SCORAD от 15 до 40) с обострением заболевания не более 1 нед от начала появления кожных симптомов до взятия крови. Критериями исключения пациентов и доноров из исследования были острые вирусные или бактериальные инфекции, системные, аллергические, воспалительные или онкологические заболевания, соматическая патология, которая могла бы существенно повлиять на результаты.

Кровь брали из локтевой вены натощак в вакутейнеры с ЭДТА. Лейкоциты крови после удаления эритроцитов лизирующим буфером (Becton Dickinson), отмывали в фосфатном буфере (PBS), окрашивали моноклональными антителами к специфическим рецепторам нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов (BD-bioscience, Germany), а также к рецепторам TREM-1 и sTREM-1 (R&D System, Minneapolis, MN, USA), и TREM-2 (Abcam, UK). Флуоресценцию клеток анализировали [17] на проточном цитометре FACSCalibur по программе CellQuest. При анализе флуоресценции нефракционированных клеток на проточном цитометре сначала устанавливали гейты основных популяций лейкоцитов на каналах FSC/SSC. Затем выделяли гейт нейтрофилов и анализировали экспрессию рецепторов на каналах FL-1A/FL-2A (CD16/TREM-1 и CD16/TREM-2). Определяли процент антиген—положительных клеток, интенсивность флуоресценции оценивали в условных единицах. Экспрессию рецепторов TREM-1 и TREM-2 на моноцитах измеряли аналогично в гейте моноцитов по вышеуказанной схеме.

Концентрацию растворимого рецептора sTREM-1 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью антител (R&D System, Minneapolis) [18].

Результаты статистически обрабатывали по программе ANOVA, данные представлены как $M \pm m$; для анализа групп с малой выборкой использовали метод непараметрического анализа Ньюмена-Кейлса, статистически значимыми считали различия между группами при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Больные АтД в периоде обострения были условно разделены на группы по тяжести течения заболевания согласно индексу SCORAD: меньше 20 единиц — легкое течение ($n = 23$), 30–40 единиц — течение средней тяжести ($n = 26$), больные с тяжелой формой обострения АтД в данном эксперименте не участвова-

ли; 21 пациент был в состоянии ремиссии. Все доноры были здоровы на момент обследования и не имели никаких признаков кожной патологий. Выбранный период обострения важен с точки зрения активности нейтрофилов, которые отвечают активацией на инфекционные агенты и цитокины крови.

Нейтрофилы периферической крови больных АтД на ранней стадии обострения экспрессировали статистически значимо большее число рецепторов TREM-1 и TREM-2 по сравнению со здоровыми донорами и пациентами АтД в стадии ремиссии (табл. 1). У больных с обострением АтД средней степени тяжести относительная плотность рецепторов TREM-1 и TREM-2 на нейтрофилах (по интенсивности флуоресценции) была статистически значимо выше ($p < 0,05$) по сравнению с больными легкой формы обострения АтД.

По данным литературы повышение экспрессии рецепторов TREM-2 отмечается через 3 сут от начала инфекционного заболевания [15]. Наши исследования проводились в 1-ю нед обострения АтД, при этом контаминация

кожи бактериальными патогенами ещё не была терапевтически санирована. Этим можно объяснить статистически значимое повышение экспрессии рецептора TREM-2, который может блокировать провоспалительные сигналы, инициируемые рецептором TREM-1.

Что касается моноцитов периферической крови, то экспрессия рецепторов TREM-1 и TREM-2 не имела статистически значимых различий между исследованными группами пациентов (табл. 2).

Измерение уровня экспрессии растворимых рецепторов sTREM-1 внутри клеток крови показало их статистически значимое повышение при обострении АтД на ранних стадиях по сравнению с донорами и пациентами АтД в стадии ремиссии. Установлено повышение уровня внутриклеточной флуоресценции белка sTREM-1 в нейтрофилах и в моноцитах крови при повышении активности процесса АтД по индексу SCORAD (табл. 3).

Концентрация растворимых рецепторов sTREM-1 в сыворотке крови также значимо повышается при обо-

Таблица 1

Экспрессия рецепторов TREM-1 и TREM-2 на нейтрофилах периферической крови доноров и больных атопическим дерматитом на ранних сроках обострения заболевания

Рецепторы	Доноры (n = 22)	Больные атопическим дерматитом (классификация по индексу SCORAD)		
		Ремиссия (n = 21)	Легкое течение < 20 (n = 23)	Средней тяжести 30–40 (n = 26)
TREM-1, %	25 ± 4%	23 ± 5%	39 ± 6%	48 ± 4%
TREM-1, у.е.	93 ± 3	96 ± 6	141 ± 7	168 ± 5
TREM-2, %	16 ± 3%	19 ± 4%	29 ± 2%	38 ± 3%
TREM-2, у.е.	81 ± 6	89 ± 4	126 ± 3	144 ± 5
# $p < 0,05$			#	#
## $p < 0,05$			##	##

Примечание. SCORAD – индекс тяжести течения атопического дерматита у взрослых; у.е. – условные единицы, отражает интенсивность флуоресценции клеток; # – $p < 0,05$ (по отношению к донорам), ## – $p < 0,05$ (по отношению к пациентам АтД в ремиссии).

Таблица 2

Экспрессия рецепторов TREM-1 и TREM-2 на моноцитах периферической крови доноров и больных атопическим дерматитом на ранних сроках обострения заболевания

Рецепторы	Доноры (n = 22)	Больные атопическим дерматитом (классификация по индексу SCORAD)		
		Ремиссия (n = 15)	Легкое течение < 20 (n = 15)	Средней тяжести 30–40 (n = 20)
TREM-1, %	9,1 ± 4,2	8,2 ± 3,1	11,5 ± 5,3	12,9 ± 6,1
TREM-1, у.е.	39 ± 4	42 ± 6	43 ± 7	46 ± 5
TREM-2, %	8,8 ± 3,1	9,5 ± 3,7	10,2 ± 5,4	11,4 ± 4,1
TREM-2, у.е.	26 ± 3	29 ± 4	29 ± 5	32 ± 6
# $p < 0,05$			–	–
## $p < 0,05$			–	–

Примечание. SCORAD – индекс тяжести течения атопического дерматита у взрослых; у.е. – условные единицы интенсивности флуоресценции клеток; # – $p < 0,05$ (по отношению к донорам), ## – $p < 0,05$ (по отношению к пациентам АтД в ремиссии).

стрении АтД по сравнению с донорами и пациентами в ремиссии и положительно коррелирует со степенью активности процесса АтД по индексу SCORAD (табл. 4).

Таким образом, рецепторы семейства TREM активированы на нейтрофилах на ранних стадиях обострения атопического дерматита, что согласуется с данными литературы по выраженности воспалительного процесса в тканях в период обострения АтД.

Таким образом, установлено, что на ранней стадии обострения АтД экспрессия рецепторов TREM-1, TREM-2 и растворимого рецептора sTREM-1 на нейтрофилах периферической крови статистически значимо отличается от идентичных показателей больных АтД в стадии ремиссии и от контроля (здоровые доноры). Ранее нами показано изменение экспрессии рецепторов TREM-1 при стимуляции нейтрофилов бактериальным пептидом fmlp (formyl-Leu-Met-Phe) у больных АтД [19]. Исследование показало, что экспрессия рецептора TREM-1 повышается как при стимуляции бактериальным пептидом, так и при естественной циркуляции антигенов в периферической крови при АтД. Ранее мы

показывали уровень контаминации кожи больных АтД бактериями и микроскопическими грибами при обострении заболевания [1, 20]. В коже больных АтД присутствуют многочисленные колонии бактерий, которые активируют нейтрофилы и поддерживают воспалительную реакцию. Известно, что рецепторы этого семейства регулируют взаимодействия клеток природного иммунитета и координируют воспалительную реакцию в крови и тканях при бактериальной инфекции [7–9, 11]. Таким образом, подтверждается активность нейтрофилов в начале обострения АтД, что может амплифицировать воспалительную реакцию и повышать тяжесть состояния больного АтД. Исследования моноцитов периферической крови не выявили статистически значимых различий в экспрессии рецептора TREM-1 у больных при обострении АтД по сравнению с контролем. Изменение экспрессии рецепторов семейства TREM позволяет оценить степень активности воспалительного процесса при АтД.

Установлено достоверное повышение экспрессии рецепторов TREM-1 и TREM-2 на нейтрофилах пери-

Таблица 3

Экспрессия рецепторов sTREM-1 в клетках нейтрофилов и моноцитов крови доноров и больных атопическим дерматитом на ранних сроках обострения заболевания

Рецепторы	Доноры (n = 22)	Больные атопическим дерматитом (классификация по индексу SCORAD)		
		Ремиссия (n = 15)	Легкое течение < 20 (n = 15)	Средней тяжести 30–40 (n = 20)
Нейтрофилы периферической крови				
sTREM-1, у.е.	59 ± 6	62 ± 5	89 ± 4	121 ± 6
# — p < 0,05			#	#
## — p < 0,05			##	##
Моноциты периферической крови				
sTREM-1, у.е.	48 ± 7	55 ± 8	82 ± 5	111 ± 5
# — p < 0,05			#	#
## — p < 0,05			##	##

Примечание. SCORAD – индекс тяжести течения атопического дерматита у взрослых; у.е. – условные единицы, отражает интенсивность флуоресценции клеток; # — p < 0,05 (по отношению к донорам), ## — p < 0,05 (по отношению к пациентам в ремиссии).

Таблица 4

Концентрация растворимых рецепторов sTREM-1 в сыворотке крови доноров и больных атопическим дерматитом на ранних сроках обострения заболевания

Рецепторы	Доноры (n = 22)	Больные атопическим дерматитом (классификация по индексу SCORAD)		
		Ремиссия (n = 15)	Легкое течение < 20 (n = 15)	Средней тяжести 30–40 (n = 20)
sTREM-1, пг/мл	340 ± 42	389 ± 54	563 ± 39	851 ± 77
# — p < 0,05			#	#
## — p < 0,05			##	##

Примечание. SCORAD – индекс тяжести течения атопического дерматита у взрослых; пг/мл – концентрация рецепторов в пикограммах на 1 мл сыворотки; # — p < 0,05 (по отношению к донорам), ## — p < 0,05 (по отношению к пациентам в ремиссии).

ферической крови больных atopическим дерматитом на ранней стадии обострения по сравнению с донорами и пациентами в ремиссии.

Показано, что повышение экспрессии растворимого рецептора sTREM-1 в клетках нейтрофилов, а также повышение его концентрации в сыворотке крови положительно коррелирует с тяжестью течения АД по индексу SCORAD.

Экспрессия рецепторов TREM-1 на нейтрофилах повышается как при стимуляции клеток бактериальными пептидами, так и при контаминации кожи бактериями, что поддерживает воспаление и коррелирует с тяжестью течения заболевания.

Литература (п.п. 2-16 см. References)

- Елистратова Е.В., Иванченко О.Б., Гречко А.В., Морозов С.Г. Анализ экспрессии шаперонов DNAJB6/MRJ семейства HSP40 в клетках крови больных atopическим дерматитом при разных стадиях заболевания. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(3): 23-30.
- Елистратова И.В., Тарасова М.В., Морозов С.Г. Динамика генерации супероксидного аниона нейтрофилами крови больных atopическим дерматитом в молодом возрасте. *Патогенез*. 2015; 13(4): 41-6.
- Тарасова М.В., Овсянников М.В., Волкова Е.Н. Активность лейкоцитарной эластазы и альфа-1 протеиназного ингибитора у больных с atopическим дерматитом. *Патогенез*. 2018; 16(4): 153-6.
- Тарасова М.В., Морозов С.Г. *Экспрессия рецепторов нейтрофилов TREM-1 при atopическом дерматите. В сб. Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*. Т. 1 (Ред. В.П. Зинченко, А.В. Бережной). Серпухов; 2019; с. 177-81.
- Кандалова О.В., Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Гречко А.В., Морозов С.Г. Микробиом кожи при atopическом дерматите у взрослых. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 209-14.
- Carrasco K., Boufenzar A., Jolly L., Le Cordier H., Wang G., Heck A. et al. TREM-1 multimerization is essential for its activation on monocytes and neutrophils. *Cell. Mol. Immunol.* 2019; 16(5): 460-72.
- Ubagai T., Nakano R., Kikuchi H., Ono Y. Gene expression analysis of TREM1 and GRK2 in polymorphonuclear leukocytes as the surrogate biomarkers of acute bacterial infections. *Int. J. Med. Sci.* 2014; 11(2): 215-21.
- Cao C., Gu J., Zhang J. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cell-1 (sTREM-1): a potential biomarker for the diagnosis of infectious diseases. *Front. Med.* 2017; 11(2): 169-77.
- Yang C., Chen B., Zhao J., Lin L., Han L., Pan S. et al. TREM-1 signaling promotes host defense during the early stage of infection with highly pathogenic *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 2015; 83(8): 3293-301.
- van Bremen T., Drömann D., Luitjens K., Dodt C., Dalhoff K., Goldmann T. et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (Trem-1) on blood neutrophils is associated with cytokine inducibility in human *E. coli* sepsis. *Diagn. Pathol.* 2013; (8): 24-9.
- Liu T., Zhou Y., Li P., Duan J., Liu Y., Sun G. et al. Blocking triggering receptor expressed on myeloid cells-1 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting NLRP3 inflammatory activation. *Sci. Rep.* 2016; (6): 39473.
- Ajmani S., Singh H., Chaturvedi S., Mishra R., Rai M., Jain A. et al. Utility of neutrophil CD64 and serum TREM-1 in distinguishing bacterial infection from disease flare in SLE and ANCA-associated vasculitis. *Clin. Rheumatol.* 2019; 38(4): 997-1005.
- Klesney-Tait J., Keck K., Li X., Gilfillan S., Otero K., Baruah S. et al. Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1. *J. Clin. Invest.* 2013; 123(1): 138-49.
- Wu M., Peng A., Sun M., Deng Q., Hazlett L., Yuan J. et al. TREM-1 amplifies corneal inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection by modulating Toll-like receptor signaling and Th1/Th2-type immune responses. *Infect. Immun.* 2011; 79(7): 2709-16.
- Baruah S., Murthy S., Keck K., Galvan I., Prichard A., Allen L. et al. TREM-1 regulates neutrophil chemotaxis by promoting NOX-dependent superoxide production. *J. Leukoc. Biol.* 2019; (1): 124-31.
- Sun M., Zhu M., Chen K., Nie X., Deng Q., Hazlett L. et al. TREM-2 promotes host resistance against *Pseudomonas aeruginosa* infection by suppressing corneal inflammation via a PI3K/Akt signaling pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013; 54(5): 3451-62.
- Thomas K., King R., Sester C., Justement L. TREM-like transcript 2 is stored in human neutrophil primary granules and is up-regulated in response to inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.* 2016; 100(1): 177-84.
- Elistratova I.V., Tarasova M.V., Morozov S.G. Superoxide anion releasing by neutrophils from young adult atopitis patients. *Patogenez*. 2015; 13(4): 41-6. (In Russian)
- Tarasova M.V., Ovsyannikov M.V., Volkova E.N. Activities of leukocyte elastase and alpha-1 proteinase inhibitor in patients with atopitis. *Patogenez*. 2018; 16(4): 153-6. (In Russian)
- Tarasova M.V., Morozov S.G. *TREM-1 Receptor neutrophil expression at the atopitis. In "Receptors and intracellular signaling"*. (Eds. Zinchenko V.P. and Berezhnoy A.V.). Serpuhov. 2019. Vol.1. P. 177-181. (In Russian)
- Kandalova O.V., Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Grechko A.V., Morozov S.G. Skin microbiome in adult atopitis. *Pathologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2018; 62(4): 209-14. (In Russian)

References

- Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Grechko A.V., Morozov S.G. Heat shock protein HSP40 family chaperone DNAJB6/MRJ expression analysis in blood cells obtained from patients with atopitis in different phases. *Pathologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2016; 60(3): 23-30. (In Russian)
- Favier B. Regulation of neutrophil functions through inhibitory receptors: an emerging paradigm in health and disease. *Immunol. Rev.* 2016; 273(1): 140-55.
- Futosi K., Fodor S., Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* 2013; 17(3): 638-50.
- Baruah S., Keck K., Vrenios M., Pope M., Pearl M., Doerschug K. et al. Identification of a novel splice variant isoform of TREM-1 in human neutrophil granules. *J. Immunol.* 2015; 195(12): 5725-31.

Сведения об авторах:

Тарасова М.В., науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Елистратова И.В., канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Морозов С.Г., доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, директор ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 591.473.3:612.741:615.357:616.74-007.23

Труш В.В.¹, Соболев В.И.²

Оценка эффективности β_2 -адреноагониста формотерола в компенсации электрофизиологических проявлений стероидной миопатии в модельных экспериментах на животных

¹Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Донецкий национальный университет», 83050, г. Донецк, ул. Щорса, д. 46;

²Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, 298650, г. Ялта, Россия, ул. Стахановская, д. 11

Цель исследования – изучение с помощью стимуляционной электромиографии в экспериментах на крысах эффективности β_2 -адреноагониста формотерола в компенсации электрофизиологических нарушений передней большеберцовой мышцы (*m. tibialis anterior*), вызванных длительным введением дексаметазона. **Методика.** Исследования выполнены на 40 половозрелых крысах-самках в возрасте 4-5 мес массой 180-200 г. Животные были разделены на 4 группы: контрольную (К – группа, без каких-либо воздействий, n=10) и 3 экспериментальных по 10 животных в каждой. Крысы 1-й группы на протяжении 30 сут получали дексаметазон, 2-й группы – дексаметазон в комплексе с формотеролом, 3-я – получала только формотерол. Дексаметазон вводили внутривенно (0,25 мг/кг) 1 раз в 2 сут. Формотерол (1,5 мкг/кг) вводили ежедневно под кожу. Через 30 сут на наркотизированных животных (тиопентал натрия 100мг/кг внутривенно) проводили острый опыт. Изучали электрофизиологические параметры передней большеберцовой мышцы с помощью экспериментальной двухканальной установки, оба канала были связаны с регистрирующим устройством – запоминающим цифровым осциллографом Tektronix (TDS2004C).

Результаты. Установлено, что формотерол в комплексе с дексаметазоном, предотвращал уменьшение количества активируемых двигательных единиц мышцы и удлинение латентного периода М-ответов. А также обуславливал существенное повышение амплитуды М-ответов (на 115% в сравнении с контролем). Вместе с тем, формотерол в комплексе с дексаметазоном не предотвращал появление полифазных М-ответов, но компенсировал снижение их амплитуды. Введение дексаметазона с формотеролом уменьшало частоту случаев сниженной надежности синаптической передачи (до 30% против 70% в группе крыс, получавших дексаметазон изолированно). Вместе с тем, в случае комплексного введения дексаметазона с формотеролом наблюдалось удлинение латентного периода М-ответов после выполнения утомляющей работы. **Заключение.** Полученные данные указывают на высокую эффективность β_2 -адреноагониста формотерола в предотвращении электрофизиологических нарушений в мышце, вызванных длительным введением дексаметазона. Вместе с тем формотерол в комплексе с дексаметазоном, хотя и снижал частоту случаев низкой надежности синаптической передачи в группе (до 30% против 70% в группе, получавших дексаметазон изолированно), в полной мере не предотвращал данного эффекта стероидной миопатии.

Ключевые слова: скелетная мышца; дексаметазон; ятрогенный гиперкортицизм; стероидная миопатия; адреноагонисты; формотерол.

Для цитирования: Труш В.В., Соболев В.И. Оценка эффективности β_2 -адреноагониста формотерола в компенсации электрофизиологических проявлений стероидной миопатии в модельных экспериментах на животных. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 35-47.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.35-47

Для корреспонденции: Труш Вера Владимировна, доцент, канд. мед. наук, зав. каф. физиологии человека и животных ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», e-mail: ver.trush@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.09.2018

Trush V.V.¹, Sobolev V.I.²**EFFICACY OF THE β_2 -ADRENERGIC AGONIST FORMOTEROL IN COMPENSATION OF ELECTROPHYSIOLOGICAL MANIFESTATIONS OF STEROID MYOPATHY IN ANIMAL EXPERIMENTS**¹Donetsk National University,
Shchors Str. 46, Donetsk 83050;²V.I. Vernadsky Crimean Federal University,
Stakhanovskaya Str. 11, Yalta, Republic of Crimea, Russia

Aim. To study efficacy of β_2 -adrenergic agonist formoterol (F) in compensation of electrophysiological disorders in mixed-type skeletal muscles (*m. tibialis anterior*) induced by long-term dexamethasone (D) treatment. **Methods.** Experiments were performed on sexually mature female rats (180-210 g) divided into four groups: 1) control, group C (intact rats, n=10); 2) first experimental group, 30D (30-day dexamethasone treatment, n=10); 3) second experimental group, 30D+F (30-day dexamethasone plus formoterol treatment, n=10); and third experimental group, 30F (30-day formoterol treatment, n=10). Dexamethasone (KRKA, Slovenia) was administered every two days, i.p., at a dose of 0.25 mg/kg, which was equivalent to the clinical therapeutic dose. Formoterol (Foradil, Novartis, Switzerland) was administered daily at a dose of 1.5 μ /kg, s.c. On day 30, rats were anesthetized with sodium thiopental (100 mg/kg), and stimulation electromyography was performed in an acute experiment. The anterior tibial muscle was stimulated with suprathreshold electrical current via the fibular nerve, and electrophysiological parameters of the muscle were recorded.

Results. Formoterol in combination with dexamethasone prevented the decrease in the number of activated muscle motor units and the prolongation of M-response latency, which were typical for the 30D group. Also, formoterol not only corrected the decreased M-response amplitude but even significantly increased it in the 30D+F group by 115% compared to the control ($p < 0.05$). At the same time, formoterol in combination with dexamethasone did not prevent the emergence of polyphasic M-responses (as observed in 50% of animals in the 30D+F group and 40% of animals in the 30D group) but compensated for the decrease in their amplitude. Administration of F+D reduced the incidence of less reliable synaptic transmission (up to 30% in the 30D+F group vs. 70% in the 30D group) but did not completely prevent it. Formoterol administered together with dexamethasone did not prevent marked facilitation of synaptic transmission in 50% of rats at the optimal neuromuscular stimulation rate (30 imp/s). However, this combination increased the amplitude of the first M-response in a series, which indicated the absence of blocked synapses in the 30D+F group. Formoterol in combination with dexamethasone prevented the typical for D-group disorder of M-response, which was more pronounced than in control, and the decrease in the number of activated muscle motor units after performing a fatigable work. At the same time, the D+F treatment increased the M-response latency after performing the fatigable work, which was typical for the 30D group but was not characteristic of the control. This fact confirmed a lower reliability of synaptic transmission both in 30D and 30D+F groups. **Conclusion.** The study demonstrated a high efficacy of the β_2 -adrenergic agonist formoterol for preventing electrophysiological disorders in the muscle induced by long-term administration of dexamethasone, which indicated myopathic alterations. At the same time, formoterol in combination with dexamethasone, although reduced the incidence of low-reliability synaptic transmission (up to 30% vs. 70% in the group receiving dexamethasone alone), did not completely prevent this manifestation of steroid myopathy.

Keywords: skeletal muscle; dexamethasone; iatrogenic hypercorticism; steroid myopathy; adrenergic agonists, formoterol.

For citation: Trush V.V., Sobolev V.I. Efficacy of the β_2 -adrenergic agonist formoterol in compensation of electrophysiological manifestations of steroid myopathy in animal experiments. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2019; 63 (3):35-47. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.35-47

For correspondence: Vera V. Trush, Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Physiology of Human and Animals of State Educational Institution of Higher Education «Donetsk national university», 46 Shchorsa St., Donetsk 83050, e-mail: ver.trush@yandex.ru

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Information about authors:

Trush V.V., <http://orcid.org/0000-0001-8514-8431>

Sobolev V.I., <http://orcid.org/0000-0001-9318-5224>

Received 11.09.2018

Введение

Естественные глюкокортикоиды и особенно более активные их синтетические аналоги нашли широкое применение в клинической практике при лечении аутоиммунных, аллергических и гематологических заболеваний. Вместе с тем, наряду с полезными терапевтическими эффектами эти препараты стимулируют катаболические процессы в мышечной, иммунной, костной и других системах организма, что негативно отражается на их функциональном состоянии [1]. Изменения в скелетных мышцах при гиперкортицизме носят миопатический характер и проявляются мышечной дистрофией, слабостью и повышенной утомляемостью [2]. Несмотря на достаточно хорошую изученность проявлений стероидной миопатии, в том числе ятрогенного характера, остается открытым вопрос, каковы способы ее компенсации.

В предыдущих исследованиях [3] нами установлена эффективность продолжительного введения фармакологических доз адреналина в частичной компенсации электрофизиологических и сократительных нарушений скелетной мышцы, вызванных длительным применением гидрокортизона. Рядом авторов [4] показана эффективность селективного β_2 -адреноагониста кленбутерола в предотвращении развития атрофии жевательной мышцы крыс, вызванной введением дексаметазона. Вместе с тем, оценки функциональных параметров скелетной мышцы в данной работе не проводилось. В то же время исследованиями последних десятилетий установлено, что в основе патологических изменений нервно-мышечного аппарата под влиянием фармакологических доз глюкокортикоидов могут лежать не только дистрофические изменения мышечных волокон особенно гликолитического типа [5, 6], но и функциональные расстройства, в том числе обусловленные нарушением работы синаптического звена [7]. В связи с этим для комплексной оценки эффективности адреноагонистов в компенсации проявлений стероидной миопатии необходимо исследование не только мышечной массы, но и ряда функциональных и в том числе электрофизиологических параметров, изменение которых может развиваться еще до существенного нарушения сократительной функции скелетной мышцы.

В качестве рабочей гипотезы в настоящей работе было предположено, что использование одного из селективных β_2 -адреноагонистов (формотерола) может блокировать или ослаблять проявление признаков стероидной миопатии, выявляемых электрофизиологическими методами скелетной мышцы. Выбор формотерола для возможной компенсации стероидной миопатии был обусловлен следующим: во-первых, преобладаю-

щим типом адренорецепторов в скелетных мышечных волокнах являются β_2 -адренорецепторы [8]. Кроме того, установлено наличие β_2 -адренорецепторов на пресинаптических нервных окончаниях мотонейронов и показано, что их прямая стимуляция симпатомиметиками вызывает существенное облегчение синаптической передачи в двигательных единицах скелетной мышцы [9]. В предыдущих наших исследованиях [10], а также работах других авторов [11] получены факты, свидетельствующие в пользу нарушений синаптической передачи под влиянием фармакологических доз глюкокортикоидов. В связи с этим можно предполагать, что применение селективного β_2 -адреноагониста формотерола, характеризующегося пролонгированным действием, должно хотя бы в какой-то мере компенсировать электрофизиологические нарушения в скелетной мышце, индуцированные глюкокортикоидами, не оказывая побочного сосудосуживающего и кардиостимулирующего действия, типичного для неселективного адреноагониста адреналина. Во-вторых, исследованиями последних лет доказано анаболическое влияние β_2 -адреноагонистов и их способность к стимуляции роста скелетных мышц [12-14]. Отмечено их защитное действие при развитии атрофии различного генеза [15-17] и способность к индукции митохондриального биоге-неза [18]. Последнее может оказаться полезным в предотвращении дистрофических изменений скелетной мускулатуры, в том числе вызванных глюкокортикоидной терапией. В-третьих, в клинической практике достаточно широко при лечении ряда бронхо-легочных заболеваний используют комплексное введение формотерола и глюкокортикоидов для достижения максимального терапевтического эффекта [19]. В связи с этим представляло немалый практический интерес выяснение вопроса о характере действия комбинации из указанных препаратов на функциональное состояние скелетной мышцы смешанного типа с преобладанием быстрых мышечных волокон, более чувствительных, в сравнении с медленными, к катаболическому действию глюкокортикоидов [5]. Наконец, в-четвертых, согласно данным клинических исследований [20], формотерол в фармакологических дозах (до 108 мкг/сутки) безопасен и хорошо переносится даже детьми, поэтому его применение с целью компенсации стероидной миопатии может быть относительно безвредным для пациентов, не имеющих абсолютных противопоказаний к приему β_2 -адреноагонистов.

Цель – изучение в эксперименте эффективности фармакологических доз селективного β_2 -адреноагониста формотерола в компенсации электрофизиологических нарушений скелетной мышцы смешанного типа, вызванных длительным введением дексаметазона.

Методика

Все эксперименты выполнены в соответствии с директивой Европейского совета (The European Council Directive 86/609/ЕЕС) по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными и «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [21]. Работа одобрена этическим комитетом университетом. Исследования проводились на 40 половозрелых крысах-самках 4-5-ти месячного возраста с исходной массой тела 180-210 г. Животные были случайным образом разделены на 4 группы: контрольную (интактная, не подвергались никаким воздействиям, $n=10$, К-группа), I опытную ($n=10$, на протяжении 30 сут получали дексаметазон (Д), 30Д-группа), II опытную ($n=10$, на протяжении 30 сут получали дексаметазон в комплексе с формотеролом (Ф), 30Д+Ф-группа) и III опытную ($n=10$, на протяжении 30 сут получали формотерол, 30Ф-группа). Дексаметазон («KRKA», Словения) вводили внутривенно 1 раз в 2 сут в дозе, адекватной терапевтической дозе, применяемой у человека, — 0,25 мг/кг. Формотерол (торговая марка «Форадил», «Novartis», Швейцария) вводили ежедневно (1,5 мкг/кг) подкожно.

Выбор в качестве объекта исследований особей женского пола связан с большей их чувствительностью, в сравнении с особями мужского пола, к катаболическому действию глюкокортикоидов [22]. Выбор передней большеберцовой мышцы (*m. tibialis anterior*) был предопределен тем, что она относится к смешанному типу с существенным преобладанием быстрых мышечных волокон, характеризующихся, в сравнении с медленными, более высокой чувствительностью к катаболическому действию глюкокортикоидов [5]. Выбор дексаметазона для инициации стероидной миопатии был обусловлен тем, что данный препарат широко используется в клинической практике в связи с гораздо более выраженным (в 30 раз) и длительным (в 4—7 раз) противовоспалительным эффектом в сравнении с естественными глюкокортикоидами [23].

По окончании месячного периода введения препаратов на наркотизированных животных (тиопентал натрия, 100 мг/кг, внутривенно) проводили острый опыт, в ходе которого изучали электрофизиологические параметры передней большеберцовой мышцы с помощью экспериментальной установки, включающей 2 канала: канал электростимулятора (использовался для электрического раздражения малоберцового нерва) и электромиографический канал (предназначался для регистрации М-ответов мышцы). Канал электростимулятора представлен собственно

электростимулятором (построен на основе функционального генератора ICL8038CCDP), оптронной гальванической развязкой и биполярными игольчатыми стальными электродами с межэлектродным расстоянием 1 мм. Электромиографический канал представлен отводящими биполярными игольчатыми стальными электродами (с межэлектродным расстоянием 1 мм) и электромиографическим биоусилителем (построен на основе измерительного усилителя INA118). Оба канала были связаны с регистрирующим устройством — записывающим цифровым осциллографом Tektronix (TDS2004C).

Ход опыта. У наркотизированного животного в области бедра препаровали малоберцовый нерв и на расстоянии 1 см проксимальнее коленного сустава подвешивали под него раздражающие электроды, в среднюю часть передней большеберцовой мышцы вводили отводящие игольчатые электроды.

Вначале регистрировали одиночный М-ответ мышцы, индуцированный путем раздражения малоберцового нерва одиночными сверхпороговыми электрическими импульсами (длительность — 150 мкс каждый, частота — 0,2 имп/с, сила тока — 500 мкА). На основании записей одиночных М-ответов мышцы определяли их латентный период, амплитуду и длительность, а также оценивали форму (двух-, трехфазные, поли- и псевдополифазные).

Затем путем плавного (в течение 4 с) увеличения силы электрического раздражения от подпороговой до сверхпороговой (от 0,01 до 2 В) при частоте 10 имп/с записывали серию из сорока М-ответов мышцы. На основании процентного изменения амплитуды максимального М-ответа относительно амплитуды минимального определяли приблизительное количество активизируемых двигательных единиц мышцы (методика V. Galea [24]).

После этого, раздражая малоберцовый нерв с частотой 4 имп/с сверхпороговыми электрическими импульсами (длительность — 150 мкс каждый, сила тока — 500 мкА), регистрировали в течение 5 с серию М-ответов мышцы. Для оценки надежности синаптической передачи на основании полученных записей отмечали изменение амплитуды 5-го или 10-го М-ответа относительно 1-го, принятого за 100%, [25].

Затем в течение 5 с регистрировали серию М-ответов мышцы при оптимальной частоте раздражения малоберцового нерва — 30 имп/с. При этом длительность и сила электрических импульсов оставались прежними — 150 мкс и 500 мкА. На основании записи серии М-ответов мышцы определяли изменение их амплитуды относительно 1-го, амплитуда которого принималась за 100%.

На следующем этапе мышца выполняла утомляющую работу, которую моделировали путем вызванного тетанического ее сокращения с внешней нагрузкой в 70 г до тех пор, пока мышца почти полностью не расслаблялась (до уровня 10% от исходной величины) на фоне продолжающейся электрической стимуляции. Тетаническое сокращение мышцы индуцировали путем раздражения электрическим током малоберцового нерва с частотой 70 имп/с (длительность импульсов 0,5 мс и сила тока 1000 мкА). После выполнения мышцей утомляющей работы вновь регистрировали серию М-ответов при раздражении малоберцового нерва с частотой 0,2 имп/с, 4 имп/с, 30 имп/с, а также стимулами нарастающей амплитуды (от 0,01 до 2 В). На основании изменения параметров М-ответов мышцы судили об утомляемости нервно-мышечного аппарата у животных разных групп.

По окончании острого опыта проводили эвтаназию животных путем введения летальной дозы (300 мг/кг) тиопентала натрия.

Статистическая обработка. Полученные экспериментальные данные обрабатывали с использованием *t*-критерия Стьюдента, предварительно убедившись в том, что распределение значений в исследуемых вариационных рядах близко к нормальному (*W*-тест Шапиро-Уилка, Statistica, 7.0), и *F*-статистики на основании проверки нулевой и альтернативной гипотез. Значения $p < 0,05$ рассматривали как статистически значимые.

Результаты и обсуждение

Влияние дексаметазона, вводимого изолированно и в комплексе с формотеролом, на параметры М-ответа. Длительное изолированное введение дексаметазона негативно отражалось на параметрах М-ответа скелетной мышцы (СМ). В частности, у животных 30Д-группы наблюдалось в сравнении с контролем (К-группа) удлинение латентного периода М-ответа (на 19%, $p < 0,05$) и уменьшение его амплитуды (на 31%, $p < 0,05$) на фоне неизменной длительности (табл. 1, образцы записей М-ответов СМ животных всех групп представлены на рис. 1). Эти изменения указывают на возможное замедление нервно-мышечной передачи, снижение возбудимости мышечных волокон (МВ) и десинхронизацию их возбуждения вследствие повышения гетерогенности, а также частичное выключение патологически измененных МВ из возбуждения. Кроме того, снижение амплитуды М-ответов на фоне неизменной длительности может быть следствием снижения мембранного потенциала МВ и дистрофических их изменений, сопровождающихся уменьшением их

диаметра. У 40% особей 30Д-группы регистрировались полифазные и псевдополифазные потенциалы уменьшенной амплитуды (табл. 1, рис. 1), что является еще одним свидетельством в пользу миопатических изменений в исследуемой мышце животных 30Д-группы [25]. Кроме того, в пользу миопатических изменений в СМ крыс 30Д-группы указывает хоть и не очень выраженное (на 9%), но статистически значимое в сравнении с К ($p < 0,05$), уменьшение ее массы и существенное уменьшение среднего исходного количества активированных двигательных единиц (ДЕ) (на 43%, $p < 0,05$ относительно контроля, табл. 2), которое может быть одной из причин снижения амплитуды М-ответов.

Учитывая результаты исследований других авторов, наблюдавших очаговые дистрофические изменения в СМ, особенно гликолитического типа, при длительном введении глюкокортикоидов (ГК) [5, 6], снижение возбудимости МВ [26], ослабление синаптической передачи за счет частичного блокирования ионных каналов холинорецепторов в постсинаптической мембране [27] или снижения их чувствительности к ацетилхолину [28], причинами удлинения латентного периода и уменьшения амплитуды М-ответа у крыс 30Д-группы могут служить определенные пато-

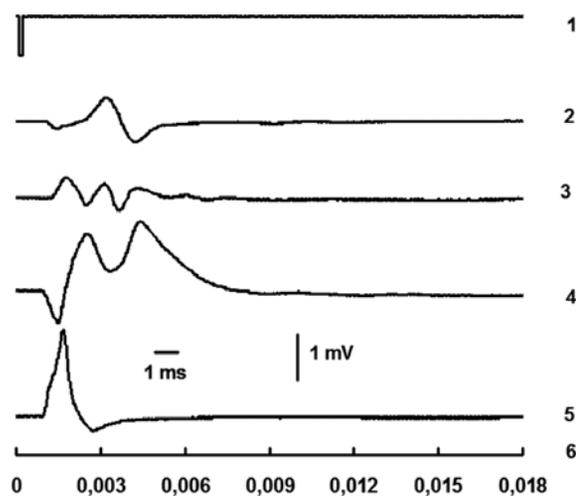


Рис. 1. Эффект дексаметазона, формотерола и их комбинации на параметры М-ответа передней большеберцовой мышцы белых крыс.

1 – отметка момента нанесения электрического стимула на малоберцовый нерв; 2 – М-ответ мышцы контрольного животного; 3 – М-ответ мышцы животного, получавшего дексаметазон; 4 – М-ответ мышцы животного, получавшего комбинацию дексаметазона с формотеролом; 5 – М-ответ мышцы животного, получавшего формотерол; 6 – шкала времени опыта, секунды.

логические изменения как на синаптическом уровне, так и в самих МВ.

Наряду с изменением исходных значений параметров М-ответа у крыс 30Д-группы наблюдалось более выраженное в сравнении с контролем их ухудшение после выполнения утомляющей работы (УР). Так, у животных 30Д-группы имело место не типичное для контрольных крыс статистически значимое удлинение латентного периода М-ответа (на 19% относительно исходного значения) и существенное в сравнении с контролем увеличение его длительности (на 93% отно-

сительно исходного значения) после выполнения УР (табл. 1). Кроме того, количество активируемых ДЕ мышцы крыс 30Д-группы после УР снижалось в существенно большей степени (на 34% относительно исходного уровня), чем в контроле (на 26%, табл. 2). Все эти признаки свидетельствуют в пользу более высокой утомляемости СМ крыс, подвергавшихся длительному введению синтетического ГК. Длительное изолированное применение формотерола в целом позитивно сказывалось на параметрах М-ответа СМ. Так, у животных 30Ф-группы наблюдалось не резко выраженное,

Таблица 1

Средние значения (M±m) некоторых параметров М-ответа передней большеберцовой мышцы крыс контрольной группы (К) и животных, получавших на протяжении 30 сут дексаметазон (30Д) и формотерол (30Ф) изолированно и комплексно (30Д+Ф)

Группа животных	Параметры М-ответа							
	Латентный период, мс		Амплитуда, мВ		Длительность, мс		% полифазных потенциалов	
	исходный	после УР	исходная	после УР	исходная	после УР	исходный	после УР
Контроль	1,20±0,05	1,30±0,06	2,60±0,22	1,70±0,25 (-36±8,4•)	5,50±0,51	7,60±0,62 (+39±3,9•)	0	0
30Д	1,50±0,06 [+19*]	1,90±0,12 (+34±6,8•) [+45*]	1,80±0,20 [-31*]	1,00±0,18 (-47±5,3•) [-43*]	5,70±0,65	11,0±0,12 (+93±1,21•) [+45*]	40	50
30Ф	1,00±0,03	1,10±0,04 [-17*]	5,10±0,38 [+95*]	4,10±0,50 [+144*]	6,50±0,53	7,60±0,54	0	0
30Д+Ф	1,20±0,07	1,40±0,07 (+22±4,7•) -27 ^x	5,60±0,86 [+115*], +213 ^x	5,20±0,98 [+214*], +451 ^x	6,80±0,79	8,40±0,92	50	50

Примечание. • – в круглых скобках указана статистически значимая разница показателя относительно исходного значения соответствующей группы (в %, $p < 0,05$); * – в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно соответствующего значения контрольной группы (в %, $p < 0,05$); ^x – значимые отличия показателя животных группы 30Д+Ф относительно соответствующего значения группы 30Д (в %, $p < 0,05$).

Таблица 2

Средние значения (M±m) массы передней большеберцовой мышцы и количества активируемых двигательных единиц у контрольных животных и крыс, получавших на протяжении 30 сут дексаметазон (30Д) и формотерол (30Ф) изолированно и комплексно (30Д+Ф)

Группа животных	Масса мышцы, мг	Количество активируемых двигательных единиц	
		исходное (до утомляющей работы)	после утомляющей работы
Контроль	399,8±6,81	14,1±1,21	10,4±0,91 (-26±2,0•)
30Д	363,9±8,50 [-9*]	8,1±0,95 [-43*]	5,3±0,61 (-34±2,4•) [-49*]
30Ф	454,3±7,79 [+13*]	18,8±2,36	18,5±2,65 [+78*]
30Д+Ф	393,8±8,48 +8 ^x	15,2±1,67 +87 ^x	12,0±0,82 +124 ^x

Примечание. * – в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно контрольной группы (в %, $p < 0,05$); ^x – указана статистически значимая разница показателя животных группы 30Д+Ф относительно соответствующего значения группы 30Д (в %, $p < 0,05$); • – в круглых скобках указана статистически значимая разница показателя относительно исходного значения соответствующей группы (в %, $p < 0,05$). Количество активируемых двигательных единиц определяли по методике V. Galea [24].

но значимое относительно контроля, укорочение латентного периода М-ответа (на 18%) и существенное увеличение его амплитуды (на 82%) на фоне неизменной длительности (табл. 1).

Отмеченные изменения могут быть связаны с облегчением и ускорением синаптической передачи, повышением возбудимости МВ и, возможно, некоторой их гипертрофией, а также увеличением степени синхронизации возбуждения в СМ [25, 29]. В литературе имеются сведения относительно способности адреналина активировать Na^+/K^+ -насос в мембране МВ [30], что обуславливает некоторое повышение трансмембранного градиента для калия, гиперполяризацию мембран МВ и, как следствие, генерацию ими более высокоамплитудных потенциалов действия, что должно позитивно отражаться на общей амплитуде М-ответов СМ [29]. Кроме того, некоторыми исследователями получены факты в пользу способности катехоламинов (КА) увеличивать амплитуду токов концевой пластинки и степень их синхронизации [31], на пресинаптическом уровне повышать эффективность Ca^{2+} -активируемого экзоцитоза медиатора [32], в том числе, путем цАМФ-зависимой активации электровозбудимых Ca^{2+} -каналов [33], увеличивать синхронность секреции ацетилхолина [34], снижать АТФ-опосредованную степень депрессии синаптической передачи [35]. Все это предопределяет облегчение синаптической передачи, рост амплитуды потенциалов концевой пластинки и, как следствие, улучшение параметров М-ответа СМ.

Наконец, еще одной возможной причиной увеличения амплитуды М-ответа СМ животных 30Ф-группы могла служить некоторая гипертрофия МВ, в пользу которой косвенно указывает значимое относительно контроля увеличение массы СМ (на 13%) и тенденция к увеличению количества активируемых ДЕ СМ (табл. 2). Способность β_2 -адреноагониста (β_2 -АА), и, в частности, кленбутерола, вызвать гипертрофию СМ [12], причем оказывать более выраженный анаболический эффект на МВ гликолитического типа была установлена в исследованиях других авторов [8].

Наряду с позитивным влиянием на исходные параметры М-ответа, длительное введение Ф снижало степень их ухудшения после выполнения УР в сравнении с контролем. Так, у крыс 30Ф-группы амплитуда и длительность М-ответов после выполнения УР значимо не изменялись относительно исходного уровня, тогда как у контрольных крыс они претерпевали изменения — амплитуда статистически значимо снижалась (на 36%), а длительность увеличивалась (на 39%, табл. 1). Аналогично параметрам М-ответа количество активируемых ДЕ мышцы крыс 30Ф-группы значимо не

изменялось после УР относительно исходного уровня, тогда как у К-группы оно существенно снижалось (на 26%, табл. 2). Все это указывает в пользу более высокой устойчивости СМ животных, подвергавшихся длительной адренергической стимуляции, к утомлению, что отчасти может быть обусловлено способностью КА улучшать энергообмен как в организме в целом, так и в МВ в частности [36, 37], в том числе путем увеличения мощности митохондриального окисления [18]. Кроме того, в исследовании [38] обнаружена способность адреномиметиков оказывать синхронизирующий эффект на секрецию медиатора и, как следствие, приводить к повышению амплитуды постсинаптического ответа, сниженной в результате длительного низкочастотного непрямого раздражения двигательного нерва, что служит одним из доказательств способности КА повышать устойчивость нервно-мышечного аппарата к утомлению.

Формотерол, вводимый в комплексе с дексаметазоном, несколько сглаживал негативные влияния синтетического ГК как на исходные параметры М-ответа СМ, так и на выраженность их изменений после выполнения УР. Так, в случае комплексного применения Д с Ф не наблюдалось типичного для 30Д-группы удлинения латентного периода исходных М-ответов, а их амплитуда не только не уменьшалась относительно К-группы, а даже увеличивалась (на 115%), что было отмечено и в случае длительного изолированного применения Ф (табл. 1). Вместе с тем, у 50% крыс 30Д+Ф-группы регистрировались полифазные и псевдополифазные М-ответы, но в отличие от таковых крыс 30Д-группы они были не сниженной, а увеличенной амплитуды. Данное обстоятельство указывает в пользу того, что эти полифазные М-ответы у животных 30Д+Ф-группы не являются признаком миопатических изменений в СМ, а их появление возможно связано с некоторой десинхронизацией возбуждения различных групп ДЕ СМ. Кроме того, масса СМ и количество активируемых ее ДЕ у крыс 30Д+Ф-группы значимо не отличались от К-группы, тогда как у животных 30Д-группы эти параметры были снижены (табл. 2). Эти факты, наряду с повышенной амплитудой М-ответа, косвенно свидетельствуют в пользу отсутствия выраженных дистрофических изменений СМ животных 30Д+Ф-группы, реализующейся, очевидно, благодаря установленной в исследованиях других авторов способности β_2 -АА стимулировать анаболические процессы в МВ [12, 13] и защищать их от дистрофических изменений различного генеза [15–17].

Наряду с улучшением параметров исходных М-ответов СМ под влиянием комплексного применения Д с Ф, β_2 -АА частично предотвратил типичное для

Д-группы более выраженное в сравнении с контролем ухудшение этих параметров после утомляющей работы. Так, в случае комплексного применения Д с Ф амплитуда и длительность М-ответов, а также количество активируемых ДЕ СМ после выполнения УР значительно не изменялись относительно исходного уровня, что было характерно и для 30Ф-группы (табл. 1, 2).

Вместе с тем, у крыс 30Д+Ф-группы сохранялось статистически значимое удлинение латентного периода М-ответов после выполнения УР относительно исходного уровня (на 22%), не типичное для К-группы и имевшее место при изолированном введении Д (табл. 1). Наблюдаемое нами удлинение латентного периода М-ответа после выполнения УР у животных 30Д- и 30Д+Ф-групп, не типичное для контрольных крыс, мышца которых выполняла такую же работу, косвенно указывает в пользу сниженной надежности синаптической передачи.

Влияние дексаметазона, вводимого изолированно и в комплексе с формотеролом, на надежность синаптической передачи. В связи с выявлением косвенных признаков сниженной надежности синаптической передачи у животных 30Д- и 30Д+Ф-групп на следующем этапе нашей работы мы сочли необходимым оценить эту надежность с помощью методики Б.М. Гехта [25], предполагающей определение декремента амплитуды

5-го М-ответа относительно 1-го при низкой частоте стимуляции нервно-мышечного аппарата (4 имп/с). Именно при такой частоте и соответственно интервалами между электрическими стимулами в 300 мс, согласно Б.М. Гехту, дефицит медиатора в пресинаптическом полюсе, нарушение его ресинтеза или кальций-зависимого экзоцитоза проявляются в снижении амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го более чем на 10%.

Анализ полученных данных показал, что у животных 30Д-группы патологически значимый декремент амплитуды М-ответов наблюдался у большинства особей группы: 70% до выполнения УР и 80% после ее выполнения (табл. 3). Средний по группе декремент амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го у крыс 30Д-группы превышал 10% и статистически значимо превосходил значение контроля (табл. 3). Образцы записей серии М-ответов СМ животных разных групп при частоте стимуляции нервно-мышечного аппарата 4 имп/с приведены на рис. 2.

Уменьшение надежности нервно-мышечной передачи при длительном введении ГК наблюдалось и в более ранних исследованиях, проведенных в нашей лаборатории [39]. В основе отмеченного явления могут лежать различные механизмы: уменьшение под влиянием фармакологических доз ГК амплитуды потенциалов концевой пластинки [11], блокада каналов холинорецепторов [27] и другие.

Мнения других специалистов относительно надежности нервно-мышечной передачи при гиперкортицизме противоречивы. Так, некоторые авторы [40] отмечают ее повышение под действием ГК, обусловленное усилением ресинтеза ацетилхолина в пресинаптических окончаниях мотонейронов вследствие усиления обратного захвата медиатора. Другие исследователи [11, 27], напротив, указывают на снижение надежности функционирования синапсов под действием высоких доз ГК, одним из проявлений которого служит наблюдаемое ими уменьшение амплитуды потенциалов концевой пластинки. По всей видимости, конечный эффект ГК на состояние синаптической передачи зависит не только от их дозы, но и длительности введения в организм.

Введение Ф в комплексе с Д несколько уменьшило частоту случаев патологически значимого декремента амплитуды М-ответов при низкой частоте стимуляции малоберцового нерва (до 30%, табл. 3). Кроме того, средний по 30Д+Ф-группе декремент амплитуды М-ответов не достигал патологически значимого уровня – 10% – и не отличался от значения контроля (табл. 3).

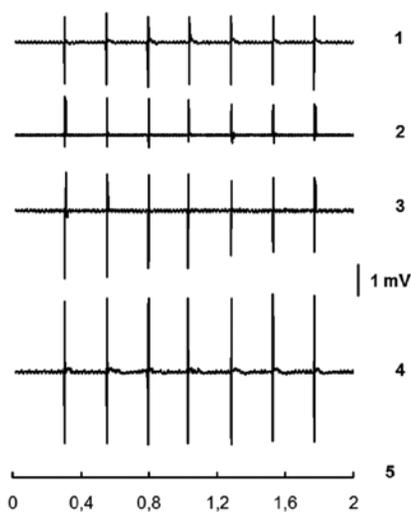


Рис. 2. Образцы записей серии М-ответов передней большеберцовой мышцы животных разных групп при частоте раздражения малоберцового нерва 4 имп/с.

1 – серия М-ответов мышцы контрольного животного; 2 – серия М-ответов мышцы животного, получавшего дексаметазон; 3 – серия М-ответов мышцы животного, получавшего комбинацию дексаметазона с формотеролом; 4 – серия М-ответов мышцы животного, получавшего формотерол; 5 – шкала времени опыта, с.

Таким образом, применение Φ в комплексе с Δ обусловило уменьшение частоты случаев патологически значимого декремента амплитуды М-ответов в сравнении с изолированным применением Δ , но не предотвращало полностью их появление. Очевидно, β_2 -АА (формотерол), улучшая состояние синаптической передачи путем увеличения синхронизации выброса медиатора [31] или возбудимости и степени синхронизации возбуждения в МВ [29], а также возможно интенсивности синтеза медиатора в пресинаптических структурах [41], несколько ослаблял снижение надежности нервно-мышечной передачи, вызванное длительным введением дексаметазона.

Влияние дексаметазона, вводимого изолированно и в комплексе с формотеролом, на степень облегчения и депрессии синаптической передачи при оптимальной частоте стимуляции нервно-мышечного аппарата (30 имп/с). С целью более детального исследования состояния синаптической передачи на следующем этапе был проведен анализ характера изменения амплитуды М-ответов в динамике стимуляции нервно-мышечного аппарата с оптимальной частотой – 30 имп/с. Согласно мнению ряда авторов [25, 29], выраженное увеличение амплитуды М-ответов (более чем на 30% относительно 1-го) на фоне сниженной амплитуды 1-го М-ответа указывает в пользу заблокированности синапсов, обусловленной пресинаптическими нарушениями – дефицитом медиатора в пресинаптическом полюсе или нарушением его кальцийзависимого экзоцитоза. Выявленное снижение амплитуды М-ответов (более чем на 25% относительно амплитуды 1-го) при оптимальной частоте стимуляции нервно-мышечного аппарата указывает в пользу возможных постсинаптических нарушений – блокады ионных каналов холинорецепторов или понижения их плотности или чувствительности к ацетилхолину.

Анализ изменения амплитуды М-ответов в динамике стимуляции нервно-мышечного аппарата с оптимальной частотой у крыс 30Д-группы показал, что амплитуда 1-го М-ответа в серии была значимо ниже (на 31%) уровня контроля, у 50% особей наблюдалось значимое облегчение синаптической передачи, и средняя по группе степень этого облегчения существенно превосходила 30% и соответствующее значение уровня контрольной группы (табл. 4). Патологически значимая депрессия синаптической передачи в 30Д-группе встречалась реже облегчения – у 30% особей, и средняя по группе степень этой депрессии, хоть и превосходила статистически значимо уровень контроля, но не превышала 25% (табл. 4).

Отмеченные нами у части животных 30Д-группы патологически значимое облегчение и депрессия синаптической передачи на фоне сниженной амплитуды 1-го М-ответа при оптимальной частоте стимуляции нервно-мышечного аппарата были обнаружены и в более ранних наших исследованиях [10] и, по всей видимости, отражают заблокированность синапсов и возможные постсинаптические изменения. В пользу возможных синаптических нарушений при длительном введении ГК в организм указывают результаты исследований авторов, наблюдавших признаки частичного блокирования ионных каналов холинорецепторов в постсинаптической мембране [27] или снижения их чувствительности к ацетилхолину [28].

Введение Φ в комплексе с Δ не только предотвратило уменьшение амплитуды 1-го М-ответа в серии при стимуляции малоберцового нерва с частотой 30 имп/с, типичное для животных 30Д-группы, но даже обусловило ее существенное увеличение (на 120%)

Таблица 3

Средние значения декремента амплитуды М-ответа в мышце контрольных животных (К) и крыс, получавших на протяжении 30 сут дексаметазон (30Д) и формотерол (30Ф) изолированно и комплексно (30Д+Ф), (M±m)

Группа животных	Значения до утомляющей работы		Значения после утомляющей работы	
	Декремент амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го, %	Процентное количество особей в группе с декрементом амплитуды М-ответов более 10%	Декремент амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го, %	Процентное количество особей в группе с декрементом амплитуды М-ответов более 10%
К	2,4±1,14	0	1,9±0,99	0
30Д	-19,5±4,02°	70	-23,8±4,09°	80
30Ф	13,3±5,62	0	15,3±6,57	0
30Д+Ф	0,3±6,12	30	3,9±2,82	30

Примечание. ° – разница декремента амплитуды М-ответа относительно такового контроля статистически значима ($p < 0,05$); декремент амплитуды М-ответа передней большеберцовой мышцы определяли на основании снижения амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го (в %) при вызванной ритмической активности мышцы с частотой 4 имп/с [25].

относительно контроля (табл. 4). В то же время у 50% особей 30Д+Ф-группы наблюдалось существенное облегчение синаптической передачи (превышающее 30% от амплитуды 1-го М-ответа), хотя средняя по группе степень этого облегчения значимо не отличалась от К-группы (табл. 4). В связи с тем, что существенное облегчение синаптической передачи у животных 30Д+Ф-групп имело место на фоне не только не сниженной, напротив даже повышенной относительно К-группы амплитуды 1-го М-ответа, его нельзя рассматривать как следствие исходной заблокированности синапсов. Вероятнее всего, оно обусловлено облегчением кальцийзависимого экзоцитоза медиатора в условиях ритмической активности нервно-мышечного аппарата под действием Ф и по этой же возможной причине наблюдалось и у 10% особей 30Ф-группы (табл. 4). Наиболее вероятной причиной облегчения синаптической передачи у части особей, длительно получавших Ф, является способность β_2 -АА потенцировать кальцийзависимый экзоцитоз медиатора в синаптическую щель вследствие цАМФзависимой активации электровозбудимых кальциевых каналов в пресинаптической мембране и обусловленного этим увеличения входа кальция в пресинапс [32–34].

Ф, вводимый в комплексе с Д, предотвратил появление случаев патологически значимой депрессии синаптической передачи у животных 30Д+Ф-группы, тогда как у крыс 30Д-группы они регистрировались у

30% особей (табл. 4). Данный факт указывает в пользу отсутствия выраженных постсинаптических нарушений в СМ животных 30Д+Ф-группы.

Таким образом, введение Ф в комплексе с Д предотвратило ухудшение исходных параметров М-ответов мышцы и более выраженное в сравнении с контролем их нарушение после УР, типичные для 30Д-группы. Вместе с тем, у животных 30Д+Ф-группы наблюдалось удлинение латентного периода М-ответов после выполнения УР, типичное для 30Д-группы и не характерное для контроля, а у 30% особей 30Д+Ф-группы – патологически значимый декремент амплитуды М-ответов при низкой частоте стимуляции нервно-мышечного аппарата (4 имп/с). Эти факты свидетельствуют в пользу меньшей надежности работы синапсов как в 30Д-, так и в 30Д+Ф-группах.

Таким образом, полученные в модельных экспериментах на белых крысах данные указывают на высокую эффективность β_2 -адреноагониста формотерола в предотвращении электрофизиологических нарушений в мышце, вызванных длительным введением дексаметазона и отражающих миопатические изменения. Вместе с тем, формотерол, вводимый в комплексе с дексаметазоном, на фоне снижения частоты фиксации случаев низкой надежности синаптической передачи (до 30% против 70% в группе животных, получавших дексаметазон изолированно), в полной мере не предотвращал проявление данного эффекта стероидной миопатии.

Таблица 4

Средние значения (M±m) степени облегчения и депрессии синаптической передачи в мышце контрольных животных (К) и крыс, получавших на протяжении 30 сут дексаметазон (30Д) и формотерол (30Ф) изолированно и комплексно (30Д+Ф)

Группа животных	Амплитуда 1-го М-ответа, мВ	Степень облегчения (в % относительно 1-го М-ответа)	Процентное количество особей в группе с облегчением более 30%	Степень депрессии (в % относительно 1-го М-ответа)	Процентное количество особей в группе с депрессией более 25%
К	2,4±0,21	11,1±2,86	0	-5,7±2,58	0
30Д	1,7±0,21 [-31*]	37,8±8,91°	50	-19,5±5,34°	30
30Ф	4,9±0,48 [+102*]	18,2±7,46	10	-7,7±3,66	0
30Д+Ф	5,3±1,08 [+120*], +220 ^x	42,5±18,17	50	-6,0±2,99	0

Примечание. * – в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно контрольной группы (в %, p<0,05); ^x – указана статистически значимая разница показателя относительно соответствующего значения опытной группы, получившей такое же количество инъекций дексаметазона, не сочетаемых с введением формотерола (в %, p<0,05); ° – разница степени облегчения или депрессии синаптической передачи относительно таковой контроля статистически значима (p<0,05); степень облегчения синаптической передачи оценивалась на основании максимально возможного прироста (в %) амплитуды М-ответов относительно 1-го при ритмической стимуляции нервно-мышечного аппарата с частотой 30 имп/с [25], степень депрессии синаптической передачи оценивалась на основании максимально возможного снижения (в %) амплитуды М-ответов относительно 1-го при ритмической стимуляции нервно-мышечного аппарата с частотой 30 имп/с [25].

Литература

1. Комердус И.В., Будул Н.А., Чеканова А.В. Системное действие глюкокортикоидных препаратов: в помощь врачу общей практики (обзор литературы). *Российский медицинский журнал*. 2017; 1: 45-8.
2. Полунина А.Г., Исаев Ф.В., Демьянова М.А. Стероидная миопатия. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2012; 112 (10-2): 60-4.
3. Труш В.В., Соболев В.И. Модулирующее влияние адреналина на развитие стероидной миопатии у белых крыс, индуцированной длительным введением гидрокортизона. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61 (4): 104-11.
4. Umeki D., Ohnuki Y., Mototani Y., Shiozawa K., Suita K., Fujita T., Nakamura Y., Saeki Y., Okumura S. Protective Effects of Clenbuterol against Dexamethasone-Induced Masseter Muscle Atrophy and Myosin Heavy Chain Transition. *PLoS One*. 2015; 10(6): e0128263. doi: 10.1371/journal.pone.0128263.
5. Schakman O., Gilson H., Thissen J.P. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J. Endocrinology*. 2008; 197: 1-10. doi: 10.1677/JOE-07-0606.
6. Riso E.M., Ahtikoski A., Alev K., Kaasik P., Pehme A., Seene T. Relationship between extracellular matrix, contractile apparatus, muscle mass and strength in case of glucocorticoid myopathy. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2008; 108: 117-20. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.06.002.
7. Камалиев Р.Р., Гришин С.Н., Фалу Ж.Ю., Зиганшин А.У. Воздействие гидрокортизона, АТФ и аденозина на скелетную мышцу крысы. *Казанский медицинский журнал*. 2009; 90(4): 556-9.
8. Ohnuki Y., Umeki D., Mototani Y., Shiozawa K., Nariyama M., Ito A. et al. Role of phosphodiesterase 4 expression in the Epac1 signaling-dependent skeletal muscle hypertrophic action of clenbuterol. *Physiol Rep*. 2016; 4(10): pii: e12791. doi: 10.14814/phy2.12791.
9. Khan M.M., Lustrino D., Silveira W.A. et al. Sympathetic innervation controls homeostasis of neuromuscular junctions in health and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016; 113(3): 746-50.
10. Труш В.В., Соболев В.И. Амплитудно-частотная зависимость М-ответа скелетной мышцы крыс с экспериментальным гиперкортицизмом. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2015; 101 (7): 829-42.
11. Гришин С.Н., Габдрахманов А.И., Хайруллин А.Е., Зиганшин А.У. Влияние глюкокортикоидов и катехоламинов на нервно-мышечную передачу. *Биологические мембраны*. 2017; 34(4): 251-60. doi: 10.1134/s1990747817040043.
12. Brown D.M., Jones S., Daniel Z.C.T.R., Brearley M.C., Lewis J.E., Ebling F.J.P., Parr T., Brameld J.M. Effect of sodium 4-phenylbutyrate on Clenbuterol-mediated muscle growth. *PLoS One*. 2018; 13(7): e0201481. doi: 10.1371/journal.pone.0201481.
13. Shimamoto S., Ijiri D., Kawaguchi M., Nakashima K., Tada O., Inoue H., Ohtsuka A. β 1- and β 2-adrenergic receptor stimulation differ in their effects on PGC-1 α and atrogen-1/MAFbx gene expression in chick skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2017; 211 (Sep): 1-6. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.05.013.
14. Woodall B.P., Woodall M.C., Luongo T.S., Grisanti L.A., Tilley D.G., Elrod J.W., Koch W.J. Skeletal Muscle-specific G Protein-coupled Receptor Kinase 2 Ablation Alters Isolated Skeletal Muscle Mechanics and Enhances Clenbuterol-stimulated Hypertrophy. *J. Biol. Chem*. 2016; 291(42): 21913-24. doi: 10.1074/jbc.m116.721282.
15. Koeberl D.D., Case L.E., Smith E.C., Walters C., Han S.O., Li Y., et al. Correction of Biochemical Abnormalities and Improved Muscle Function in a Phase I/II Clinical Trial of Clenbuterol in Pompe Disease. *Mol. Ther.* 2018; Jul 5. pii: S1525-0016(18)30309-5. doi: 10.1016/j.yimthe.2018.06.023.
16. Milioto C., Malena A., Maino E., Polanco M.J., Marchioretto C., Borgia D., et al. Beta-agonist stimulation ameliorates the phenotype of spinal and bulbar muscular atrophy mice and patient-derived myotubes. *Sci. Rep.* 2017; 24 (7): 41046. doi: 10.1038/srep41046.
17. Dutt V., Gupta S., Dabur R., Injeti E., Mittal A. Skeletal muscle atrophy: Potential therapeutic agents and their mechanisms of action. *Pharmacol Res.* 2015; 99 (Sep): 86-100. doi: 10.1016/j.phrs.2015.05.010.
18. Cameron R.B., Beeson C.C., Schnellmann R.G. Structural and pharmacological basis for the induction of mitochondrial biogenesis by formoterol but not clenbuterol. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 10578. doi: 10.1038/s41598-017-11030-5.
19. Лепухова О.А. Эффективность применения в терапии бронхиальной астмы комбинированных ингаляционных глюкокортикостероидов. *Вестник новых медицинских технологий*. 2014; 1. Электронный журнал. doi: 10.12737/5482.
20. Вознесенский Н.А. Формотерол (Форадил) в лечении бронхиальной астмы. *Лечебное дело*. 2006; 4: 52-6.
21. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А.Н. Миронова, Н.Д. Бунатян, ред. Москва: Минздрав РФ, ЗАО «Гриф и К»; 2012.
22. Kim J.H., Kwak M.K., Ahn S.H., Kim H., Cho Y.Y., Suh S., Kim B.J., Song K.H., Lee S.H., Koh J.M. Alteration in skeletal muscle mass in women with subclinical hypercortisolism. *Endocrine*. 2018; 61(1): 134-43. doi: 10.1007/s12020-018-1598-0.
23. Борисова Е.О. Клиническая фармакология парентеральных форм глюкокортикоидов. *Лечебное дело*. 2007; 3: 17-24.
24. Galea V., De Bruin H., Cavasin R., McComas A.J. The number and relative size of motor units estimated by computer. *Muscle and Nerve*. 1991; 14: 1123-30. doi: 10.1002/mus.880141114.
25. Гехт Б.М. *Теоретическая и клиническая электромиография*. Л.; Наука, Ленинградское отделение; 1990.
26. Minetto M.A., Botter A., Lanfranco F., Baldi M., Ghigo E., Arvat E. Muscle fiber conduction slowing and decreased levels of circulating muscle proteins after short-term dexamethasone administration in healthy subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2010; 95: 1663-71. doi: 10.1210/jc.2009-2161.
27. Bouzat C., Barrantes F.J. Assigning function to residues in the acetylcholine receptor channel region. *Molecular Membrane Biology*. 1997; 14: 167-77. doi: 10.3109/09687689709048179.
28. Dodt C., Keyser B., Molle M. Acute suppression of muscle sympathetic nerve activity by hydrocortisone in humans. *Hypertension*. 2000; 3: 758-63. doi: 10.1161/01.hyp.35.3.758.
29. MacIntosh B., Gardiner Ph., McComas A.J. *Skeletal muscle. Form and function*. 2th ed. Champaign: Human Kinetics; 1998.
30. Gloor S.M. Relevance of Na⁺, K⁺-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. *FEBS Lett*. 1997; 412: 1-4. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00774-6.
31. Бухараева Э.А., Гайнулов Р.Х., Никольский Е.Е. Влияние норадреналина на амплитудно-временные характеристики многоквантовых токов концевой пластинки и кинетику вызванной секреции квантов медиатора. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2001; 87(4): 468-75.
32. Grishin S.N., Ziganshin A.U. *Synaptic organization of tonic motor units in vertebrates. Biochemistry (Moscow)*. Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology. 2015; 9(1): 13-20. doi: 10.1134/s1990747814060014.

33. Tavi P., Laine M., Weckstrom M., Ruscoabo H. Cardiac mechano-transduction: From sensing to disease and treatment. *Trends Pharm. Sci.* 2001; 22: 254-60. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01679-5.
34. Bukharaeva E., Samigullin D., Nikolsky E., Vyskocil F. Protein kinase A cascade regulates quantal release dispersion at frog muscle endplate. *J. Physiol.* 2002; 538(Pt 3): 837-48. doi: 10.1113/jphysiol.2001.012752.
35. Gabdrakhmanov A.I., Khairullin A.E., Grishin S.N., Ziganshin A.U. ATP-induced changes in rat skeletal muscle contractility. *Int. J. Risk Saf. Med.* 2015; 27 (Suppl. 1): S82-3. doi: 10.3233/JRS-150700.
36. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Катехоламины: биохимия, фармакология, физиология, клиника. *Вопросы медицинской химии.* 2002; 48(1): 45-67.
37. Watt M.J., Stellingwerff T., Heigenhauser G.J.F., Spriet L.L. Effects of plasma adrenaline on hormone-sensitive lipase at rest and during moderate exercise in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 2003; 550(1): 325-32. doi: 10.1113/jphysiol.2003.043133.
38. Бухараева Э.А., Ким К.Х., Никольский Е.Е., Выскочил Ф. Синхронизация вызванной секреции квантов медиатора как механизм облегчающего действия симпатомиметиков. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 1998; 84 (10): 1121-31.
39. Соболев В.И., Труш В.В. Влияние тироксина на проявление эффектов дексаметазона на параметры М-ответа скелетной мышцы белых крыс. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2013; 99(9): 1067-76.
40. Гиниатуллин А.Р., Гришин С.Н., Гиниатуллин Р.А. Влияние гидрокортизона на модулирующие эффекты пуринов в нервно-мышечном соединении. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2000; 86(10): 1293-9.
41. Nakamura Y., Nagase I., Asano A. Beta-2-adrenergic agonists up-regulates uncoupling proteins 2 and 3 in skeletal muscle of the mouse. *J. Vet. Med. Sci.* 2001; 63(3): 309-14. doi: 10.1292/jvms.63.309.
7. Kamaliev R.R., Grishin S.N., Falou Zh.Yu., Ziganshin A.U. The effect of hydrocortisone, ATP and adenosine on rat skeletal muscle contraction. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2009; 90(4): 556-9. (In Russian)
8. Ohnuki Y., Umeki D., Mototani Y., Shiozawa K., Nariyama M., Ito A., et al. Role of phosphodiesterase 4 expression in the Epac1 signaling-dependent skeletal muscle hypertrophic action of clenbuterol. *Physiol Rep.* 2016; 4(10): pii: e12791. doi: 10.14814/phy2.12791.
9. Khan M.M., Lustrino D., Silveira W.A. et al. Sympathetic innervation controls homeostasis of neuromuscular junctions in health and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016; 113(3): 746-50.
10. Trush V.V., Sobolev V.I. Amplitude-frequency's dependence of M-response of the skeletal muscle of rats with experimental hypercorticism. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenov.* 2015; 101(7): 829-42. (In Russian)
11. Grishin S.N., Gabdrakhmanov A.I., Khairullin A.E., Ziganshin A.U. The Influence of Glucocorticoids and Catecholamines on the Neuromuscular Transmission. *Biologicheskii Membrany.* 2017; 34(4): 251-60. doi: 10.1134/s1990747817040043. (In Russian)
12. Brown D.M., Jones S., Daniel Z.C.T.R., Brearley M.C., Lewis J.E., Ebling F.J.P., Parr T., Brameld J.M. Effect of sodium 4-phenylbutyrate on Clenbuterol-mediated muscle growth. *PLoS One.* 2018; 13(7): e0201481. doi: 10.1371/journal.pone.0201481.
13. Shimamoto S., Ijiri D., Kawaguchi M., Nakashima K., Tada O., Inoue H., Ohtsuka A. β 1- and β 2-adrenergic receptor stimulation differ in their effects on PGC-1 α and atrogin-1/MAFbx gene expression in chick skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2017; 211 (Sep): 1-6. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.05.013.
14. Woodall B.P., Woodall M.C., Luongo T.S., Grisanti L.A., Tilley D.G., Elrod J.W., Koch W.J. Skeletal Muscle-specific G Protein-coupled Receptor Kinase 2 Ablation Alters Isolated Skeletal Muscle Mechanics and Enhances Clenbuterol-stimulated Hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(42): 21913-24. doi: 10.1074/jbc.m116.721282.
15. Koeberl D.D., Case L.E., Smith E.C., Walters C., Han S.O., Li Y., et al. Correction of Biochemical Abnormalities and Improved Muscle Function in a Phase I/II Clinical Trial of Clenbuterol in Pompe Disease. *Mol. Ther.* 2018; Jul 5. pii: S1525-0016(18)30309-5. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.06.023.
16. Milioto C., Malena A., Maino E., Polanco M.J., Marchioretto C., Borgia D., et al. Beta-agonist stimulation ameliorates the phenotype of spinal and bulbar muscular atrophy mice and patient-derived myotubes. *Sci. Rep.* 2017; 24(7): 41046. doi: 10.1038/srep41046.
17. Dutt V., Gupta S., Dabur R., Injeti E., Mittal A. Skeletal muscle atrophy: Potential therapeutic agents and their mechanisms of action. *Pharmacol Res.* 2015; 99 (Sep): 86-100. doi: 10.1016/j.phrs.2015.05.010.
18. Cameron R.B., Beeson C.C., Schnellmann R.G. Structural and pharmacological basis for the induction of mitochondrial biogenesis by formoterol but not clenbuterol. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 10578. doi: 10.1038/s41598-017-11030-5.
19. Lepukhova O.A. The effectiveness use of the combined inhalation glucocorticosteroids in the therapy of bronchial asthma. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy.* 2014; 1: online journal. doi: 10.12737/5482. (In Russian)
20. Voznesenskiy N.A. Formoterolum (Foradil) in treatment of bronchial asthma. *Lechebnoe delo.* 2006; 4: 52-6. (In Russian)
21. *Guidelines for pre-clinical trials of medicines [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv].* A.N. Mironova, N.D. Bunatyan, ed. Moscow; Minzdrav RF, ZAO «Grif i K»; 2012. (In Russian)
22. Kim J.H., Kwak M.K., Ahn S.H., Kim H., Cho Y.Y., Suh S., Kim B.J., Song K.H., Lee S.H., Koh J.M. Alteration in skeletal muscle mass

References

1. Komerdu I.V., Budul N.A., Chekanova A.V. Systemic effects of glucocorticoid drugs: a guide for the General practitioner (literature review). *RMJ.* 2017; 1: 45-8. (In Russian)
2. Polunina A.G., Isaev F.V., Dem'ianova M.A. Steroid myopathy. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova.* 2012; 112(10-2): 60-4. (In Russian)
3. Trush V.V., Sobolev V.I. The modulating influence of adrenaline on the development of the steroid myopathy induced by long application of hydrocortisone at white rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2017; 61(3): 104-11. (In Russian)
4. Umeki D., Ohnuki Y., Mototani Y., Shiozawa K., Suita K., Fujita T., Nakamura Y., Saeki Y., Okumura S. Protective Effects of Clenbuterol against Dexamethasone-Induced Masseter Muscle Atrophy and Myosin Heavy Chain Transition. *PLoS One.* 2015; 10(6): e0128263. doi: 10.1371/journal.pone.0128263.
5. Schakman O., Gilson H., Thissen J.P. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J. Endocrinology.* 2008; 197: 1-10. doi: 10.1677/JOE-07-0606.
6. Riso E.M., Ahtikoski A., Alev K., Kaasik P., Pehme A., Seene T. Relationship between extracellular matrix, contractile apparatus, muscle mass and strength in case of glucocorticoid myopathy. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2008; 108: 117-20. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.06.002.

- in women with subclinical hypercortisolism. *Endocrine*. 2018; 61(1): 134-143. doi: 10.1007/s12020-018-1598-0.
23. Borisova E.O. Clinical pharmacology of parenteral forms of glucocorticoids. *Lechebnoe delo*. 2007; 3: 17-24. (In Russian)
 24. Galea V., De Bruin H., Cavasin R., McComas A.J. The number and relative size of motor units estimated by computer. *Muscle and Nerve*. 1991; 14: 1123-30. doi: 10.1002/mus.880141114.
 25. Geht B.M. *Theoretical and clinical electromyography [Teoreticheskaya i klinicheskaya elektromiografiya]*. Leningrad; Nauka; 1990. (In Russian)
 26. Minetto M.A., Botter A., Lanfranco F., Baldi M., Ghigo E., Arvat E. Muscle fiber conduction slowing and decreased levels of circulating muscle proteins after short-term dexamethasone administration in healthy subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2010; 95: 1663-71. doi: 10.1210/jc.2009-2161.
 27. Bouzat C., Barrantes F.J. Assigning function to residues in the acetylcholine receptor channel region. *Molecular Membrane Biology*. 1997; 14: 167-77. doi: 10.3109/09687689709048179.
 28. Dodt C., Keyser B., Molle M. Acute suppression of muscle sympathetic nerve activity by hydrocortisone in humans. *Hypertension*. 2000; 3: 758-63. doi: 10.1161/01.hyp.35.3.758.
 29. MacIntosh B., Gardiner Ph., McComas A.J. *Skeletal muscle. Form and function*. 2th ed. Champaign: Human Kinetics; 1998.
 30. Gloor S.M. Relevance of Na⁺, K⁺-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. *FEBS Lett*. 1997; 412: 1-4. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00774-6.
 31. Buharaeva Eh.A., Gajnulov R.H., Nikol'skij E.E. Influence of noradrenaline on amplitude-time characteristics of multiquantum currents of the trailer device and kinetics of the caused secretion of quanta of mediator. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenov*. 2001; 7(4): 468-75. (In Russian)
 32. Grishin S.N., Ziganshin A.U. Synaptic organization of tonic motor units in vertebrates. *Biochemistry (Moscow)*. Suppl. Ser. A: *Membrane and Cell Biology*. 2015; 9(1): 13-20. doi: 10.1134/s1990747814060014.
 33. Tavi P., Laine M., Weckstrom M., Ruscoabo H. Cardiac mechanotransduction: From sensing to disease and treatment. *Trends Pharm. Sci*. 2001; 22: 254-60. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01679-5.
 34. Bukharaeva E., Samigullin D., Nikolsky E., Vyskocil F. Protein kinase A cascade regulates quantal release dispersion at frog muscle endplate. *J. Physiol*. 2002; 538(Pt 3): 837-48. doi: 10.1113/jphysiol.2001.012752.
 35. Gabdrakhmanov A.I., Khairullin A.E., Grishin S.N., Ziganshin A.U. ATP-induced changes in rat skeletal muscle contractility. *Int. J. Risk Saf. Med*. 2015; 27 (Suppl. 1): S82-3. doi: 10.3233/JRS-150700.
 36. Kulinskiy V.I., Kolesnechenko L.S. Catecholamine: biochemistry, pharmacology, physiology, clinic. *Voprosy Meditsinskoy khimii*. 2002; 48(1): 45-67. (In Russian)
 37. Watt M.J., Stellingwerff T., Heigenhauser G.J.F., Spriet L.L. Effects of plasma adrenaline on hormone-sensitive lipase at rest and during moderate exercise in human skeletal muscle. *J. Physiol*. 2003; 550(1): 325-32. doi: 10.1113/jphysiol.2003.043133.
 38. Bukharaeva E.A., Kim K.K., Nikolskiy E.E., Vyskocil F. Synchronization of secretion of the evoked transmitter quanta as mechanism of the facilitating action of sympathomimetics. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenov*. 1998; 84(10): 1121-31. (In Russian)
 39. Sobolev V.I., Trush V.V. Influence of Thyroxine on Display of Dexamethasone's Effects on M-response's Parameters of Skeletal Muscle of White Rats. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenov*. 2013; 99(9): 1067-76. (In Russian)
 40. Giniatullin A.R., Grishin S.N., Giniatullin R.A. Influence of hydrocortisone on the modulating effects of purin in neuromuscular connection. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenov*. 2000; 86(10): 1293-9. (In Russian)
 41. Nakamura Y., Nagase I., Asano A. Beta-2-adrenergic agonists up-regulates uncoupling proteins 2 and 3 in skeletal muscle of the mouse. *J. Vet. Med. Sci*. 2001; 63(3): 309-14. doi: 10.1292/jvms.63.309.

Сведения об авторах:

Труш Вера Владимировна, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. физиологии человека и животных ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», e-mail: ver.trush@yandex.ru;

Соболев Валерий Иванович, доктор биол. наук, проф., каф. здоровья и реабилитации Института педагогики, психологии и инклюзивного образования Гуманитарно-педагогической академии (филиал) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», e-mail: v.sobolev@mail.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-002.77

Бедина С.А.¹, Трофименко А.С.^{1,2}, Мозговая Е.Э.¹, Зборовская И.А.^{1,2}

Энзимное профилирование плазмы крови и лимфоцитов при системной красной волчанке: фокус на ферменты пуринового и пиримидинового метаболизма

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», 400138, г. Волгоград, Россия, ул. им. Землячки, д. 76;²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, 400131, г. Волгоград, Россия, площадь Павших борцов, д. 1

Изучение метаболизма пуриновых и пиримидиновых оснований при системной красной волчанке в настоящее время является актуальным направлением, как с позиций фундаментальной науки, так и в аспекте разработки инновационных средств лечения. Не менее важным является и энзимное профилирование, поскольку именно ферменты - перспективные предикторы ответа на терапию и удобные «мишени» для терапевтических воздействий. **Цель исследования** – описание профиля активности ключевых ферментов пуринового и пиримидинового метаболизма в плазме крови и в лизатах циркулирующих лимфоцитов у больных системной красной волчанкой. **Методика.** В плазме крови и лизатах лимфоцитов 50 больных системной красной волчанкой определяли активность комплекса из 10 ферментов пуринового и пиримидинового метаболизма. В качестве контроля использовали образцы 30 здоровых лиц. Оценка степени активности проводилась с использованием шкалы индексов ECLAM. Выделение лимфоцитов из венозной периферической крови проводили с помощью метода седиментации в градиенте плотности. **Результаты.** У больных системной красной волчанкой была установлена зависимость активности ферментов пуринового пиримидинового метаболизма от тяжести заболевания. Прямые корреляционные связи с индексом ECLAM выявлены в плазменной активности пуриноклеозидфосфорилазы, аденозинкиназы, урацил/тимидиндегидрогеназы, ИМФ-дегидрогеназы, цитидиндезаминазы, тимидинкиназы, дигидрооротатдегидрогеназы, а также у активности аденозинкиназы, ИМФ-дегидрогеназы и тимидинкиназы в лизатах лимфоцитов. Обратные корреляционные связи с индексом ECLAM выявлены для аденозиндезаминазы, тимидинфосфорилазы в плазме и активности пуриноклеозидфосфорилазы, аденозиндезаминазы, гуанилаткиназы, урацил/тимидиндегидрогеназы, цитидиндезаминазы, тимидинфосфорилазы, дигидрооротатдегидрогеназы в лизатах лимфоцитов. При системной красной волчанке в плазме наиболее информативными оказались показатели минимальной активности пуриноклеозидфосфорилазы, аденозинкиназы и ИМФ-дегидрогеназы, в лимфоцитах – пуриноклеозидфосфорилазы, аденозиндезаминазы и аденозинкиназы. **Заключение.** Изученные энзимные показатели можно использовать в качестве дополнительных маркеров активности системной красной волчанке.

Ключевые слова: аденозиндезаминаза; аденозинкиназа; гуанилаткиназа; дигидрооротатдегидрогеназа; ИМФ-дегидрогеназа; пуриноклеозидфосфорилазы; тимидинкиназа; тимидинфосфорилазы; урацил/тимидиндегидрогеназа; цитидиндезаминаза; системная красная волчанка; лизаты лимфоцитов; плазма крови.

Для цитирования: Бедина С.А., Трофименко А.С., Мозговая Е.Э., Зборовская И.А. Энзимное профилирование плазмы крови и лимфоцитов при системной красной волчанке: фокус на ферменты пуринового и пиримидинового метаболизма. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 48-54.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03. 48-54

Для корреспонденции: Бедина Светлана Александровна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. клинко-биохимической лаб., e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.07.2017

Bedina S.A.¹, Trofimenko A.S.^{1,2}, Mozgovaya E.E.¹, Zborovskaya I.A.^{1,2}

Enzymatic profiling of blood plasma and lymphocytes in systemic lupus erythematosus: focus on purine and pyrimidine metabolizing enzymes

¹A.B. Zborovsky Research Institute for Clinical and Experimental Rheumatology, Zemlyachki str. 76, Volgograd 400138;²Volgograd State Medical University, Plshchad Pavshikh Bortsov 1, Volgograd 400131

Purine and pyrimidine metabolic pathways are emerging topical areas of research from the perspective of both basic science and development of innovative therapies for systemic lupus erythematosus (SLE). It is particularly important, therefore, to disclose characteristic enzymatic patterns for further prediction of the response to treatment. **Objective:** to characterize activity patterns of the major enzymes of purine and pyrimidine metabolic pathways in SLE. **Methods.** Samples were obtained from 50 patients with verified SLE and 30 healthy controls. Disease activity was assessed using the ECLAM scale. Blood lymphocytes were isolated by a standard density gradient centrifugation procedure. Activities of 10 major purine and pyrimidine enzymes were measured in blood plasma and lysed lymphocytes. **Results.** For different enzyme groups, enzyme activities directly or inversely correlated with SLE severity. Plasma purine nucleoside phosphorylase, adenosine kinase, uracil/thymidine dehydrogenase, IMP dehydrogenase, cytidine deaminase, thymidine kinase, dihydroorotate dehydrogenase, and lymphocyte adenosine kinase, IMP dehydrogenase, and thymidine kinase activities positively correlated with the ECLAM score. Negative correlations with ECLAM score were found for plasma adenosine deaminase and thymidine phosphorylase, and for lymphocyte purine nucleoside phosphorylase, adenosine deaminase, guanylate kinase, uracil/thymidine dehydrogenase, cytidine deaminase, thymidine phosphorylase, and dihydroorotate dehydrogenase. Activities of plasma purine nucleoside phosphorylase, adenosine kinase, IMP dehydrogenase, and lymphocyte purine nucleoside phosphorylase, adenosine deaminase, and adenosine kinase activities had the highest correlations with minimal SLE activity and represented candidate markers for the disease severity. **Conclusion.** The studied enzymatic patterns can be used as auxiliary markers of SLE activity, with special emphasis on minimal disease activity.

Keywords: adenosine deaminase; adenosine kinase; guanylate kinase, dihydroorotate dehydrogenase; IMP dehydrogenase; purine nucleoside phosphorylase; thymidine kinase; thymidine phosphorylase; uracil/thymidine dehydrogenase; cytidine deaminase; systemic lupus erythematosus; lymphocytes; blood.

For citation: Bedina S.A., Trofimenko A.S., Mozgovaya E.E., Zborovskaya I.A. Enzymatic profiling of blood plasma and lymphocytes in systemic lupus erythematosus: focus on purine and pyrimidine metabolizing enzymes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 48-54. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.48-54

For correspondence: Svetlana A. Bedina, PhD, senior researcher, Research Institute for Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy; 76, Zemlyachki str., Volgograd, 400138, Russian Federation, e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Bedina S.A., <https://orcid.org/0000-0002-5316-0185>

Trofimenko A.S., <https://orcid.org/0000-0002-1627-8483>

Mozgovaya E.E., <https://orcid.org/0000-0003-0373-5072>

Zborovskaya I.A., <https://orcid.org/0000-0003-3898-7667>

Received 14.07.2017

Введение

Системная красная волчанка (СКВ) – аутоиммунное системное заболевание соединительной ткани, характеризующееся широким спектром клинических проявлений и непредсказуемым течением [1]. Механизмы индукции и прогрессирования СКВ являются объектом интенсивного изучения с 50-х гг. XX в, когда это заболевание было выделено в отдельную нозологическую единицу, однако начальные этапы патогенеза, равно как и этиология этого тяжелого заболевания окончательно не раскрыты. Отчасти вследствие многочисленных «белых пятен» в концепции этиопатогенеза, отчасти ввиду выраженного полиморфизма клинических и иммунологических проявлений, верификация диагноза СКВ, как правило, вызывает существенные затруднения, в особенности на начальных этапах болезни.

Принято считать, что основная причина характерного для СКВ поражения различных органов и тканей

– аутоиммунное воспаление, которое, в свою очередь, является следствием активации Th2-зависимого синтеза аутоантител [2– 4]. Высокая частота поражения жизненно важных органов при естественном течении СКВ наряду с отсутствием эффективных и избирательных способов подавления волчаночного воспаления вынуждает ревматологов использовать неспецифические методы иммуносупрессии. По этой причине основу лечения тяжелых форм СКВ в настоящее время составляют цитостатические иммунодепрессанты (ЦС), глюкокортикостероиды и В-лимфоцитотропные моноклональные антитела. Всем препаратам, и в особенности ЦС, присущи серьезные побочные эффекты, коррелирующие с дозой и длительностью применения препарата [5].

ЦС, применяемые при СКВ, отличаются различными механизмами воздействия на иммунокомпетентные

клетки [6]. Циклофосфамид, являясь алкилирующим агентом, вызывает химические изменения в молекуле ДНК, что наиболее выражено в пролиферирующих лимфоцитах и приводит к их апоптозу. Циклоспорин А посредством циклофилин-опосредованного ингибирования кальциневрина влияет на передачу внутриклеточных сигналов и секрецию цитокинов Т-лимфоцитами. Однако точкой приложения большинства ЦС, используемых при СКВ, является обмен пуриновых нуклеотидов. Известно, что азатиоприн тормозит синтез ДНК посредством образования тиогуаниновых нуклеотидов, которые затем включаются в состав ДНК, а также ингибируют синтез и взаимное превращение аденина, гипоксантина и гуанина. Под влиянием метотрексата не только снижается активность тетрагидрофолатредуктазы, но и опосредованно подавляется синтез пуринов и пиримидинов *de novo*. Наконец, механизм иммуносупрессивного действия микофенолата мофетила связан главным образом с ингибированием инозинмонофосфатдегидрогеназы, ключевого фермента синтеза гуанозина. Считается, что отчетливый иммуносупрессивный эффект этих ЦС связан с особенностью метаболизма лимфоцитов: пролиферация последних в большей степени зависит от синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований *de novo*, чем от их поступления извне [6].

Ввиду этого, изучение метаболизма пуриновых и пиримидиновых оснований при СКВ весьма востребовано не только с позиций фундаментальной науки, но и в аспекте разработки инновационных средств лечения СКВ, а также перехода к персонализации иммуносупрессивной терапии. В рамках бурно развивающегося в последнее время направления – метаболомики, появляется возможность идентификации в различных биологических средах всего комплекса низкомолекулярных метаболитов, в том числе и пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов [7]. Не менее важным является и энзимное профилирование, поскольку именно ферменты являются как перспективными предикторами ответа на терапию, так и наиболее удобными «мишенями» для селективных терапевтических воздействий на метаболизм.

Цель исследования – описание профиля активности ключевых ферментов пуринового и пиримидинового метаболизма в плазме крови и в лизатах циркулирующих лимфоцитов у больных системной красной волчанки.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного

добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена этическим комитетом ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии». Исследование включало 50 больных СКВ: 43 (86%) женщины и 7 (4%) мужчин в возрасте 35-40 лет. Отбор больных проводили в ревматологическом отделении ГКБ СМП № 25 г. Волгограда. Диагноз устанавливали на основании критериев Американской ревматологической ассоциации, рекомендованных Ассоциацией ревматологов России [1, 8]. Оценка степени активности проводилась с использованием шкалы индексов European Consensus Lupus Activity Measurement (ECLAM) [9], а также по шкале В.А. Насоновой с выделением 3 степеней активности [1]. Комплексная терапия больных СКВ включала глюкокортикоиды (преднизолон, метилпреднизолон), цитостатики (циклофосфамид, азатиоприн, метотрексат), аминохинолиновые препараты, нестероидные противовоспалительные средства. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц: 24 (80%) женщины и 6 (20%) мужчин.

Выделение лимфоцитов из венозной крови проводили по методике А. Воуи [10]. Лизаты лимфоцитов готовили путем трехкратного замораживания-оттаивания. В плазме крови и лизатах лимфоцитов определяли активность ферментов пуринового и пиримидинового метаболизма: аденозиндезаминазы (АДА; Е.С. 3.5.4.4), аденозинкиназы (АК; Е.С. 2.7.1.20), гуанилаткиназы (ГК; Е.С. 2.7.4.8), дигидрооротатдегидрогеназы (ДОДГ; Е.С. 1.3.5.2), ИМФ-дегидрогеназы (ИМФДГ; Е.С. 1.1.1.205), пурипуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ; Е.С. 2.4.2.1), тимидинкиназы (ТК; Е.С. 2.7.1.21), тимидинфосфорилазы (ТФ; Е.С. 2.4.2.4), урацил/тимидиндегидрогеназы (УДГ; Е.С. 1.17.99.4), цитидиндезаминазы (ЦДА; Е.С. 3.5.4.5). Исследование активности ферментов осуществляли спектрофотометрическим методом и выражали в нмоль/мин/мл [11-18]. Для лизатов лимфоцитов активность приводили к содержанию клеток 1×10^7 на 1 мл. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Statistica 6.0. Подбор критериев для сравнения групп осуществляли по общепринятым правилам. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Поскольку существенной зависимости уровня активности ферментов от пола и возраста выявлено не было в дальнейших исследованиях эти факторы не учитывались. Референтные пределы активности ферментов в плазме крови и лимфоцитов представлены в **табл. 1**.

Средняя продолжительность заболевания составила $7,6 \pm 0,8$ лет. I степень активности патологического процесса определялась у 15 (30%) больных, II степень – у 25 (50%) и III степень – у 10 (20%) больных. Средняя активность СКВ по шкале ECLAM составила $6,60 \pm 0,30$ балла.

У больных СКВ по сравнению с референтной группой в плазме (табл. 2) выявлено повышение активности ПНФ, АК, УДГ, ИМФДГ, ЦДА, ТК, ДОДГ, снижение активности АДА, ГК; в лизатах лимфоцитов (табл. 3) – повышение активности АК, ИМФДГ, ТК и снижение активности ПНФ, АДА, ГК, ТФ, ЦДА. У больных СКВ с I степенью активности патологическо-

го процесса в плазме (табл. 2) выше активность ПНФ, АК, ИМФДГ, ТК, ТФ, УДГ, ДОДГ, ниже активность АДА, ГК; в лизатах лимфоцитов (табл. 3) ниже активность ПНФ, АДА, выше активность АК, УДГ, ИМФДГ, ТК.

При анализе индивидуальных энзимных показателей оказалось, что у больных СКВ с I степенью активности патологического процесса за верхний референтный предел здоровых людей в плазме крови активность ПНФ выходила в 86,7% случаев, АК – в 80%, ИМФДГ – в 60%. В лимфоцитах активность ПНФ в 78%, АДА и АК в 100% случаев выходила за пределы нормы (ниже и выше, соответственно).

Таблица 1

Референтные пределы активности ферментов в плазме крови и лизатах лимфоцитов

Фермент	Референтные пределы ($M \pm 2\sigma$), нмоль/мин/мл	
	Плазма крови	Лимфоциты
Пуриннуклеозидфосфорилаза (ПНФ)	0,74-1,46	26,91-40,47
Аденозиндезаминаза (АДА)	5,54-8,86	38,35-47,91
Аденозинкиназа (АК)	7,85-9,69	15,36-22,96
Гуанилаткиназа (ГК)	2,22-5,66	2,76-10,68
Урацил/тимидиндегидрогеназа (УДГ)	0,25-1,21	2,63-5,07
ИМФ-дегидрогеназа (ИМФДГ)	1,49-2,97	1,28-6,40
Цитидиндезаминаза (ЦДА)	0,33-1,29	2,15-4,95
Тимидинкиназа (ТК)	0,40-0,96	1,55-2,71
Тимидинфосфорилаза (ТФ)	0,41-1,17	2,23-4,43
Дигидрооротатдегидрогеназа (ДОДГ)	1,44-5,16	2,29-6,33

Таблица 2

Активность ферментов в плазме крови больных СКВ, ($M \pm m$)

Фермент	Здоровые, $n=30$	Больные СКВ, общая группа, $n=50$	Больные СКВ, I степень активности, $n=15$	Больные СКВ, II степень активности, $n=25$	Больные СКВ, III степень активности, $n=10$
Пуриннуклеозидфосфорилаза (ПНФ)	$0,82 \pm 0,06$	$2,29 \pm 0,14^*$	$1,17 \pm 0,06^*$	$2,31 \pm 0,04^*$	$3,92 \pm 0,07^*$
Аденозиндезаминаза (АДА)	$7,2 \pm 0,15$	$5,07 \pm 0,13^*$	$6,06 \pm 0,09^*$	$5,09 \pm 0,05^*$	$3,52 \pm 0,06^*$
Аденозинкиназа (АКА)	$8,77 \pm 0,08$	$11,41 \pm 0,16^*$	$10,14 \pm 0,12^*$	$11,43 \pm 0,09^*$	$13,26 \pm 0,05^*$
Гуанилаткиназа (ГК)	$3,94 \pm 0,16$	$3,41 \pm 0,05^*$	$3,47 \pm 0,07^*$	$3,47 \pm 0,08^*$	$3,18 \pm 0,02^*$
урацил/тимидиндегидрогеназа (УДГ)	$0,73 \pm 0,04$	$1,0 \pm 0,02^*$	$0,89 \pm 0,02^*$	$1,02 \pm 0,02^*$	$1,15 \pm 0,01^*$
ИМФ-дегидрогеназа (ИМФДГ)	$2,23 \pm 0,07$	$3,75 \pm 0,09^*$	$3,08 \pm 0,17^*$	$4,01 \pm 0,07^*$	$4,26 \pm 0,08^*$
Цитидиндезаминаза (ЦДА)	$0,81 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,03^*$	$0,87 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,04^*$	$1,06 \pm 0,04^*$
Тимидинкиназа (ТК)	$0,66 \pm 0,03$	$1,05 \pm 0,03^*$	$0,8 \pm 0,02^*$	$1,14 \pm 0,03^*$	$1,22 \pm 0,01^*$
тимидинфосфорилаза (ТФ)	$0,79 \pm 0,03$	$0,79 \pm 0,03$	$1,06 \pm 0,01^*$	$0,74 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,01^*$
Дигидрооротатдегидрогеназа (ДОДГ)	$3,3 \pm 0,17$	$3,93 \pm 0,04^*$	$3,94 \pm 0,08^*$	$3,84 \pm 0,06^*$	$4,14 \pm 0,03^*$

Примечание. * $p < 0,05$. Непарный критерий Стьюдента.

Нами также изучалась зависимость активности энзимов от индекса ECLAM. Коэффициент корреляции индекса активности ECLAM с активностью ПНФ в плазме составил 0,57, с активностью АДА в плазме – 0,62, с активностью АК в плазме – 0,60, с активностью ПНФ в лимфоцитах – 0,87, с активностью АДА в лимфоцитах – 0,75, с активностью АК в лимфоцитах – 0,78. Все значения были статистически значимыми. То есть, некоторые изученные энзимные показатели (ПНФ, АК и ИМФДГ в плазме крови, ПНФ, АДА и АК в лимфоцитах) имеют многообещающие перспективы в качестве индикатора активности СКВ. Это подтверждается при сравнении средней активности ферментов в подгруппах, выделенных по степени активности СКВ.

У больных СКВ с II степенью активности в плазме (табл. 2) выше активность ПНФ, АК, УДГ, ИМФДГ, ЦДА, ТК, ДОДГ, ниже активность АДА, ГК ($p=0,016$); в лимфоцитах (табл. 3) ниже активность ПНФ, АДА, ГК, ЦДА, ТФ, выше активность АК, ИМФДГ, ТК. У больных СКВ с III степенью активности в плазме (табл. 2) выше активность ПНФ, АК, УДГ, ИМФДГ, ТК, ДОДГ, ЦДА, ниже активность АДА, ТФ, ГК ($p=0,009$); в лимфоцитах (табл. 3) ниже активность ПНФ, АДА, ГК, УДГ, ЦДА, ТФ, выше активность АК, ИМФДГ, ТК.

У больных СКВ с I степенью активности процесса по сравнению с больными с СКВ с II степенью в плазме ниже активность ПНФ, АК, УДГ, ИМФДГ, ТК (для всех $p<0,001$), ЦДА ($p=0,007$), выше активность АДА, ТФ ($p<0,001$); в лимфоцитах ниже активность

АК, ИМФДГ, ТК ($p<0,001$), выше активность ПНФ, АДА, ГК, УДГ, ЦДА, ТФ (для всех $p<0,001$), ДОДГ ($p=0,014$). У больных СКВ с I и II степенью по сравнению с больными СКВ с III степенью в плазме ниже активность ПНФ, АК, УДГ, ИМФДГ, ТК (для всех $p<0,001$), ЦДА ($p=0,007$), ДОДГ ($p=0,041$), выше активность АДА, ТФ ($p<0,001$), ГК ($p=0,004$); в лимфоцитах ниже активность АК, ИМФДГ, ТК ($p<0,001$), выше активность ПНФ, АДА, ГК, УДГ, ЦДА, ТФ, ДОДГ (для всех $p<0,001$).

Таким образом, у больных СКВ прослеживается следующая тенденция. С нарастанием активности патологического процесса в плазме повышается активность ПНФ, АК, УДГ, ИМФДГ, ЦДА, ТК, ДОДГ и снижается активность АДА, ТФ; в лимфоцитах снижается активность ПНФ, АДА, ГК, УДГ, ЦДА, ТФ, ДОДГ, повышается активность АК, ИМФДГ и ТК.

У больных СКВ в плазме крови и лимфоцитах выявлены существенные изменения активности ферментов пуринового и пиримидинового цикла, зависящие от степени активности патологического процесса. Выявленные изменения активности ферментов свидетельствуют о повышенной интенсивности процессов катаболизма. Учитывая, что в патогенезе СКВ иммунные нарушения играют ведущую роль, из всех изученных нами энзимов наибольшее значение придается АДА и ПНФ. Эти ферменты через регуляцию содержания аденозина и гуанозина в клетках тканей оказывают наибольшее влияние на функциональные свойства лимфоцитов, в особенности на их пролиферацию.

Таблица 3

Активность ферментов в лимфоцитах больных СКВ, (M±m)

Фермент	Здоровые, n=30	Больные СКВ, общая группа, n=50	Больные СКВ, I степень активности, n=15	Больные СКВ, II степень активности, n=25	Больные СКВ, III степень активности, n=10
Пуриннуклеозидфосфорилаза (ПНФ)	33,69±0,62	20,84±0,81*	28,2±0,35*	19,71±0,28*	12,66±0,08*
Фленозин дезаминаза (АДА)	43,13±0,44	23,48±1,07*	33,51±0,12*	21,9±0,1*	12,39±0,09*
Аденозинкиназа (АК)	19,16±0,35	34,25±0,7*	27,72±0,11*	35,3±0,11*	41,43±0,06*
Гуанилаткиназа (ГК)	6,72±0,36	5,25±0,09*	5,97±0,11	5,11±0,08*	4,54±0,10*
Урацил/тимидин дегидрогеназа (УДГ)	3,85±0,11	3,88±0,08	4,43±0,08*	3,91±0,07	3,0±0,04*
ИМФ-дегидрогеназа (ИМФДГ)	3,84±0,23	5,58±0,1*	4,92±0,13*	5,63±0,09*	6,41±0,08*
цитидин дезаминаза (ЦДА)	3,55±0,13	3,14±0,07*	3,71±0,05	3,07±0,04*	2,44±0,02*
Тимидинкиназа (ТК)	2,13±0,05	2,9±0,03*	2,66±0,02*	2,93±0,03*	3,15±0,01*
Тимидин фосфорилаза (ТФ)	3,33±0,10	2,98±0,03*	3,17±0,03	2,97±0,02*	2,75±0,04*
дигидрооротат Дегидрогеназа (ДОДГ)	4,31±0,18	4,39±0,06	4,72±0,04	4,38±0,10	3,94±0,03

Примечание. * $p < 0,05$. Непарный критерий Стьюдента.

По результатам наших исследований у больных СКВ (группа в целом, I–III степень активности патологического процесса) активность ПНФ снижена в лимфоцитах, тогда как активность АДА в целом повышена. Такой энзимный дисбаланс влечет за собой накопление в лимфоцитах высоких концентраций аденозина и гуанозина, которые, по данным литературы, оказывают цитотоксический эффект на лимфоциты и вызывают их гибель. Наиболее важным с практической точки зрения является торможение созревания и пролиферации Т-лимфоцитов в G-фазе, а В-лимфоцитов в S-фазе клеточного цикла, подавление супрессорной функции Т-лимфоцитов за счет нарушения биосинтеза РНК и ДНК [19–22]. Спровоцированные энзимным дисбалансом нарушения функции иммунокомпетентных клеток могут вносить существенный вклад в прогрессирование болезни.

Исследования по изучению активности ферментов пуринового метаболизма при ревматических заболеваниях проводились нами и ранее. В частности, при ревматоидном артрите и системной склеродермии были выявлены изменения активности АДА и ПНФ, при этом имела место тесная их корреляция с активностью заболевания [23–26]. В данной работе также обнаружена отчетливая зависимость активности АДА, ПНФ и других ферментов от активности аутоиммунного воспаления. В целом, учитывая высокую частоту использования цитостатических иммунодепрессантов, влияющих на пуриновый и пиримидиновый метаболизм, для окончательной оценки данных маркеров, требуются дополнительные проспективные исследования. Однако уже сейчас можно сделать вывод о целесообразности продолжения поиска новых маркеров активности СКВ и предикторов эффективности и безопасности цитостатических иммунодепрессантов среди ферментов пуринового и пиримидинового метаболизма.

Таким образом, нарушения пуринового и пиримидинового метаболизма, влекущие за собой иммунные расстройства, являются одним из звеньев патогенеза при СКВ. Целенаправленная коррекция метаболических расстройств, направленная на нормализацию концентрации аденозина и гуанозина может сыграть важную роль в лечении больных СКВ. Для решения вопросов патогенетической терапии необходимы дальнейшие дополнительные исследования по изучению содержания пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов и нуклеозидов (аденозина, гуанозина и др.) в плазме, а особенно в лимфоцитах больных СКВ. Если в процессе дальнейших исследований эта гипотеза найдет подтверждение, то представится возможность разработки новых патогенетических подходов к коррекции иммунных нарушений при ревматических болезнях за счет

нормализации активности АДА, ПНФ и, возможно, других энзимов пуринового и пиримидинового цикла.

Литература

1. Насонов Е.Л., ред. *Ревматология: Клинические рекомендации*. М.; ГЭОТАР-Медиа; 2017.
2. Bakshi J., Ismajli M., Rahman A. New therapeutic avenues in SLE. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2015; 29: 794–809.
3. Bengtsson A. A., Rönnblom L. Systemic lupus erythematosus: still a challenge for physicians. *J Intern Med*. 2017; 281: 52–64.
4. Xiao Liu, Haihong Qin, Jinhua Xu. The role of autophagy in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *International Immunopharmacology*. 2016; 40: 351–61.
5. Houssiau F. Thirty years of cyclophosphamide: assessing the evidence. *Lupus*. 2007; 16: 212–6.
6. Firestein G.S., Budd R.C., Gabriel S.E., McInnes I.B., O'Dell J.R., eds. *Kelley & Firestein's Textbook of Rheumatology*. 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017.
7. Guma M., Tiziani S., Firestein G.S. Metabolomics in rheumatic diseases: desperately seeking biomarkers. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016; 12(5): 269–81.
8. Hochberg M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheum*. 1997; 40: 1725.
9. Brunner H.I., Silverman E.D., Bombardier C., Feldman B.M. *European Consensus Lupus Activity Measurement is sensitive to change in disease activity in childhood-onset systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*. 2003; 49(3): 335–41.
10. Карпищенко А.И., ред. *Медицинские лабораторные технологии*. Справочник. СПб; Интермедика; 2002.
11. Friedkin M., De Wayne Roberts. The enzymatic synthesis of Nucleosides. I Thymidine Phosphorylase in mammalian tissue. *J. Biol. Chem*. 1954; 207: 245–55.
12. Friedmann H.C., Vennesland B. Crystalline Dehydroorotic Dehydrogenase. *J. Biol. Chem*. 1960; 235 (5): 1526–32.
13. Koerner J.F. Enzymes of nucleic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem*. 1970; 39: 291–322.
14. Martinek R.G. Micromethod for estimation of serum adenosine deaminase. *Clin. Chem*. 1963; 9 (5): 620–5.
15. Monn E., Christiansen R.O. Guanilate kinase in man – multiple molecular forms. *Hum. Hered*. 1972; 22(1): 18–27.
16. Robertson V.C., Hoffee P.A. Purification and properties of purine nucleoside phosphorylase from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem*. 1973; 248(6): 2040–3.
17. Schelling P., Folkers G., Scapozza L. A spectrophotometric assay for quantitative determination of kcat of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase substrates. *Anal. Biochem*. 2001; 295(1): 82–7.
18. Wang T.P., Sable H.Z., Lampen J.O. Enzymatic deamination of cytosine nucleosides. *J. Biol. Chem*. 1950; 184(1): 17–28.
19. Дьякова М.Е. Особенности пуринового метаболизма у больных туберкулезом легких. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 61(3): 36–41.
20. Погосян Л.Г., Акопян Ж.И. Пуриинуклеозидфосфорилаза. *Биомедицинская химия*. 2013; 59(5): 483–97.
21. Antonioli L, Colucci R, La Motta C, Tuccori M, Awwad O, Da Settimo F et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. *Curr Drug Targets*. 2012; 13: 842–62.

22. Somech R, Lev A, Simon AJ, Hanna S, Etzioni A. T- and B-cell defects in a novel purine nucleoside phosphorylase mutation. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 130(2): 539-42.
23. Мартемьянов В.Ф., Абрамов Н.Б., Бедина С.А., Стажаров М.Ю., Мозговая Е.Э., Зборовский А.Б. Активность энзимов пуринового метаболизма у больных склеродермией. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2010; 1: 34-6.
24. Мартемьянов В.Ф., Стажаров М.Ю., Мозговая Е.Э., Бедина С.А., Евдокимова Е.В. Активность энзимов пуринового метаболизма в лимфоцитах крови больных ревматоидным артритом. *Вестник современной клинической медицины.* 2010; 3(1): 112-3.
25. Мозговая Е.Э., Мартемьянов В.Ф., Стажаров М.Ю., Бедина С.А. Энзимодиагностика активности патологического процесса при ревматоидном артрите. *Врач-аспирант.* 2011; 47(4): 45-50.
26. Zborovskaya I.A., Martemyanov V.F., Zborovsky A.B., Mozgovaya E.E., Stazharov M.Yu., Bedina S.A. Purine nucleoside phosphorylase activity in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 2009; 68(3): 764.
11. Friedkin M., De Wayne Roberts. The enzymatic synthesis of Nucleosides. I Thymidine Phosphorylase in mammalian tissue. *J. Biol. Chem.* 1954; 207: 245-55.
12. Friedmann H.C., Vennessland B. Crystalline Dehydroorotic Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 1960; 235(5): 1526-32.
13. Koerner J.F. Enzymes of nucleic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 1970; 39: 291-322.
14. Martinek R.G. Micromethod for estimation of serum adenosine deaminase. *Clin. Chem.* 1963; 9 (5): 620-5.
15. Monn E., Christiansen R.O. Guanilate kinase in man – multiple molecular forms. *Hum. Hered.* 1972; 22(1): 18-27.
16. Robertson B.C., Hoffee P.A. Purification and properties of purine nucleoside phosphorylase from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 1973; 248(6): 2040-3.
17. Schelling P., Folkers G., Scapozza L. A spectrophotometric assay for quantitative determination of kcat of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase substrates. *Anal. Biochem.* 2001; 295(1): 82-7.
18. Wang T.P., Sable H.Z., Lampen J.O. Enzymatic deamination of cytosine nucleosides. *J. Biol. Chem.* 1950; 184(1): 17-28.
19. Dyakova M.E. Features purine metabolism in patients with pulmonary tuberculosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. Pathological Physiology and Experimental Therapy.* 2016; 60(3): 36–41. (in Russian)
20. Pogosian L.H., Akopian J.I. Purine nucleoside phosphorylase. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2013; 59(5): 483-97. (in Russian)
21. Antonioli L, Colucci R, La Motta C, Tuccori M, Awwad O, Da Settimo F et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. *Curr Drug Targets.* 2012; 13: 842-62.

References

1. Nasonov E.L., ed. *Rheumatology: Clinical recommendations.* [Revmatologiya: Klinicheskie rekomendatsii]. Moscow; GJeOTAR-Media; 2017. (in Russian)
2. Bakshi J., Ismajli M., Rahman A. New therapeutic avenues in SLE. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* 2015; 29: 794-809.
3. Bengtsson A. A., Rönblom L. Systemic lupus erythematosus: still a challenge for physicians. *J. Intern Med.* 2017; 281: 52-64.
4. Xiao Liu, Haihong Qin, Jinhua Xu. The role of autophagy in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *International Immunopharmacology.* 2016; 40: 351-61.
5. Houssiau F. Thirty years of cyclophosphamide: assessing the evidence. *Lupus.* 2007; 16: 212-6.
6. Firestein G.S., Budd R.C., Gabriel S.E., McInnes I.B., O'Dell J.R., eds. *Kelley & Firestein's Textbook of Rheumatology.* 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017.
7. Guma M., Tiziani S., Firestein G.S. Metabolomics in rheumatic diseases: desperately seeking biomarkers. *Nature Reviews Rheumatology.* 2016; 12(5): 269–81.
8. Hochberg M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheum.* 1997; 40: 1725.
9. Brunner H.I., Silverman E.D., Bombardier C., Feldman B.M. European Consensus Lupus Activity Measurement is sensitive to change in disease activity in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003; 49(3): 335-41.
10. Karpishhenko A.I., ed. *Medical laboratory technologies.* Directory. [Meditsinskie laboratornye tekhnologii]. Spravochnik. Sankt-Peterburg: Intermedika; 2002. (in Russian)

Сведения об авторах:

Бедина Светлана Александровна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. клинико-биохимической лаб., ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского»;

Трофименко Андрей Степанович, зав. клинико-биохимической лаб., ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского»; ассистент каф. госпитальной терапии, ВПТ с курсом клинической ревматологии ФУВ, ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, канд. мед. наук;

Мозговая Елена Эдуардовна, вед. науч. сотр. клинико-биохимической лаб., ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», канд. мед. наук;

Зборовская Ирина Александровна, директор института, ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского»; каф. госпитальной терапии, ВПТ с курсом клинической ревматологии ФУВ, ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, доктор мед. наук, проф.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.36-004.4

Иванов А.С.¹, Тарасенко Е.В.¹, Гармаш И.В.¹, Мяндина Г.И.¹, Аришева О.С.¹, Желудова Е.М.¹,
Азова М.М.¹, Терещина Н.Н.², Баронец В.Ю.², Кобалава Ж.Д.¹

Влияние маркеров эндотелиальной дисфункции, цитокинового статуса, гена коллагена COL1A1_1 на развитие фиброза печени у пациентов, злоупотребляющих алкоголем

¹Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,

117198, г. Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России,

119034, г. Москва, Россия, Кропоткинский пер., д. 23

Фиброз печени и его конечная стадия – цирроз являются одной из причин летальных исходов при хронических заболеваниях печени. Алкоголь и его метаболиты вызывают накопление внеклеточного коллагена, приводящего к фиброзу, вследствие цитокинового дисбаланса, процессов фиброгенеза и фибролиза. **Цель.** Изучить иммуновоспалительные факторы, ассоциации полиморфизма гена коллагена I типа COL1A1_1 C/A (rs1107946) с развитием фиброза печени у пациентов, злоупотребляющих алкоголем. **Методика.** Генотипировано 46 пациентов с фиброзом печени, злоупотребляющих алкоголем (срок употребления алкоголя 15,6±9,5 лет). Группы сформированы в зависимости от стадии фиброза печени, определенного методом непрямого эластометрии: 1-я — F0+1 (n=20), 2-я — F3+4 (n=36). Критерии исключения: острый алкогольный гепатит, хронические заболевания печени неалкогольного генеза, общие воспалительные и аутоиммунные процессы. У всех больных определяли концентрации интерлейкина (ИЛ)-6, ИЛ-8, ФНО-альфа, VEGF-A, s-ICAM-1, ET-1. Полиморфизм гена COL1A1_1 определяли методом Real-Time PCR. В качестве контрольной группы полиморфизма гена коллагена были обследованы 30 здоровых мужчин и женщин. **Результаты.** Уровни ИЛ-6, ИЛ-8, s-ICAM-1, ET-1 зависели от степени алкогольного фиброза печени: во 2-й группе они были выше, чем в 1-й (p<0,05). Плотность печени статически значимо (p<0,05) коррелировала с уровнем ИЛ-6 (r=0,6), ИЛ-8 (r=0,77), s-ICAM-1 (r=0,58), ET-1 (r=0,56). Статически значимых различий уровней ФНО-альфа и VEGF-A между группами не выявлено (p>0,05). У больных с фиброзом печени, страдающих алкогольной зависимостью, частота встречаемости аллеля А статически значимо выше, чем в контрольной группе (38,3% против 12,5%, $\chi^2 = 7,6212$; p=0,005768). Частота гетерозигот СА существенно не отличается в группе больных и контрольной группе (38% и 25% соответственно, p=0,4425). Гомозиготы АА были выявлены только в группе больных с фиброзом печени, частота встречаемости составила 19,1%. **Заключение.** Выявлена прямая корреляционная связь между уровнем цитокинов (ИЛ-8, ИЛ-6), молекул эндотелиальной дисфункции (ЕТ1, sICAM-1) с уровнем фиброза печени. Наличие аллеля А гена COL1A1_1 может являться одним из генетических факторов развития фиброза печени у больных, злоупотребляющих алкоголем.

Ключевые слова: фиброз печени, эндотелиальная дисфункция, цитокины, коллаген, полиморфизмы, генетические маркеры.

Для цитирования: Иванов А.С., Тарасенко Е.В., Гармаш И.В., Мяндина Г.И., Аришева О.С., Желудова Е.М., Азова М.М., Терещина Н.Н., Баронец В.Ю., Кобалава Ж.Д. Влияние маркеров эндотелиальной дисфункции, цитокинового статуса, гена коллагена COL1A1_1 на развитие фиброза печени у пациентов, злоупотребляющих алкоголем. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 55-63.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.55-63

Для корреспонденции: Иванов Александр Сергеевич, аспирант Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН, каф. внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. Моисеева В.С., e-mail: aleks_iv90@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.05.2018

Ivanov A.S.¹, Tarasenko E.V.¹, Garmasch I.V.¹, Myandina G.I.¹, Arisheva O.S.¹, Zheludova E.M.¹, Azova M.M.¹, Tereshina N.N.², Baronets V.Yu.², Kobalava Zh.D.¹

Markers of endothelial dysfunction, cytokine status, collagen COL1A1_1 gene on the development of liver fibrosis in in alcohol abusers

¹ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),

Moscow, Russia;

²The Federal State Budgetary Institution "V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology" of the Ministry of Health of Russian Federation

Liver fibrosis and its final stage – cirrhosis is one of the causes of deaths in chronic liver diseases. Alcohol and its metabolites mediate the accumulation of extracellular collagen, leading to fibrosis mediated by cytokine imbalances, processes of fibrogenesis and fibrolysis.

The purpose. To investigate the immune-inflammatory factors and association between the *COL1A1_1* C/A (rs1107946) polymorphism and liver fibrosis in patients abusing alcohol.

Methods. 46 patients were genotyped (the period of alcohol consumption was 15.6±9.5 years) with liver fibrosis, alcohol abusers. They were divided into 2 groups depending on the stage of liver fibrosis: 1- F0+1, n=10; 2- F3+4, n=36. Exclusion criteria were chronic non-alcoholic liver disease, acute alcoholic hepatitis, general inflammatory and autoimmune diseases. We analyzed serum concentrations of interleukin (IL)-6, IL-8, TNF- α , VEGF-A, s-ICAM-1, ET-1 and polymorphism of the *COL1A1_1* gene was determined using the Real-Time PCR analysis. The stage of liver fibrosis was identified with the elastography method (FibroScan, Echosens, France). **Results.** The levels of IL-6, IL-8, s-ICAM-1, ET-1 depended on the degree of alcoholic liver fibrosis. The liver fibrosis was significantly correlated with the level of IL-6 ($r = 0.6$), IL-8 ($r = 0.77$), s-ICAM-1 ($r = 0.58$), ET-1 ($r = 0.56$) ($p < 0.05$). There were no significant differences in the levels of TNF-alpha and VEGF-A between two groups ($p > 0.05$). It was found that the frequency of allele A among patients was 38.3% which is significantly higher than in the control group (12.5%; $p = 0.005768$). The frequency of heterozygotes CA was not significantly different between the group of patients and the control group (38% and 25% respectively, $p = 0.4425$). Homozygous AA genotypes were revealed only in patients with liver fibrosis, the frequency was 19.1%. **Conclusion.** A positive correlation between the level of cytokines (IL-8, IL-6), endothelial dysfunction molecules (ET1, sICAM-1) and the level of liver fibrosis was revealed. The presence of allele A of the *COL1A1_1* gene may be one of the genetic factors involved in the development of liver fibrosis in patients abusing alcohol.

Keywords: liver fibrosis, collagen, cytokines, endothelial dysfunction polymorphisms, genetic markers.

For citation: Ivanov A.S., Tarasenko E.V., Garmash I.V., Myandina G.I., Arisheva O.S., Zheludova E.M., Azova M.M., Terebilina N.N., Baronets V.Yu., Kobalava Zh.D. Markers of endothelial dysfunction, cytokine status, collagen COL1A1_1 gene on the development of liver fibrosis in alcohol abusers. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 55-63. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.55-63

For correspondence: Alexander S. Ivanov, a graduate student of the Medical Institute of the FSUE of VO "Russian University of Peoples Friendship" of the Department of Internal Diseases with a course in cardiology and functional diagnostics named after academician V. Moiseev e-mail: aleks_iv90@mail.ru, telephone 89629937685

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Information about authors.

Ivanov A.S., <https://orcid.org/0000-0001-6850-0800>

Tarasenko E.V., <https://orcid.org/0000-0002-0665-9741>

Garmash I.V., <https://orcid.org/0000-0002-2950-3563>

Myandina G.I., <https://orcid.org/0000-0002-7613-326X>

Arisheva O.S., <https://orcid.org/0000-0002-2964-0568>

Zheludova E.M., <https://orcid.org/0000-0001-6208-5802>

Azova M.M., <https://orcid.org/0000-0002-7290-1196>

Terebilina N.N., <https://orcid.org/0000-0002-5356-0728>

Baronets V.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-9715-4473>

Kobalava Zh.D., <https://orcid.org/0000-0002-5873-1768>

Received 18. 05.2019

Введение

Фиброз печени и его конечная стадия – цирроз являются одной из основных причин летальных исходов при хронических заболеваниях печени [1–4]. Основными причинами фиброза печени являются вирусные гепатиты В, С, D и злоупотребление алкоголем. Также к формированию фиброза приводят аутоиммунные заболевания печени, болезнь Вильсона-Коновалова, гемохроматоз, лекарственные поражения печени.

Употребление гепатотоксичных доз этанола (40–80 г/сут) в течение 10–12 лет приводит к развитию алкогольной болезни печени (АБП) [5]. Алкоголь и его метаболиты опосредуют накопление внеклеточного коллагена, приводящего к фиброзу, опосредованных

цитокиновым дисбалансом, процессами фиброгенеза и фибролиза.

К основным провоспалительным цитокинам, опосредующим экспрессию белков острой фазы макрофагами и гепатоцитами, инфильтрацию печени нейтрофилами, относят интерлейкин 6 (IL-6), интерлейкин 8 (IL-8) и фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) [6–9].

Перестройка ткани печени в процессе воспаления и фиброза сопровождается портальной гипертензией, в основе которой лежит внутри- и внепеченочная дисфункция эндотелия [10]. Молекулы межклеточной адгезии (sICAM-1), эндотелин-1 (ET-1), васкуло-эндотелиальный фактор роста – А (VEGF-A) участвуют в

изменении внутрипеченочной микроциркуляции, ангиогенезе при гипоксии и воспалении, и являются маркерами повреждения эндотелия [11, 12].

В формировании и прогрессировании фиброза, также, важную роль играют и генетические факторы. Изучены полиморфизмы генов, кодирующих алкогольдегидрогеназу, альдегиддегидрогеназу [13], а также кодирующие воспалительные медиаторы, такие как TNF α , IL1 β , IL10, липополисахаридный рецептор CD14 и многие другие [14–17]. Кроме того, важную роль в формировании фиброза играют гены, контролирующие процессы гепатоцеллюлярного апоптоза и некроза (Bcl-xL, Fas) [5]. При формировании фиброза печени происходит значительное увеличение экстрацеллюлярного матрикса, в состав которого входит несколько типов молекул коллагена, структурные гликопротеины, гликозаминогликаны и гиалуронан. Кроме того, при формировании фиброза происходят изменения ультраструктуры коллагенов. Мутации, приводящие к нарушению структуры волокон коллагена, могут приводить к серьезным функциональным дефектам соединительной ткани и формированию фиброза печени [18].

Наиболее распространенным структурным компонентом различных тканей является коллаген 1-го типа. В печени найдено более 10 типов коллагена, в том числе 1-го, 3-го и 4-го типов, входящих в состав фибрилл. Коллаген печени участвует в формировании базальных мембран клеток, фиброзных септ и провоцирует перисиносуидальный фиброз. Молекула коллагена 1-го типа состоит из 3 полипептидных цепей, ее молекулярный вес составляет 290 кД. Цепи молекулы (две идентичных $\alpha 1$ и одна $\alpha 2$), отличаются по составу аминокислот. Тяжесть заболевания усиливается, когда мутации затрагивают ген *COL1A1*, кодирующий белок $\alpha 1$ -цепи коллагена I типа. Расположен он в хромосоме 17q21.33, содержит 51 экзон и состоит из 38 тыс п.н. Мутация представляет собой однонуклеотидную замену цитозина на аденин – C\A (*rs1107946*) [18].

Цель исследования – выявление иммунно-воспалительных факторов, участвующих в развитии фиброза печени у пациентов, злоупотребляющих алкоголем и изучение корреляции полиморфизма гена *COL1A1* C/A (*rs1107946*) при фиброзе печени (F0-F4) пациентов, имеющих алкогольную зависимость.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех па-

циентов. Работа одобрена этическим комитетом РУДН. В исследовании принимали участие 46 человек, из них 35 (76,6%) мужчин, злоупотребляющих алкоголем (срок употребления алкоголя 15,6 \pm 9,6 лет) с алкогольной болезнью печени, проходивших лечение в 64-й ГКБ г. Москвы или наблюдающихся амбулаторно в наркологическом диспансере № 6 Московского научно-практического центра наркологии г. Москвы (НД № 6 ГКУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ»). Алкогольный генез подтверждался фактом признания злоупотребления алкоголем самим пациентом и/или его родственниками, позитивными ответами на опросники CAGE и AUDIT, клиническими и лабораторными признаками хронической алкогольной интоксикации (ХАИ) [23, 24]. Из исследования исключали пациентов с серопозитивной реакцией на антитела к вирусам гепатита, страдающих хроническими заболеваниями печени не-алкогольной этиологии, а также с острым алкогольным гепатитом, наличием отечно-асцитического синдрома с более чем 5-кратным повышением уровня трансаминаз [25].

Степень фиброза печени (F) определяли методом непрямой эластометрии с помощью аппарата «Фиброскан» (FibroScan) (Франция). Стадия F0 ставилась при показателе плотности печени до 5,8 кПа, F1 – от 5,9 до 7,2 кПа, F2 – от 7,3 до 9,5 кПа, F3 – от 9,6 до 12,5 кПа, F4 (цирроз) – более 12,5 кПа [25].

Все пациенты, злоупотребляющие алкоголем, были разделены на группы в зависимости от степени фиброза печени: группа I – пациенты с низкой степенью фиброза печени (F0+F1), группу II составили пациенты с выраженной степенью фиброза печени (F3+F4). Больных со 2-й степенью фиброза выявлено не было. Группы были сопоставимы по возрасту, полу, индексу массы тела (ИМТ) и алкогольному анамнезу. Основные клинико-демографические показатели исследуемых групп представлены в табл. 1.

Через 7 сут после поступления в стационар на фоне гарантированной абстиненции (воздержания от употребления алкоголя) определяли содержание маркеров эндотелиальной дисфункции (ЭД) и цитокинов с использованием коммерческих ИФА наборов в лаборатории биохимии Национального научного центра наркологии – филиала ФГБУ НИИЦ ПН МЗ РФ им В.П. Сербского». Содержание IL-6, VEGF-A, s-ICAM-1, TNF- α в сыворотке крови определяли с использованием коммерческих ИФА-наборов фирмы Bender MedSystems (Австрия). ИЛ-8 – с помощью ИФА-набора фирмы Invitrogen (США). Эндотелин 1-21 определяли ИФА-набором фирмы Biomedica (Австрия). Из цельной крови выделяли тотальную ДНК на колонках с помощью набора реагентов «К-Сорб» (#EX-514, Син-

тол, Россия). В качестве референсных значений использовали концентрации маркеров 15 здоровых доноров, согласно методическим рекомендациям руководства соответствующих наборов. В качестве контрольной группы исследования полиморфизма гена коллагена были обследованы 30 здоровых мужчин и женщин без фиброза печени. Для генотипирования проводили выделение геномной ДНК из цельной крови. Кровь собирали в пробирки с EDTA и хранили при температуре -20 °С. ДНК выделяли из лейкоцитов крови наборами «ДНК-Экстран-1» производства ООО «Синтол». Полиморфизм гена COL1A1_1 определяли методом Real-Time PCR на амплификаторе CFX-96, BioRad.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica (версия 8.0 для Windows) и R-language с применением стандартных алгоритмов вариационной статистики в зависимости от характера распределения данных. С учетом малого размера выборки и проведенных тестов (критерии Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка, ящичная гистограмма), распределение большинства показателей не было ненормальным. Оценка статистической значимости различий между группами осуществлялась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ был осуществлен с использованием статистики Спирмена. Для сравнения частот аллелей и генотипов исследуемых признаков использовали таблицы сопряженности и критерий хи- квадрат (χ^2) с поправкой Йейтса при ожи-

даемых частотах более 10 и точный критерий Фишера при ожидаемых частотах менее 10. Статистически значимыми считались результаты при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Низкая степень фиброза (F0+F1) была выявлена у 10 (21,7%) пациентов (нулевая у 7 (15,2%), 1-я – у 3 (6,5%), 2-я степень не встречалась), высокая степень фиброза (F3+F4) у 36 (80,9%) пациентов, в том числе 3-я у 2 (4,3%) и 4-я у 34 (76,6%) пациентов. Сравнительная характеристика сформированных групп представлена в табл. 2.

Статистически значимые отличия выявлены в группе с высокой степенью фиброза печени, в которой отмечалось повышение степени фиброза печени (60,5 [15,4;75] кПа), уровня С-РБ, ГГТП, общего билирубина, увеличение размера воротной вены и снижение уровня ХЭ, альбумина, гемоглобина, ПИ по сравнению с показателями группы с низкой степенью фиброза. Во всех группах наблюдалась сохранность функции почек (табл. 2). В группе тяжелого фиброза печени было зарегистрировано 3 летальных исхода.

Уровни цитокинов и маркеров эндотелиальной дисфункции у пациентов, злоупотребляющих алкоголем. Во всех группах пациентов с АБП концентрация интерлейкинов 6 и 8 (IL-6 и IL-8) была выше референсных значений. В группе с выраженной стадией фиброза печени уровень IL-6 и IL-8 был статистически зна-

Таблица 1

Сравнительная характеристика пациентов, включенных в исследование (n=46)

Показатель	Группа I (n=10)	Группа II (n=36)
	Низкая степень фиброза печени (F0+1)	Высокая степень фиброза печени (F3+4)
Степень фиброза (F), %		
0	7 (70,0)	0
1	3 (30,0)	0
2	0	0
3	0	2 (5,6)
4	0	34 (94,4)
Плотность печени, кПа	4,45 [3,05;5,5]	60,5 [15,4;75]*
Возраст, годы	48,9±13,4	51,3±11,1
Пол М/Ж, n (%)	7 (70,0)/3(30,0)	28 (77,8)/8(22,2)
ИМТ, кг/м ²	31,1±7,9	26,1±4,4
Срок употребления алкоголя (годы)	18,5±9,4	15,5±9,6
Число положительных ответов по тесту CAGE	3,2±0,7	3,5±0,5
Число положительных ответов по тесту AUDIT	20,8±5,7	22,6±4,0

Примечание. Здесь и далее данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (LQ-UQ); * – $p < 0,01$ между группами I и II; сравнительную характеристику рассчитывали по U-критерию Манна-Уитни.

чимо выше по сравнению с 1-й группой. Выявлена прямая корреляция между уровнем интерлейкинов и плотностью печени по данным эластометрии. Уровень TNF- α был выше референсных значений в обеих группах, при этом между группами статистически значимых различий выявлено не было. Не было выявлено ассоциаций между концентрацией TNF- α и плотностью печени (табл. 3).

Уровень васкуло-эндотелиального фактора роста-A и концентрация молекул межклеточной адгезии были выше референсных значений в группах, злоупотребляющих алкоголем. Концентрация s-ICAM-1 была статистически значимо выше у больных с выраженной стадией фиброза печени, по сравнению с группой F0+1, при этом выявлена прямая корреляция между плотностью печени и концентрацией s-ICAM-1. Уровень ET-1 был повышен только в группе выраженного фиброза, в то же время его концентрация ассоциировалась с плотностью печени (табл. 3).

Генетические детерминанты фиброгенеза. Проведен анализ частот встречаемости аллелей A и C, а также

генотипов CC, C/A и AA гена *COL1A1_1* у больных с фиброзом печени, страдающих алкогольной зависимостью. Согласно данным генетического анализа, частота встречаемости аллеля A в группе фиброза печени статистически значимо выше, чем в контрольной группе и составляет 38,3% ($\chi^2 = 7,6212$; $p = 0,005768$). Частота встречаемости аллеля A в контрольной группе составила 12,5%. Частота гетерозигот A значимо не различались в экспериментальной и контрольной группах и составляет 38% и 25% соответственно. Гомозиготы AA были выявлены только в группе больных с фиброзом печени (табл. 4).

Таким образом, уровень всех исследуемых цитокинов и маркеров эндотелиальной дисфункции у лиц, злоупотребляющих алкоголем повышался. Однако, при тяжелом фиброзе печени ($\geq F3$) статистически значимо повышались только уровни IL-6, IL-8, s-ICAM-1 и ET-1.

По данным литературы наличие алкогольной болезни печени сопровождается изменением цитокинового профиля за счет нарастания концентраций IL-6,

Таблица 2

Сравнительная характеристика и лабораторные показатели пациентов, включенных в исследование (n=46)

Показатели	Группы пациентов	
	I. (F0+1) (n=10)	II. (F3+4) (n=36)
Гемоглобин, г/л (N 120-160)	145,0 [122;160]	110,0 [94;128,5]*
Лейкоциты, тыс/мкл (N 4-9)	7,8 [7,2;8,7]	6,9 [5,2;8,7]
Тромбоциты, тыс/мкл (N 180-400)	188,0 [134;334]	168,0 [139;253]
СОЭ, мм/час (N<15)	15,0 [12;35]	34,5 [10;49]
С-РБ мг/л (N 0-5)	2,1 [2;2,1]	13,4 [9,4;46]**
АЛТ, Ед/л (N 0-50)	31,2 [18;74]	30,4 [17,1;58,8]
АСТ, Ед/л (0-50)	39,0 [22,5;58,1]	71,1 [39,6;152,5]
ГГТП, Ед/л (N 0-55)	57,0 [39;105]	274,0 [104;409]*
Билирубин общий, мкмоль/л (N 3-21)	11,2 [9,1;23,4]	51,0 [15,4;162,4]**
ЩФ, Е/л (N 30-120)	89,0 [50,5;372,5]	165,0 [1123;203]
Общий белок, г/л (N 66-83)	75,0 [57,9;77,1]	68,3 [58,4;75]
Альбумин, г/л (N 35-52)	38,9 [38,4;40]	24,4 [22,2;32,3]*
Холестерин, ммоль/л (N 4,5-5,5)	4,6 [3,1;5,04]	3,9 [2,96;4,95]
Холинэстераза, Ед/л (N 3,93-11,5)	5,5 [4,1;6,1]	2,35 [1,95;3,45]**
ПИ, % (N 70-140)	92,5 [77;100]	58,0 [38,5;77,5]**
Креатинин, мкмоль/л (N 59-104)	84,5 [77;107]	77,0 [60;103]
Воротная вена, мм (N< 12 мм)	11,0 [11;12]	13,0 [12;14]*
Асцит, п %	0	26 (72,2)

Примечание. Здесь и далее данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (LQ-UQ); * — $p < 0,01$; ** — $p < 0,05$ между группами I и II; сравнительная характеристика посчитана по U-критерию Манна-Уитни.

Таблица 3

Цитокины и маркеры ЭД у лиц, злоупотребляющих алкоголем

Показатели	Группы пациентов			r, p<0,05
	Референсные значения	I (F0+1) (n=10)	II (F3+4) (n=36)	
IL-6, пг/мл	0,5±0,2	2,38 [1,2;2,84]	13,0 [3,1;26] #	0,6
IL-8, пг/мл	0,4±0,3	1,6 [0,0;5,9]	30,7 [12,4;80,5] #	0,77
TNF-α, пг/мл	0,1±0,057	0,22 [0,22;0,24]	0,27 [0,22;0,29]	-
VEGF-A, пг/мл	273,6±38	746,8 [354,2;1827,2]	996,4 [428,6;1572,4]	-
s-ICAM, нг/мл	311±27	469,0 [288;645]	1120,0 [621;1569] #	0,58
ET-1, фмоль/мл	1,16±0,15	0,0 [0;0,2]	1,45 [0,5;2,8] #	0,56

Примечание. Здесь и далее данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (LQ-UQ); # – p<0,05; между группами I и II; сравнительная характеристика посчитана по U-критерию Манна-Уитни; r – коэффициент корреляции Спирмана исследуемых параметров с плотностью печени по данным непрямой эластометрии.

IL-8 и TNF-α [19] и увеличение уровней IL-6 и IL-8 по мере прогрессирования заболевания печени [27]. Кроме того, у лиц, злоупотреблявших алкоголем, наиболее высокие концентрации IL-8 наблюдались при остром алкогольном гепатите, в то время как при циррозе печени чаще отмечалось умеренное повышение [20, 28], в другом исследовании IL-8 повышался только по сравнению со здоровыми добровольцами и не имел существенных изменений при прогрессировании заболевания [27]. В данном исследовании IL-6 и IL-8 повышались на фоне злоупотребления алкоголем и значимо увеличивались при прогрессировании фиброза.

При алкогольной болезни печени выявлено повышение уровня TNF-α в сыворотке крови [29]. Известно, что TNF-α способствует прогрессированию фиброза печени за счет активации других цитокинов, маркеров повреждения сосудов, апоптической активности, повышаясь при циррозе печени по сравнению со здоровыми людьми [19]. Наблюдается обратная корреляция с тяжестью заболевания печени при острой декомпенсации печеночной функции [30]. По нашим

данным повышение концентрации TNF-α наблюдалась у лиц, злоупотреблявших алкоголем, по сравнению с референсными значениями и не зависели от тяжести фиброза печени.

Маркеры эндотелиальной дисфункции изучены в меньшей степени, чем цитокины. В ранних исследованиях отмечалось повышение уровня s-ICAM-1 при длительном употреблении алкоголя [31], циррозе печени и остром алкогольном гепатите [32]. По нашим данным у лиц, злоупотребляющих алкоголем, наблюдалось повышение s-ICAM-1 выше референсных значений, при этом статистически значимое повышение отмечалось только при тяжелом фиброзе печени (≥F3). VEGF-A ассоциируется с развитием портальной гипертензии и изменениями микроциркуляции на фоне гипоксии и прогрессировании ЦП. Повышение концентрации VEGF-A наблюдалось у лиц на фоне злоупотребления алкоголем на различных стадиях поражения печени [33, 34]. По нашим данным концентрация молекул VEGF-A повышалась на фоне злоупотребления алкоголем, но не зависела от стадии фиброза печени.

Менее изученной является молекула ET-1. Известно, что концентрация ET-1 повышается при алкогольной болезни печени и коррелирует с прогрессированием фиброза и портальной гипертензией [11]. Наши данные показывают повышение уровней ET-1 только при тяжелом фиброзе печени и наличии прямой корреляции с плотностью печени.

Нами выявлена прямая корреляция маркеров воспаления (IL-6, IL-8) и маркеров эндотелиальной дисфункции (s-ICAM, ET-1) с плотностью печени, что соответствует данным других исследований [11, 19, 28, 35], что отражает роль процессов воспаления в фиброгенезе.

Таблица 4

Частоты аллелей и генотипов гена COL1A1_1 C/A (rs1107946) в исследованных выборках

Частоты генов и генотипов	Фиброз	Контроль (%)
A	38,3%	12,5%
C/C	40%	75%
C/A	38%	25%
A/A	19,1%	0%

Нами выявлены статистически значимые ассоциации между носительством аллеля А и гомозиготы АА с тяжестью фиброза печени. Аллель А, встречался значительно чаще в группе фиброза печени по сравнению с контролем (38,3 % и 12,5% соответственно), а гомозиготы АА были выявлены только в группе фиброза и не встречались в контрольной группе. Таким образом, можно предположить, что носительство аллеля А гена *COL1A1_1*, особенно в гомозиготном состоянии, может являться одним из генетических факторов развития фиброза печени у больных, злоупотребляющих алкоголем. Эти результаты соотносятся с данными литературы о накоплении коллагена I типа в ткани печени [18].

Таким образом, у лиц алкогольной болезнью печени отмечается повышение маркеров иммунно-воспалительных реакций и эндотелиальной дисфункции, особенно на выраженной стадии фиброза печени. Прогрессирование фиброза печени сопровождается изменением интерлейкинового профиля и маркеров эндотелиальной дисфункции, находящихся в прямой связи с плотностью ткани печени. Выявлена прямая корреляционная связь между уровнем цитокинов (IL-8, IL-6), молекул эндотелиальной дисфункции (ET-1, s-ICAM-1) с уровнем фиброза печени. Носительство аллеля А гена *COL1A1_1*, особенно в гомозиготном состоянии, может являться одним из генетических факторов развития фиброза печени у больных, злоупотребляющих алкоголем.

Литература

- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115: 209–18.
- Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 7312–24.
- Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct*. 2003; 28: 105–12.
- Мусин А.Г., Муталова Э.Г., Нигматуллина А.Э. и др. Современные аспекты механизмов фиброгенеза в печени. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2014; 9(3): 95–9.
- Rehm J, Taylor B, Mohapatra S et al. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Rev*. 2010; 29(4): 437–45.
- Rachakonda V, Gabbert C, Raina A et al. Stratification of risk of death in severe acute alcoholic hepatitis using a panel of adipokines and cytokines. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2014; 38(11): 2712–21.
- Nicolaou C, Chatzipanagiotou S, Tzivosa D. Serum cytokine concentrations in alcohol-dependent individuals without liver disease. *Alcohol*. 2004; 32: 243–7.
- Fujimoto M, Uemura M, Nakatani Y et al. Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance. *Alcohol, clinical and experimental research*. 2000; 24(4): 48–54.
- Swiatkowska-Stodulska R, Bakowska A, Drobińska-Jurowiecka A. Interleukin-8 in the blood serum of patients with alcoholic liver disease. *Med Sci Monit*. 2006; 12(5): 215–20.
- Bosch J, Abraldes JG, Fernández M et al. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol*. 2010; 53: 558–67.
- Alam I, Bass NM, Bacchetti P et al. Hepatic tissue endothelin-1 levels in chronic liver disease correlate with disease severity and ascites. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95(1): 199–203.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of Biochemistry*. 2013; 153(1): 13–9.
- Огурцов П.П., Поликарпова Т.С., Гармаш И.В., Аришева О.С. и др. Биологические факторы риска развития алкогольной зависимости и алкогольного цирроза печени. *Вестник РУДН Серия «Медицина»*. 2012; 3: 26–30.
- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med*. 2006; 10: 76–99.
- De Minicis S et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology*. 2007; 132: 1937–46.
- Nieto N. Oxidative stress and IL6 mediate the fibrogenic effects of rodent Kupffer cells in stellate cells. *Hepatology*. 2006; 44: 1487–501.
- Gressner O, Yagmur E, Lahme B et al. Differential effects of TGF beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J Hepatol*. 2007; 47: 699–710.
- Горбунова В.Н., Кадурина Т.И. Коллагены и коллагеновые гены. *Медицинская генетика*. 2006; 5 (6): 3–10.
- Nagy LE. The Role of Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Reserch*. 2015; 37(2): 237–50.
- Kawaratan H, Tsujimoto T, Douhara A et al. The Effect of Inflammatory Cytokines in Alcoholic Liver Disease. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013: 495156.
- Райт А, Бростоф Дж, Мейл Д. *Иммунология*. Перевод с англ. Москва. 2000: 168–194.
- Dashwood MR, Loesch A. Endothelin-1 as a neuropeptide: neurotransmitter or neurovascular effects? *J Cell Commun Signal*. 2009; 4: 51–62.
- Гармаш И.В. Алкогольная болезнь печени. В кн. Моисеев В.С. Алкогольная болезнь. *Поражение внутренних органов*. М.; ГЭОТАР-Медиа; 104–15.
- EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease. *Journal of Hepatology*. 2012; 57: 399–420.
- Ledinghen V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroentérol Clin Bio*. 2008; 32: 58–67.
- Pavlov CS. Transient elastography for diagnosis of stages of hepatic fibrosis and cirrhosis in people with alcoholic liver disease. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2017; 43 (1): 150.
- Балашова А.А., Аришева О.С., Гармаш И.В. и др. Цитокины и алкогольная болезнь печени. *Клиническая фармакология и терапия*. 2017; 26 (1): 41–6.
- Crews FT, Bechara R, Brown LA et al. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30: 720–30.
- McClain CJ, Barve S, Deaciuc I. Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998; 22(5): 248–52.

30. Dirchwolf M, Podhorzer A, Marino M. Immune dysfunction in cirrhosis: Distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity. *Cytokine*. 2016; 77: 14–25.
31. Sacanella E, Estruch R. The effect of alcohol consumption on endothelial adhesion molecule expression. *Addict Biol*. 2003; 8(4): 371–8.
32. Rizk NM, Derbala MF. Genetic polymorphisms of ICAM 1 and IL28 as predictors of liver fibrosis severity and viral clearance in hepatitis C genotype 4. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013; 37 (3): 262–8.
33. Bosio D, Salvi V, Gagliostro V, Sozzani S. Angiogenic and antiangiogenic chemokines. *Chem Immunol Allergy*. 2014; 99: 89–104.
34. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis*. 2010; 30: 258–70.
35. Mándi Y, Nagy I, Krenács L. Relevance of ICAM-1 to alcoholic liver cirrhosis. *Pathobiology*. 1996; 64(1): 46–52.
14. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med*. 2006; 10: 76–99.
15. De Minicis S et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology*. 2007; 132: 1937–46.
16. Nieto N. Oxidativestress and IL6 mediate the fibrogenic effects of rodent Kupffer cells in stellate cells. *Hepatology*. 2006; 44: 487–501.
17. Gressner O, Yagmur E, Lahme B et al. Differential effects of TGF beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J Hepatol*. 2007; 47: 699–710.
18. Gorbunova V.N., Kadurina T.I. Collagens and collagen genes. *Medit-sinskaya genetika*. 2006; 5(6): 3–10. (in Russian)
19. Nagy LE. The Role of Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Reserch*. 2015; 37(2): 237–50.
20. Kawaratan H, Tsujimoto T, Douhara A et al. The Effect of Inflammatory Cytokines in Alcoholic Liver Disease. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013: 495156
21. Rait A, Brostoff J, Mail D. *Immunology. Translation from English. Moscow*. 2000: 168–194. (in Russian)
22. Dashwood MR, Loesch A. Endothelin-1 as a neuropeptide: neurotransmitter or neurovascular effects? *J Cell Commun Signal*. 2009; 4: 51–62.
23. Garmash IV. Alcoholic liver disease In: Moiseev VS. *Alkohol'naya bolezni'. Porazhenie vnutrennih organov*. Moscow, GEHOTAR-Media; 104–15. (in Russian)
24. EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease. *Journal of Hepatology*. 2012; 57: 399–420.
25. Ledinghen V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroentérol Clin Bio*. 2008; 32: 58–67.
26. Pavlov CS. Transient elastography for diagnosis of stages of hepatic fibrosis and cirrhosis in people with alcoholic liver disease. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2017; 43(1): 150.
27. Balashova AA, Arisheva OS, Garmash IV et al. Cytokines and alcoholic liver disease. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 2017; 26(1): 41–6 (in Russian)
28. Crews FT, Bechara R, Brown LA et al. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30: 720–30.
29. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I. Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998; 22(5): 248–52.
30. Dirchwolf M, Podhorzer A, Marino M. Immune dysfunction in cirrhosis: Distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity. *Cytokine*. 2016; 77: 14–25.
31. Sacanella E, Estruch R. The effect of alcohol consumption on endothelial adhesion molecule expression. *Addict Biol*. 2003; 8(4): 371–8.
32. Rizk NM, Derbala MF. Genetic polymorphisms of ICAM 1 and IL28 as predictors of liver fibrosis severity and viral clearance in hepatitis C genotype 4. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013; 37 (3): 262–8.
33. Bosio D, Salvi V, Gagliostro V, Sozzani S. Angiogenic and antiangiogenic chemokines. *Chem Immunol Allergy*. 2014; 99: 89–104.
34. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis*. 2010; 30: 258–70.
35. Mándi Y, Nagy I, Krenács L. Relevance of ICAM-1 to alcoholic liver cirrhosis. *Pathobiology*. 1996; 64(1): 46–52.

Reference

1. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115: 209–18.
2. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 7312–24
3. Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct*. 2003; 28: 105–12.
4. Rehm J, Taylor B, Mohapatra S et al. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Rev*. 2010; 29(4): 437–45.
5. Musin A.G., Motalova E.H.G., Nigmatullina A.E.H. et al. Modern aspects of mechanisms of liver fibrogenesis. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2014; 9(3): 95–9. (in Russian)
6. Rachakonda V, Gabbert C, Raina A et al. Stratification of risk of death in severe acute alcoholic hepatitis using a panel of adipokines and cytokines. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2014; 38(11): 2712–21.
7. Nicolaou C, Chatzipanagiotou S, Tzivosa D. Serum cytokine concentrations in alcohol-dependent individuals without liver disease. *Alcohol*. 2004; 32: 243–7
8. Fujimoto M, Uemura M, Nakatani Y et al. Plasma endotoxin and serum cytokine levels in cpatients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance. *Alcohol, clinical and experemental research*. 2000; 24(4): 48–54.
9. Swiatkowska-Stodulska R, Bakowska A, Drobińska-Jurowiecka A. Interleukin-8 in the blood serum of patients with alcoholic liver disease. *Med Sci Monit*. 2006; 12(5): 215–20.
10. Bosch J, Abraldes JG, Fernández M et al. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol*. 2010; 53: 558–67.
11. Alam I, Bass NM, Bacchetti P et al. Hepatic tissue endothelin-1 levels in chronic liver disease correlate with disease severity and ascites. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95(1): 199–203.
12. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of Biochemistry*. 2013; 153(1): 13–9.
13. Ogurcov P.P., Polikarpova T.S., Garmash I.V., Arisheva O.S. et al. Biological risk factors for the development of alcohol dependence and alcoholic cirrhosis. *Vestnik RUDN Seriya "Meditsina"*. 2012; 3: 26–30 (in Russian)

Сведения об авторах:

Иванов Александр Сергеевич, аспирант каф. внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева МИ РУДН;

Тарасенко Екатерина Владимировна, канд. биол. наук, доцент, каф. биологии и общей генетики;

Гармаш Ирина Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева;

Мяндина Галина Ивановна, доктор биол. наук, проф. каф. биологии и общей генетики;

Аришева Ольга Сергеевна, канд. мед. наук, ассистент каф. внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева;

Желудова Елена Михайловна, канд. биол. наук, доцент каф. биологии и общей генетики;

Азова Мадина Мухамедовна, доктор биол. наук, проф., зав. каф. биологии и общей генетики;

Теребилина Наталья Николаевна, канд. мед. наук, зав. лаб. биохимии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России;

Баронец Валерия Юрьевна, ст. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России;

Кобалава Жанна Давидовна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-057: 612.017

Казицкая А.С.¹, Ядыкина Т.К.¹, Бугаева М.С.^{1,3}, Жукова А.Г.^{1,2}, Михайлова Н.Н.^{1,2}, Горохова Л.Г.^{1,2}

Патофизиологические механизмы иммунной реактивности печени в условиях длительного экспериментального воздействия на организм фторида натрия

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний», 654041, г. Новокузнецк, Россия, ул. Кутузова, д. 23;

²Новокузнецкий институт (филиал) ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 654041, г. Новокузнецк, Россия, ул. Циолковского, д. 23;

³НГИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 654005, г. Новокузнецк, Россия, пр. Строителей, д. 5

В условиях непрерывного воздействия неблагоприятных факторов окружающей и производственной среды на человека особую актуальность приобретает изучение механизмов, поддерживающих гомеостаз организма. Длительное поступление фторидов в организм приводит к формированию хронической фтористой интоксикации, патогенез которой вызывает многочисленные споры и дискуссии. До сих пор недостаточно внимания уделяется изучению висцеральной патологии, обусловленной нарушениями иммунного статуса в условиях воздействия на организм соединений фтора. Практически отсутствуют исследования по изучению иммунной реактивности, определяющей морфофункциональный характер ответной реакции печени на ранних стадиях развития фтористой интоксикации. **Цель работы** – изучение действий патофизиологических механизмов иммунной реактивности печени при субхроническом действии на организм соединений фтора. **Методика.** Опыты проведены на 210 лабораторных крысах-самцах массой 180-220 г, разделенных на 2 группы: контрольную ($n=80$) и группу животных с субхроническим действием фторида натрия ($n=130$). Экспериментальные животные в течение 12 нед имели свободный доступ к водному раствору фторида натрия (концентрация 10 мг/л, что составляет суточную дозу фтора 1,2 мг/кг массы тела). Для изучения иммунологических и биохимических показателей забирали кровь из хвостовой вены через 1, 3, 6, 9, 12 нед от начала эксперимента. Для оценки состояния гуморального звена иммунитета определяли уровень сывороточных иммуноглобулинов (IgA, IgG, IgM) иммуноферментным анализом с помощью наборов реактивов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Уровень сывороточных цитокинов: TNF- α , IL-1 β , 2, 4, 6, 10 определяли на анализаторе Multiskan EX методом иммуноферментного анализа с использованием наборов «Вектор Бест» (Новосибирск). Подсчет общего количества лейкоцитов произведен классическим способом в камере Горяева, анализ лейкоцитарной формулы – в окрашенных мазках периферической крови. Метаболические изменения оценивали по активности ферментов в ткани печени: щелочной фосфатазы (ЩФ), аланин- и аспаратаминотрансфераз (АЛТ, АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гаммаглутамилтранспептидазы (γ -ГТ). Активность ферментов определяли унифицированными методами с помощью наборов реактивов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) на фотометре РМ-750 (Германия). Гистологические исследования печени осуществляли после декапитации крыс, проводимой под эфирным наркозом. **Результаты.** Показано, что субхроническое воздействие фторида натрия сопровождается формированием внутриклеточных и внутрисосудистых повреждений печени. Активация медиаторов воспаления и развитие иммунологических нарушений в динамике эксперимента способствуют формированию системной воспалительной реакции, которая приводит к появлению стойких морфологических нарушений в печени и изменению активности ферментов основных метаболических путей. **Заключение.** Полученные результаты могут быть использованы при разработке и проведении профилактических мероприятий в условиях воздействия на организм высоких концентраций фтора с последовательным применением детоксикационной, иммуномодуляторной и органопротекторной коррекции.

Ключевые слова: фтористая интоксикация; иммунный ответ; метаболизм; ферментативная активность; морфологические изменения; печень; крысы.

Для цитирования: Казицкая А.С., Ядыкина Т.К., Бугаева М.С., Жукова А.Г., Михайлова Н.Н., Горохова Л.Г.

Патофизиологические механизмы иммунной реактивности печени в условиях длительного экспериментального воздействия на организм фторида натрия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 64-72

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.64-72

Для корреспонденции: Казицкая Анастасия Сергеевна, канд. биол. наук., ст. науч. сотр. лаб. молекулярно-генетических и экспериментальных исследований, НИИ комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний, e-mail: anastasiya_kazitskaya@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.08.2018

Kazitskaya A.S.¹, Yadykina T.K.¹, Bugaeva M.S.^{1,3}, Zhukova A.G.^{1,2}, Mikhailova N.N.^{1,2}, Gorokhova L.G.^{1,2}

Pathophysiological mechanisms of hepatic immune reactivity in prolonged experimental exposure of the body to sodium fluoride

¹ Research Institute for Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases, Kutuzov Str. 23, Novokuznetsk 654041;

²Novokuznetsk Institute (Branch) of the Kemerovo State University, Tsiolkovsky Str. 23 Novokuznetsk 654041;

³Novokuznetsk State Institute for Physicians' Continuous Education, Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Prospekt Stroiteley 5, Novokuznetsk 654005

Studying mechanisms, which maintain the body homeostasis, is particularly important in the conditions of continuous impact of adverse environmental and manufacturing factors. Long-term exposure to fluorides leads to chronic fluorine intoxication, the pathogenesis of which is a subject of multiple controversy and discussions. Not enough attention is still paid to elucidating the visceral pathology associated with fluorine-induced immune disorders. There are virtually no studies of immune reactions that define the morphofunctional nature of the liver response to early stages of fluorine intoxication. **Aim.** To study pathophysiological mechanisms of hepatic immune reactivity in subchronic exposure of the body to fluorine compounds. **Methods.** Experiments were performed on 210 male rats weighing 180-220 g. The animals were divided into two groups: 1) control (n=80) and 2) subchronic exposure to sodium fluoride (n=130). The rats had free access to a 10 mg/l aqueous solution of sodium fluoride (daily dose, 1.2 mg/kg body weight) for 12 weeks. Blood was withdrawn from the caudal vein at 1, 3, 6, 9, and 12 weeks of the experiment for immunological and biochemical tests. Histological study of the liver was performed after decapitation of rats under ether anesthesia. **Results.** The subchronic exposure to sodium fluoride was associated with intracellular and intravascular damage of the liver. Activation of inflammatory mediators and development of immunological disorders during the experiment contributed to a systemic inflammatory reaction, which resulted in persistent morphological injuries of the liver and changes in enzyme activities in major metabolic pathways. **Conclusion.** The study results can be used for development and implementation of preventive measures against the effects of high fluorine concentrations, which would include a successive use of detoxification, immunomodulation and organ protection.

Keywords: fluoride intoxication; immune response; metabolism; enzymatic activity; morphological changes; liver; rats.

For citation: Kazitskaya A.S., Yadykina T.K., Bugaeva M.S., Zhukova A.G., Mikhailova N.N., Gorokhova L.G. Pathophysiological mechanisms of immune reactivity of the liver under the conditions of prolonged experimental exposure of sodium fluoride on the body to sodium fluoride. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 64-72. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03. 64-72

For correspondence: Anastasiya S. Kazitskaya, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the laboratory of molecular-genetic and experimental researches, Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute for Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases», e-mail: anastasiya_kazitskaya@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kazitskaya A.S., <http://orcid.org/0000-0001-8292-4810>

Yadykina T.K., <https://orcid.org/0000-0001-7008-1035>

Bugaeva M.S., <https://orcid.org/0000-0003-3692-2616>

Zhukova A.G., <http://orcid.org/0000-0002-4797-7842>

Mikhailova N.N., <https://orcid.org/0000-0002-1127-6980>

Gorokhova L.G., <http://orcid.org/0000-0002-0545-631X>

Received 13.08.2018

Введение

В условиях непрерывного воздействия на человека неблагоприятных факторов окружающей и производственной среды особую актуальность приобретает изучение механизмов, поддерживающих гомеостаз организма. Печень играет ведущую роль в установлении гомеостатического равновесия, являясь полифункциональным органом, участвующим в метаболизме белков и липидов, рециркуляции желчных кислот, формировании иммунного ответа и детоксикации токсичных веществ экзогенного и эндогенного происхождения [1–3].

Длительное поступление фторидов в организм приводит к формированию хронической фтористой интоксикации (ХФИ), патогенез которой вызывает многочисленные споры и дискуссии [4–7]. Понимание патогенеза ХФИ актуально для прогнозирования рисков здоровью людей, проживающих в регионах с высоким содержанием фторидов или имеющих профессиональный контакт с данными соединениями. До сих пор недостаточно внимания уделяется изучению висцеральной патологии, обусловленной нарушениями

иммунного статуса в условиях воздействия на организм соединений фтора [8, 9]. Практически отсутствуют исследования по изучению иммунной реактивности, определяющей морфофункциональный характер ответной реакции печени на ранних стадиях развития фтористой интоксикации [10, 11].

Цель исследования – изучение патофизиологических механизмов иммунной реактивности печени в ответ на хроническое поступление в организм соединений фтора.

Методика

Исследование проводили в соответствии с международными правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (Страсбург, 1986), «Правилами лабораторной практики в РФ (GLP)» (утверждены приказом Министерства здравоохранения РФ от 19.06.2003, № 267). Для проведения исследований было получено разрешение биоэтического комитета НИИ КППЗ (протокол № 3 от 26 ноября 2015 г.). В эксперименте использовано 210 лабораторных крыс-самцов 180-220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария на полноценном сбалансированном рационе.

Животные разделены на 2 группы: 1-я – контроль ($n=80$) и 2-я – опыт ($n=130$). Интоксикацию фтором моделировали свободным доступом крыс к водному раствору фторида натрия (NaF, 10 мг/л), что соответствует суточной дозе 1,2 мг/кг. Для изучения иммунологических и биохимических показателей забирали кровь из хвостовой вены через 1, 3, 6, 9, 12 нед от начала эксперимента. Для оценки состояния гуморального звена иммунитета определяли уровень сывороточных иммуноглобулинов (IgA, IgG, IgM) иммуноферментным анализом с помощью наборов реактивов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Уровень сывороточных цитокинов: TNF- α , IL-1 β , 2, 4, 6, 10 определяли на анализаторе Multiskan EX методом иммуноферментного анализа с использованием наборов «Вектор Бест» (Новосибирск). Подсчет общего количества лейкоцитов произведен классическим способом в камере Горяева, анализ лейкоцитарной формулы – в окрашенных мазках периферической крови. Метаболические изменения оценивали по активности ферментов в ткани печени: щелочной фосфатазы (ЩФ), аланин- и аспаратаминотрансфераз (АЛТ, АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гаммаглутамилтранспептидазы (γ -ГТ). Активность определяли унифицированными методами с помощью наборов реактивов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) на фотометре РМ-750 (Германия).

В отдельной серии после декапитации крыс, проводимой под эфирным наркозом, забирали образцы печени для гистологического исследования. Кусочки ткани фиксировали в 12% нейтральном формалине, далее материал подвергали общепринятым в гистологии процедурам. Парафиновые срезы толщиной 3-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по методу Ван Гизона. Анализ и микрофото съемку гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Olympus CX31 RBSF (Германия) – 10 крат, поле зрения – 20 мм и объектива 20, 40 и 100 с водной и масляной иммерсией с использованием цифровой камеры Levenhuk C800.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения IBM SPSS Statistics 22 (Лицензионный договор № 20160413-1 от 22.04.2016). Для определения соответствия данных нормальному распределению использовали эксцесс и асимметрию. Представление количественных переменных проводили с помощью средних значений и стандартной ошибки среднего. При нормальном распределении для сравнения 2 независимых выборок использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента, при отклонении распределения от нормального использовали непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни с представлением данных в виде медианы. Уровень значимости для отклонения нулевой гипотезы $p < 0,05$. Для определения связи количественных признаков применяли корреляционный анализ Пирсона.

Результаты и обсуждение

Ведущая роль в формировании ответной реакции организма на воздействие повреждающих факторов принадлежит крови, как одной из наиболее реактивных систем. Начальная иммунная реакция на поступление фтора характеризовалась активацией клеточного звена иммунитета, в качестве основополагающего защитного механизма. На протяжении 6 нед эксперимента наблюдалось статистически значимое повышение общего количества лейкоцитов до $11,0 \pm 1,2$ (в контроле $6,9 \pm 0,9 \cdot 10^9$ /л, $p < 0,01$), обусловленное увеличением на 1-й нед относительного числа моноцитов до $4,0 \pm 0,7$ (в контроле $2,8 \pm 0,3 \cdot 10^9$ /л, $p < 0,05$), участвующих в формировании и регуляции первичного иммунного ответа. К 3-й нед воздействия фторидов на организм животных отмечалось снижение уровня моноцитов. Кратковременная циркуляция их в крови с последующей миграцией в ткани для дифференцировки в органы- и тканеспецифичные макрофаги позволяет иммунной системе активно участвовать в процессе фагоцитоза [12].

Активация клеточного иммунитета на ранних сроках воздействия фторида натрия сопровождалась относительно стабильными показателями гуморального звена (табл. 1). На 9–12-й нед число лейкоцитов статистически значимо снижалось (в 1,3 раза) по сравнению с фоновыми показателями.

Регуляция иммунного ответа осуществляется специфическими молекулами межклеточного взаимодействия – цитокинами. Ключевой медиатор иммунного ответа – TNF- α играет важную роль в развитии ранних стадий воспаления. Повышение уровня TNF- α обнаруживало на 1-й нед статистически значимую умеренную обратную связь с снижением уровня противовоспалительного цитокина IL-10 ($r = -0,385$; $p < 0,05$).

Индукция раннего синтеза TNF- α приводила к статистически значимому повышению концентрации острофазового белка – Ср (табл. 2), что свидетельствовало о разворачивании воспалительного процесса [13].

Не исключено, что провоспалительные цитокины являются инициаторами воспалительного процесса в печени за счет активации резидентных печеночных макрофагов – клеток Купфера [14, 15], пролиферация которых наблюдалась с 1-й нед эксперимента (рис. а).

Являясь начальным звеном иммунного ответа, макрофаги играют особую связующую роль между местными и системными реакциями. Проллиферация органоспецифических макрофагов – клеток Купфера, участвующих в очищении крови от токсинов, антигенов и коагулянтов, свидетельствовала об их активном участии в организации воспалительного процесса.

Трехнедельное поступление фтора в организм животных приводило к подавлению синтеза IL-1 β на фоне повышения концентрации мощного его ингибитора – противовоспалительного IL-10. Морфологическая картина печени на этом сроке характеризовалась

Таблица 1

Влияние NaF на динамику уровня цитокинов в плазме крови, (M \pm m)

Показатели	Группа животных	1 нед	3 нед	6 нед
TNF- α , пг/мл	опыт	4,9 \pm 0,93*	4,0 \pm 0,45	6,6 \pm 1,10*
	контроль	2,9 \pm 0,44	3,2 \pm 0,18	3,2 \pm 0,18
IL-1 β , пг/мл	опыт	5,8 \pm 0,69	2,7 \pm 0,75**	3,4 \pm 0,75**
	контроль	6,1 \pm 1,45	7,0 \pm 0,92	7,0 \pm 0,92
IL-4, пг/мл	опыт	2,0 \pm 0,15	1,0 \pm 0,20**	1,4 \pm 0,37*
	контроль	2,2 \pm 0,42	2,8 \pm 0,24	2,8 \pm 0,24
IL-6, пг/мл	опыт	6,1 \pm 1,16	5,5 \pm 1,18	7,6 \pm 0,71*
	контроль	5,6 \pm 0,75	5,2 \pm 0,23	5,2 \pm 0,23
IL-10, пг/мл	опыт	1,6 \pm 0,07**	3,6 \pm 0,40*	3,8 \pm 0,62*
	контроль	2,6 \pm 0,47	2,2 \pm 0,42	2,2 \pm 0,42

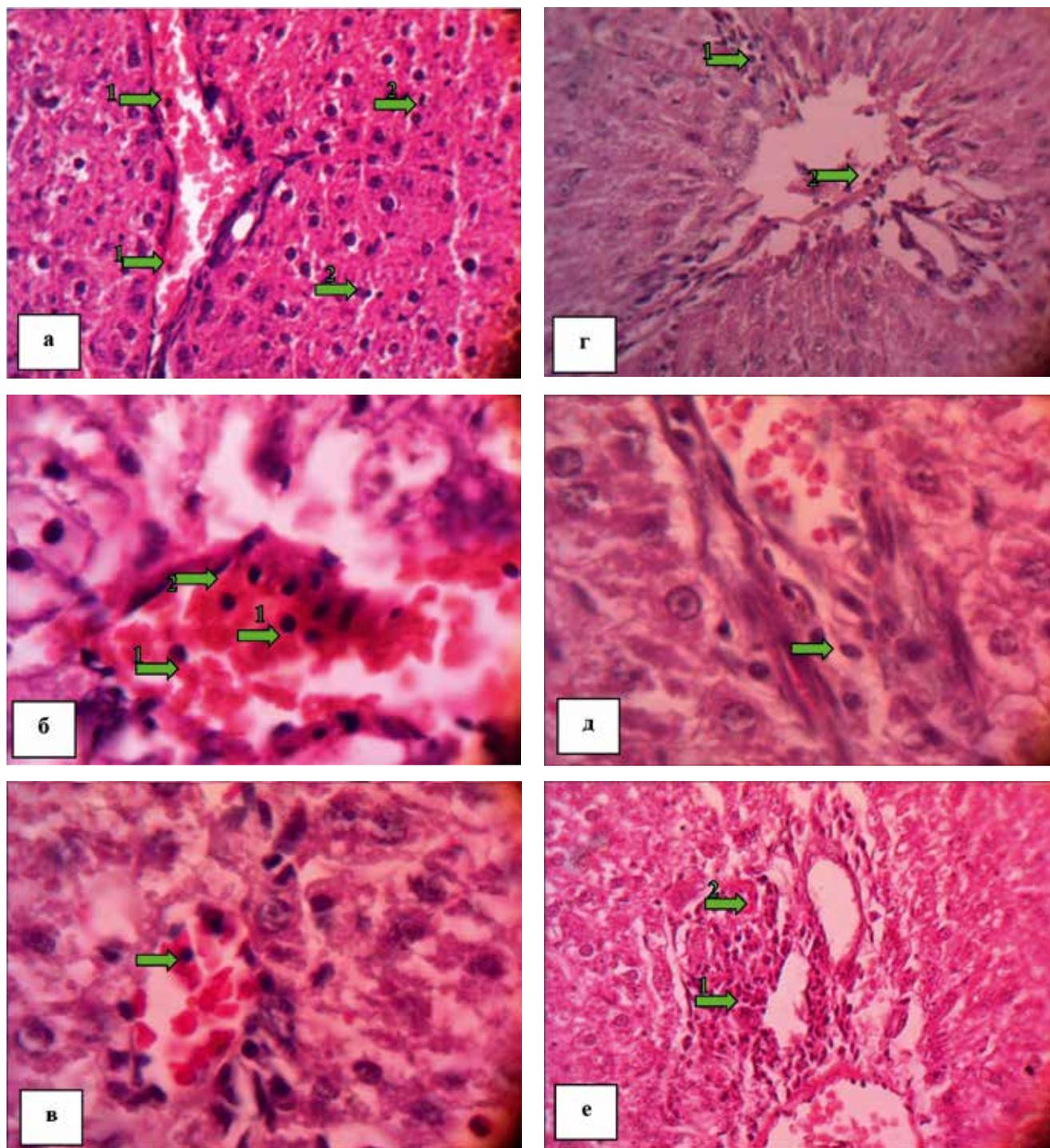
Примечание. * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой.

Таблица 2

Изменение иммунологических показателей в динамике воздействия NaF, (M \pm m)

Показатель	Группа крыс	Срок воздействия				
		1 нед	3 нед	6 нед	9 нед	12 нед
IgA, г/л	опыт	0,08 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
	контроль	0,11 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
IgM, г/л	опыт	0,54 \pm 0,03	0,43 \pm 0,02	0,49 \pm 0,05	0,48 \pm 0,01*	0,46 \pm 0,03
	контроль	0,51 \pm 0,06	0,43 \pm 0,04	0,53 \pm 0,04	0,59 \pm 0,01	0,49 \pm 0,03
IgG, г/л	опыт	3,6 \pm 0,36	3,5 \pm 0,11	3,4 \pm 0,13	3,1 \pm 0,23*	3,1 \pm 0,18*
	контроль	3,8 \pm 0,14	3,9 \pm 0,17	3,7 \pm 0,27	3,7 \pm 0,17	3,7 \pm 0,09
Ср, мг/дл	опыт	20,3 \pm 1,5*	18,5 \pm 1,91	14,3 \pm 0,5**	15,8 \pm 0,2*	14,3 \pm 0,8**
	контроль	16,9 \pm 0,7	6,7 \pm 0,4	16,7 \pm 0,3	16,7 \pm 0,3	16,6 \pm 0,3
Нр, мг/дл	опыт	35,2 \pm 2,4	28,2 \pm 3,23	28,2 \pm 3,1	43,0 \pm 6,4**	42,2 \pm 4,0**
	контроль	32,9 \pm 3,5	34,2 \pm 1,5	34,2 \pm 1,5	27,6 \pm 1,1	25,5 \pm 2,3

Примечание. * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой.



Морфологические изменения в печени крыс в динамике развития фтористой интоксикации; окраска гематоксилин-эозином.

усилением пролиферации фагоцитирующих клеток, слабовыраженной лимфоплазмозитарной инфильтрацией в портальных трактах, а также стагированием кле-

ток иммунной системы в сосудах венозного типа (рис. б). Увеличение числа двуядерных гепатоцитов на фоне дистрофического повреждения клеток указыва-

ло на усиление регенеративно-восстановительных процессов в печени [16, 17].

Ферментативная активность в печени на ранних сроках (3-и сут) воздействия фтора характеризовалась разнонаправленными изменениями. На фоне статистически значимого снижения активности АСТ, ЩФ и ЛДГ в гепатоцитах наблюдалась активация АЛТ – фермента, обеспечивающего работу глюкозо-аланинового шунта (табл. 3).

Полуторакратное снижение активности фермента АСТ на фоне активации АЛТ свидетельствовало о торможении цикла Кребса в печени и преобладании анаболических процессов. Некоторые исследователи связывают повышение активности АЛТ с развитием иммунных повреждений гепатоцитов [18].

К 3-й нед эксперимента наблюдалось восстановление физиологической активности ферментов АСТ и ЛДГ; статистически значимое повышение активности ЩФ и подавление АЛТ, что свидетельствовало об активации основных метаболических путей: гликолиза, цикла Кребса, липидного и углеводного обменов.

Таким образом, ранняя ответная реакция организма (1-я-3-я нед) на поступление фтора характеризовалась активацией клеточного звена иммунитета с последующим синтезом регуляторных пептидов, реализацией компенсаторно-приспособительных механизмов в печени на фоне начальных изменений её морфоструктуры.

В динамике эксперимента наблюдалось формирование иммунных нарушений, усугубляющих сдвиг морфофункционального гомеостаза печени. Аккумуляция фтора в организме животных способствовала постепенной трансформации адаптивного ответа организма в ответ патологический. Этот период (с 6-й до 9-й нед) характеризовался высокими показателями в кро-

ви TNF- α , который индуцировал синтез провоспалительного цитокина IL-6, являющегося одним из ведущих регуляторов метаболических сдвигов, характерных для системного воспаления. Подтверждением активного воспалительного процесса являлось сохранение высокой концентрации острофазного белка Нр и статистически значимое повышение уровня нейтрофилов (с $57,5 \pm 3,2 \cdot 10^9$ /л в контроле до $65,1 \pm 1,6 \cdot 10^9$ /л в опыте, $p < 0,05$).

Переходный период (6-я нед) сопровождался изменением интенсивности функционирования ферментов основных метаболических путей. На фоне статистически значимого снижения активности АЛТ и ЛДГ наблюдалось двукратное повышение активности АСТ, которое свидетельствовало об активации цикла трикарбоновых кислот, обеспечивающего энергетические потребности организма (табл. 3).

Морфологическая картина в печени на 6-й нед эксперимента характеризовалась доминированием признаков воспаления (рис. в, г). Воздействие фторидом натрия в течение 6 нед приводило к развитию в печени выраженной пролиферации и гиперплазии клеток Купфера, усилению лимфоплазмоцитарной инфильтрации портальных трактов, стазированию крови в сосудах. Известно, что длительный стаз охватывает соседние капилляры, в результате чего нарушается доставка кислорода и питательных веществ в ткани, а также удаление из них продуктов обмена, что может играть немаловажную роль в развитии некробиотических изменений в печени на 6-й нед эксперимента [19].

К 9-й нед нарушения морфоструктуры печени усугублялись и сопровождались скоплением лейкоцитов в синусоидах. Архитектоника печени характеризовалась мультифокальной пролиферацией клеток Купфера, выявлялись очаги некроза гепатоцитов, что видимо, обу-

Таблица 3

Изменение активности ферментов основных метаболических путей в печени крыс в динамике воздействия NaF

Сроки воздействия	АСТ, (ЕА/гр. тк.)		АЛТ, (ЕА/гр. тк.)		ЩФ, (ЕА/гр. тк.)		ЛДГ, (ЕА/гр. тк.)	
	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт	К	Опыт
3-и сут	52,4	33,9*	76,8	100,5*	750,7	497,6*	702,5	647,4
6-е сут	51,3	42,8	70,3	50,1	781,1	772,8	677,6	394,2*
3 нед	52,9	52,6	80,4	61,3*	703,5	1204,4*	690,6	653,1
6 нед	55,7	102,9*	82,2	47,8*	804,8	779,5	688,6	421,6*
9 нед	51,7	49	80,3	91,5	786,4	735,3	706,5	471,5
12 нед	52,2	11,6*	77,9	68,2	790,2	1045,2*	693,4	1440,0*

Примечание. * – $p < 0,05$ – статистически значимые отличия от показателей контроля (Mann-Whitney U test; данные представлены в виде медианы).

словлено активацией свободнорадикальных процессов [19]. Отмечались существенные деструктивные изменения со стороны микрососудистого русла (гипертрофия эндотелиоцитов, полнокровие со стазом эритроцитов), приводящие к нарушению межтканевого обмена в печени (рис. д).

Увеличение сроков интоксикации до 12 нед изменило метаболическую картину, и она приобрела устойчивый патологический характер. Статистически значимое снижение концентрации IgM и IgG на фоне высокого содержания лимфоцитов указывало на формирование нарушений в процессе созревания В-лимфоцитов и невозможности их дальнейшей дифференцировки в клетки плазматического ряда. Сохранение высокой концентрации острофазового белка Нр на поздних сроках свидетельствовало о переходе воспаления в хроническую форму.

Недостаточность защитных систем организма приводила к значительным изменениям активности ферментов основных метаболических циклов в печени. К 12-й нед эксперимента на фоне двукратного повышения активности ЛДГ и ЩФ наблюдалось подавление активности АСТ в 4,5 раза по сравнению с показателями контроля. Известно, что уровень ЛДГ может быть увеличен при клеточном некрозе или неопластической пролиферации клеток [2]. Полученные результаты свидетельствовали о невозможности достижения метаболического баланса и усилении патологических изменений в ткани печени в виде выраженной дистрофии гепатоцитов, увеличения количества очагов некроза, фибропластических изменений в портальных трактах, выраженной лимфоплазматической инфильтрации и эндотелиоза сосудов (рис. е). По мнению некоторых ученых на процесс фиброобразования печени прямое воздействие оказывают клетки Купфера, стимулирующие фиброгенез [20]. При этом одни специалисты отмечают уменьшение количества резидентных макрофагов при усилении фиброза [21], в то время как другие указывают на возрастание их числа [22].

Таким образом, вызывая раннюю экспрессию провоспалительных цитокинов и отсроченный противовоспалительный иммунный ответ, фториды запускают системную воспалительную реакцию, приводящую к формированию повреждений печени с последующим нарушением ферментативных процессов. Поступление фтора в организм животных на ранних сроках (1-3 нед) сопровождалось активацией клеточного иммунитета, экспрессией провоспалительных цитокинов, пролиферацией в печени органоспецифических макрофагов — клеток Купфера. 6-я нед эксперимента характеризовалась стабильными показателями гуморального звена иммунной системы на фоне сохранившейся высокой активности клеточного пула, разнонаправленными из-

менениями концентрации острофазовых белков (\downarrow Ср и \uparrow Нр), морфологическими проявлениями воспалительных реакций в виде выраженной пролиферации и гиперплазии клеток Купфера, усиления лимфоплазматической инфильтрации, стазирования сосудов клетками иммунной системы.

На стадии истощения иммунной системы (с 9-й нед) наблюдалось подавление синтеза сывороточных иммуноглобулинов, увеличение концентрации Нр, повышение относительного числа моноцитов и лимфоцитов на фоне снижения абсолютного количества лейкоцитов, что свидетельствовало о переходе воспаления в хроническую форму. Морфологическими проявлениями иммунных расстройств на поздних сроках явились развитие выраженной лимфоплазматической инфильтрации портальных трактов и прогрессирование эндотелиоза.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке и проведении профилактических мероприятий в условиях воздействия на организм повышенного содержания соединений фтора, с применением ранней детоксикационной терапии, и поэтапным подключением иммуномодуляторной и органопротекторной коррекции.

Литература

1. Гарбузенко Д.В. Механизмы компенсации структуры и функции печени при её повреждении и их практическое значение. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии*. 2008; 18(6): 14-21.
2. Arika W.M., Nyamai D.W., Osano K.O., Ngugi M.P., Njagi E.N.M. Biochemical Markers of In Vivo Hepatotoxicity. *Journal of Clinical Toxicology*. 2016; 6(2): 297. Doi:10.4172/2161-0495.1000297.
3. Seki E., Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J Physiol*. 2012; 590(3): 447-58.
4. Михайлова Н.Н., Анохина А.С., Уланова Е.В., Фоменко Д.В., Кизиченко Н.В. Экспериментальные исследования патогенеза хронической фтористой интоксикации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2006; (3): 19-21.
5. Шалина Т.И., Васильева Л.С. Общие вопросы токсического действия фтора. *Сибирский медицинский журнал*. 2009; (5): 5-9.
6. Агалакова Н.И., Гусев Г.П. Влияние неорганического фтора на живые организмы различного филогенетического уровня. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2011; 47(5): 337-47.
7. Жукова А.Г., Уланова Е.В., Щербакова Д.В., Ядыкина Т.К. Динамика компенсаторных механизмов на ранних стадиях интоксикации фтором. *Технологии живых систем*. 2011; 8(1): 10-7.
8. Коротенко О.Ю., Панев Н.И., Захаренков В.В., Филимонов С.Н., Семенова Е.А., Панев Р.Н. Хроническая фтористая интоксикация как фактор риска развития атеросклероза. *Гигиена и санитария*. 2015; 94(5): 91-4.
9. Ядыкина Т.К., Михайлова Н.Н., Жукова А.Г., Горохова Л.Г., Бугаева М.С. Гепатоспецифические защитные механизмы от фтористой интоксикации организма (экспериментальное исследование). *Медицинский академический журнал*. 2016; 16(4): 41-2.

10. Михайлова Н.Н., Казицкая А.С., Горохова Л.Г., Жукова А.Г. Экспериментальный поиск иммунологических критериев определения стадий развития хронической фтористой интоксикации. *Медицина труда и промышленная экология*. 2012; (11): 32-6.
11. Ядыкина Т.К., Михайлова Н.Н., Уланова Е.В., Алёхина Д.А., Жукова А.Г. Экспериментальные исследования механизмов иммунной защиты в динамике фтористой интоксикации. *Медицинская иммунология*. 2015; 17(5): 81.
12. Пинегин Б.В., Карсонова М.И. Макрофаги: свойства и функции. *Иммунология*. 2009; 30(4): 241-9.
13. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека. *Медицинский академический журнал*. 2013; 13(3): 18-41.
14. Таганович А.Д., Олецкий Э.И., Котович И.Л. *Патологическая биохимия*. М.; БИНОМ; 2013.
15. Diehl A.M. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol. Rev.* 2000; 174: 60-71.
16. Непомнящих Г.И., Дюбанова Г.А., Непомнящих Д.Л., Айдагулова С.В., Домникова Н.П., Мигуськина Е.И. Универсальные структурные маркеры гепатотоксического воздействия лекарственных препаратов. *Бюллетень СО РАМН*. 2008; 28(6): 86-92.
17. Fausto N., Campbell J.S., Riehle K.J. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006; 43(1): 45-53.
18. Соловьева Н.В., Давидович Н.В., Бажукова Т.А., Агафонов В.М. Роль нарушений микрофлоры толстой кишки в механизмах повреждения печени при хронических гепатитах В и С. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(1): 92-8.
19. Жукова А.Г., Михайлова Н.Н., Ядыкина Т.К., Алехина Д.А., Горохова Л.Г., Романенко Д.В., Бугаева М.С. Экспериментальные исследования внутриклеточных защитных механизмов печени в развитии хронической фтористой интоксикации. *Медицина труда и промышленная экология*. 2016; (5): 21-4.
20. Isobe K., Nakayama H., Uetsuka K. Relation between lipogranuloma formation and fibrosis, and the origin of brown pigments in lipogranuloma of the canine liver. *Comp Hepatol*. 2008; (7): 5.
21. Lapis K., Zalatnai A., Timár F., Thorgerisson U.P. Quantitative evaluation of lysozyme- and CD68-positive Kupffer cells in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinomas in monkeys. *Carcinogenesis*. 1995; 16(12): 3083-5.
22. Chedid A., Arain S., Snyder A., Mathurin P., Capron F., Naveau S. The immunology of fibrogenesis in alcoholic liver disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004; 128(11): 1230-8.
5. Shalina T.I., Vasil'yeva L.S. General problems of toxic effect of fluorine. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; (5): 5-9. (in Russian)
6. Agalakova N.I., Gusev G.P. Effect of inorganic fluorine on living organisms of different phylogenetic level. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii*. 2011; 47(5): 337-47. (in Russian)
7. Zhukova A.G., Ulanova Ye.V., Shcherbakova D.V., Yadykina T.K. Dynamics of compensatory mechanisms at early stages of fluorine intoxications. *Tekhnologii zhivyykh sistem*. 2011; 8(1): 10-7. (in Russian)
8. Korotenko O.Yu., Panev N.I., Zakharenkov V.V., Filimonov S.N., Semenova E.A., Panev R.N. Chronic fluoride intoxication as a risk factor for the development of atherosclerosis. *Gigiena i Sanitariya*. 2015; 94(5): 91-4. (in Russian)
9. Yadykina T.K., Mikhaylova N.N., Zhukova A.G., Gorokhova L.G., Bugayeva M.S. The hepatospecific protective mechanisms from fluoride intoxication of the body (experimental study). *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal*. 2016; 16(4): 41-2. (in Russian)
10. Mikhaylova N.N., Kazitskaya A.S., Gorokhova L.G., Zhukova A.G. The experimental search of immunological criteria for identifying stages of development of chronic fluoride intoxication. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2012; (11): 32-6. (in Russian)
11. Yadykina T.K., Mikhaylova N.N., Ulanova Ye.V., Alokhhina D.A., Zhukova A.G. The experimental search of the mechanisms of immune defense in the dynamics of fluoride intoxication. *Meditsinskaya immunologiya*. 2015; 17(5): 81. (in Russian)
12. Pinegin B.V., Karsonova M.I. Macrophages: Properties and Functions. *Immunologiya*. 2009; 30(4): 241-9. (in Russian)
13. Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis of human infectious and non-infectious diseases. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal*. 2013; 13(3): 18-41. (in Russian)
14. Taganovich A.D., Oletskiy E.I., Kotovich I.L. *Pathological biochemistry. [Patologicheskaya biokhimiya]*. Moscow; BINOM; 2013. (in Russian)
15. Diehl A.M. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol. Rev.* 2000; 174: 160-71.
16. Nepomnyashchikh G.I., Dyubanova G.A., Nepomnyashchikh D.L., Aydagulova S.V., Domnikova N.P., Migus'kina Ye.I. Universal structural markers of hepatotoxic effect of medicinal preparations. *Byulleten' SO RAMN*. 2008; 28(6): 86-92. (in Russian)
17. Fausto N., Campbell J.S., Riehle K.J. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006; 43(1): 45-53.
18. Solov'yeva N.V., Davidovich N.V., Bazhukova T.A., Agafonov V.M. The role of gut microflora in the mechanisms of liver damage in chronic hepatitis B and C. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(1): 92-8. (in Russian)
19. Zhukova A.G., Mikhaylova N.N., Yadykina T.K., Alekhina D.A., Gorokhova L.G., Romanenko D.V., Bugayeva M.S. Experimental studies of intracellular liver defense mechanisms in the development of chronic fluoride intoxication. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2016; (5): 21-24. (in Russian)
20. Isobe K., Nakayama H., Uetsuka K. Relation between lipogranuloma formation and fibrosis, and the origin of brown pigments in lipogranuloma of the canine liver. *Comp Hepatol*. 2008; 7: 5.
21. Lapis K., Zalatnai A., Timár F., Thorgerisson U.P. Quantitative evaluation of lysozyme- and CD68-positive Kupffer cells in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinomas in monkeys. *Carcinogenesis*. 1995; 16(12): 3083-5.
22. Chedid A., Arain S., Snyder A., Mathurin P., Capron F., Naveau S. The immunology of fibrogenesis in alcoholic liver disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004; 128(11): 1230-8.

References

1. Garbuzenko D.V. Mechanisms of compensation of structure and function of the liver at its damage and their practical significance. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii*. 2008; 18(6): 14-21. (in Russian)
2. Arika W.M., Nyamai D.W., Osano K.O., Ngugi M.P., Njagi E.N.M. Biochemical Markers of In Vivo Hepatotoxicity. *Journal of Clinical Toxicology*. 2016; 6(2): 297. DOI:10.4172/2161-0495.1000297.
3. Seki E., Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J Physiol*. 2012; 590(3): 447-58.
4. Mikhaylova N.N., Anokhhina A.S., Ulanova Ye.V., Fomenko D.V., Kizichenko N.V. Experimental studies of pathogenesis of chronic fluoride intoxication. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2006; (3): 19-21. (in Russian)

Сведения об авторах:

Казицкая Анастасия Сергеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. молекулярно-генетических и экспериментальных исследований НИИ КПППЗ;

Ядыкина Татьяна Константиновна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярно-генетических и экспериментальных исследований НИИ КПППЗ;

Бугаева Мария Сергеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. молекулярно-генетических и экспериментальных исследований НИИ КПППЗ; ст. науч. сотр. лаб. патанатомии НГИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

Жукова Анна Геннадьевна, доктор биол. наук, зав. лаб. молекулярно-генетических и экспериментальных исследований НИИ КПППЗ; проф. каф. естеств.-научных дисциплин НФИ КемГУ;

Михайлова Надежда Николаевна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. молекулярно-генетических и экспериментальных исследований НИИ КПППЗ; зав. каф. естеств.-научных дисциплин НФИ КемГУ;

Горохова Лариса Геннадьевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярно-генетических и экспериментальных исследований НИИ КПППЗ, доцент каф. естеств.-научных дисциплин НФИ КемГУ.

© Коллектив авторов, 2019
УДК 612.463.615.254.1.615.272.3

Балботкина Е.В., Спириденко Е.А., Каравашкина Т.А., Кутина А.В.

Влияние ингибитора дипептидилпептидазы-4 на выведение ионов натрия и воды почками у крыс при изменениях водно-солевого баланса

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова» Российской академии наук, 194223, г. Санкт-Петербург, Россия, пр. Тореза, д. 44

Желудочно-кишечный тракт секретирует широкий спектр пептидов, регулирующих метаболические процессы и влияющих на функции почек и водно-солевой баланс. Эффекты данных биологически активных веществ можно усилить увеличением их периода полужизни путем угнетения фермента дипептидилпептидазы-4. **Цель исследования** – изучение экскреции ионов натрия и воды при угнетении дипептидилпептидазы-4 вилдаглиптином у крыс с различным состоянием водно-солевого баланса. **Методика.** Состояния гипернатриемии, гиперосмии или гипоосмии моделировали пероральным введением гипертонического и изотонического растворов NaCl и воды. **Результаты.** Вилдаглиптин вызвал дозозависимое снижение активности фермента дипептидилпептидазы-4 с максимумом эффекта при дозе 1 мг на 100 г массы тела. Его введение перед гипертонической натриевой нагрузкой увеличивало экскрецию натрия на 56%, усилило реабсорбцию осмотически свободной и свободной от натрия воды. Введение ингибитора дипептидилпептидазы-4 перед изотонической натриевой нагрузкой усиливало экскрецию натрия в той же степени, но не влияло на реабсорбцию воды. Инъекция вилдаглиптина, предваряющая водную нагрузку, вызвала антидиуретическую реакцию почек. **Заключение.** Блокада дипептидилпептидазы-4 вилдаглиптином способствует выведению из организма избыточного количества натрия и изменению реабсорбции воды в зависимости от концентрации ионов натрия в сыворотке крови, вероятно, за счет увеличения периода циркуляции кишечных регуляторных пептидов, секретирующихся в ответ на пероральные нагрузочные пробы NaCl. Данные процессы ускоряют восстановление водно-солевого гомеостаза в условиях поступления избытка натрия через желудочно-кишечный тракт.

Ключевые слова: вилдаглиптин; дипептидилпептидаза-4; натрийурез; почка; осмотически свободная вода; нагрузочные пробы.

Для цитирования: Балботкина Е.В., Спириденко Е.А., Каравашкина Т.А., Кутина А.В. Влияние ингибитора дипептидилпептидазы-4 на выведение ионов натрия и воды почками у крыс при изменениях водно-солевого баланса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3):73-80.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.73-80

Для корреспонденции: Балботкина Евгения Владимировна, мл. науч. сотр. лаб. физиологии почки и водно-солевого обмена, e-mail: Liravega@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-315-00291 мол_а и средств государственного задания ИЭФБ РАН (№ г. р. АААА-А18-118012290371-3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.08.2018

Balbotkina E.V., Spiridenko E.A., Karavashkina T.A., Kutina A.V.

Effects of a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor on urinary sodium and water excretion in rats with water-salt disbalance

I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Pr. Toreza 44, Saint-Petersburg 194223, Russia

The gastrointestinal tract secretes multiple peptides that regulate metabolic processes and influence the kidney function and water-salt balance. The effects of these biologically active substances can be intensified by increasing their half-life through inhibition of the dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) enzyme. **The aim of the study** was investigation of sodium and water excretion after inhibition of DPP-4 with vildagliptin in rats with different states of the water-salt balance. **Methods.** The hypernatremic, hyperosmotic and hypoosmotic states were modeled by oral administration of hypertonic and isotonic NaCl solutions or water. **Results.** Vildagliptin induced a dose-dependent decrease in the DPP-4 activity with a maximum effect of 1 mg per 100 g of body weight. Vildagliptin administration prior to the hypertonic sodium load increased sodium excretion by 56% and stimulated reabsorption of solute-free and sodium-free water. Administration of the DPP-4 inhibitor before the isotonic sodium load increased sodium excretion to the same degree without affecting the water reabsorption. A vildagliptin injection prior to the water load resulted in an antidiuretic

response of the kidneys. **Conclusion.** The inhibition of DPP-4 activity with vildagliptin promoted removal of excessive sodium from the body and changed the water reabsorption depending on the sodium concentration in the blood serum, presumably by prolonging circulation of the intestinal regulatory peptides secreted in response to oral NaCl load tests. These processes accelerate restoration of the water-salt homeostasis in the conditions of excessive sodium delivery through the gastrointestinal tract.

Keywords: vildagliptin; dipeptidyl peptidase-4; natriuresis; kidney; solute free water; loading tests.

For citation: Balbotkina E.V., Spiridenko E.A., Karavashkina T.A., Kutina A.V. Effects of a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor on urinary sodium and water excretion in rats with water-salt disbalance. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3):73-80. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.73-80

For correspondence: *Evgeniya V. Balbotkina*, Junior Researcher, Sechenov Institute of evolutionary physiology and biochemistry of the Russian academy of sciences, e-mail: Liravega@mail.ru

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

Acknowledgments. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research Grant № 18-315-00291 and funds of the state task of the IEPH RAS (No. AAAA-A18-118012290371-3).

Information about authors:

Balbotkina E.V., <https://orcid.org/0000-0001-8635-8131>

Spiridenko E.A., <https://orcid.org/0000-0003-0574-3711>

Karavashkina T.A., <https://orcid.org/0000-0001-8296-2921>

Kutina A.V., <https://orcid.org/0000-0002-8970-9854>

Received 14.08.2018

Введение

В XX-XXI веках расширились знания о новом звене эндокринной системы – желудочно-кишечном тракте, секретирующем широкий спектр биологически активных веществ [1], среди которых наибольший интерес вызывают пептиды, обладающие анорексигенным и/или инсулинотропным действием [2, 3]. К представителям данной группы регуляторных пептидов относится глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1), выделяемый в кровь L-клетками подвздошной кишки в ответ на поступление пищи [4]. Создан ряд его структурных и функциональных аналогов (миметиков), которые используются в терапии сахарного диабета 2 типа. ГПП-1 и его миметики не только стимулируют глюкозозависимую секрецию инсулина, но и влияют на пищевое поведение [3]. Показан их нейропротекторный эффект при болезни Альцгеймера, Паркинсона и других нейродегенеративных процессах [5]. Рецептор ГПП-1 обнаружен в кишечнике, поджелудочной железе, легких, сердце и различных отделах центральной нервной системы [6, 7]. Данные исследований на животных [8, 9] и человеке [10] подтверждают наличие рецепторов ГПП-1 в почке. Сравнительно новым направлением в изучении эффектов ГПП-1 и его миметиков стало исследование их влияния на функцию почек и поддержание водно-солевого баланса. Показано, что ГПП-1 секретируется в ответ на пероральное поступление не только нутриентов [11], но и растворов солей и воды как у

экспериментальных животных [12, 13], так и у человека [14]. Выявлено, что у крыс ГПП-1 и эксенатид стимулируют диурез и натрийурез за счет рецепторопосредованного угнетения активности Na/H-обменника 3-го типа в проксимальном канальце нефрона [8, 12, 15]. Эксенатид на фоне водной нагрузки увеличивает экскрецию осмотически свободной воды у животных [15] и человека [16], повышая приток канальцевой жидкости в дистальные отделы нефрона [12]. Физиологическое действие ГПП-1 непродолжительно (около 2 мин), так как он быстро разрушается ферментом дипептидилпептидазой-4 (ДПП-4) [7]. Субстратом для ДПП-4 является широкий спектр пептидов [17, 18]. Угнетение активности ДПП-4 продлевает и усиливает влияние кишечных регуляторных пептидов на углеводный обмен, в связи с чем ингибиторы ДПП-4, глиптины (вилдаглиптин, линоглиптин и др.), используются в терапии сахарного диабета 2 типа. Можно предполагать, что снижение активности ДПП-4 оказывает влияние и на водно-солевой баланс организма. Подобная перспектива может иметь важное практическое значение в терапии нарушений водно-солевого равновесия, вызванных различными причинами. *Цель исследования* – оценка действия вилдаглиптина на активность фермента ДПП-4 и функции почек при стандартном состоянии водно-солевого баланса, и его влияния на выведение избыточно поступивших воды и солей.

Методика

Эксперименты проведены на самках крыс Вистар массой 141–266 г. Крыс содержали в пластиковых клетках с древесно-стружечным наполнителем (5 крыс в клетке) при контролируемой температуре. Животных содержали на стандартном рационе – гранулированный корм для грызунов (ПК-120, Лабораторкорм, Россия) при свободном доступе к воде. Вечером накануне эксперимента (в 17:00) у крыс забирали корм, сохраняя свободный доступ к воде. Обращение с животными, их содержание и проведение опытов соответствовало российским и международным правилам работы с лабораторными животными. Протоколы исследования одобрены этическим комитетом ИЭФБ РАН. Проведено 4 серии опытов. Ингибитор фермента ДПП-4, вилдаглиптин (“Matrix Scientific”, Колумбия), или его растворитель (0,9% раствор NaCl) вводили крысам внутривентриально, нагрузочные пробы проводили перорально (через резиновый зонд в желудок).

В I серии экспериментов у крыс определяли активность ДПП-4 плазмы, для чего забирали кровь через 30 и 60 мин после введения вилдаглиптина в разных дозах (табл. 1). Кровь получали из общей сонной артерии под золетилловым наркозом (Золетил, «Virbac», 5 мг/100 г массы тела (м.т.) внутримышечно), после чего животных декапитировали. Пробы собирали в охлажденные пробирки с K_3 -ЭДТА («Sarstedt», Германия), немедленно центрифугировали при 2000 г и 4 °С в течение 15 мин на центрифуге MIKRO 22R («Hettich», Германия). Пробы плазмы крови хранили при -20 °С до проведения анализа.

Во II серии опытов исследовали функции почек на фоне введения вилдаглиптина (1 мг/100 г м.т.). Через 30 мин после введения препарата животных помещали в индивидуальные клетки-пеналы с проволочным дном и мерной пробиркой для сбора проб мочи при спонтанных мочеиспусканиях в течение 4 ч.

В III серии экспериментов определяли параметры сыворотки крови (осмоляльность, концентрация ионов натрия, хлоридов, креатинина) у животных в условиях измененного водно-солевого баланса (табл. 1). Контролем служила группа животных без введения вилдаглиптина (I серия). Кровь забирали в чистые пластиковые пробирки через 30 мин после экспериментального воздействия как описано выше и затем центрифугировали при 8000 г в течение 15 мин при комнатной температуре на центрифуге MIKRO 20 («Hettich», Германия) для получения сыворотки.

В IV серии экспериментов исследовано влияние вилдаглиптина на функцию почек в условиях измененного водно-солевого баланса. Вилдаглиптин инъекци-

ровали за 30 мин до нагрузочных проб (гипертоническая или изотоническая нагрузки NaCl, водная нагрузка) (табл. 1). Сбор мочи проводили аналогично описанному выше.

Активность ДПП-4 в плазме крови определяли колориметрическим методом (DPPIV/CD26 Assay Kit, США), измерение оптической плотности и расчет активности ДПП-4 проводили на микропланшетном ридере ELx808 («Bio-Tek Instruments», США). Осмоляльность сыворотки крови и мочи определяли криоскопическим методом на микроосмометре 3300 («Advanced Instruments», США), концентрацию креатинина – кинетическим методом по реакции Яффе без депротеинизации на автоматическом биохимическом анализаторе Erba XL-200 («Erba-Lachema», Чехия), концентрацию ионов натрия и хлоридов в сыворотке крови – с помощью ионоселективного блока автоматического биохимического анализатора Erba XL-200, ионов натрия в моче – на пламенном фотометре Sherwood-420 («Sherwood Scientific», Великобритания).

Диурез (V), экскрецию осмотически активных веществ (U_{Osm} V), ионов натрия (U_{Na} V) и хлоридов (U_{Cl} V), клиренс креатинина (C_{Cr}), осмотически свободной воды (C_{H_2O}) и воды свободной от натрия ($C_{H_2O}^{Na}$) рассчитывали по стандартным формулам и нормализовали на 100 г м.т. [19]. Суммарную экскрецию осмотически активных веществ, ионов, осмотически свободной и свободной от натрия воды за 1 ч эксперимента рассчитывали на основании проб мочи, полученных в интервале 0–60 мин [15]. Средние взвешенные величины функциональных параметров почки за 15-минутные интервалы (например, 0–15 мин, 16–30 мин и т. д.) были рассчитаны для каждого животного и усреднены в пределах экспериментальных групп. Полученные данные представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. Сравнения между группами проводили с помощью критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони на число сравнений. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что внутривентриальное введение вилдаглиптина вызывает дозозависимое снижение активности ДПП-4 (рис. 1). Доза вилдаглиптина 1 мг/100 г м.т. оказалась максимально эффективной из изученных, наибольшая ее активность проявлялась через 1 ч от момента введения препарата ($p < 0,05$). Введение ингибитора ДПП-4 в этой дозе животным с неизменным водно-солевым балансом не оказало влияния на функциональные параметры почек (табл. 2). Таким образом, снижение активности фермента

ДПП-4 при отсутствии стимула для секреции кишечных регуляторных пептидов не влечет за собой каких-либо изменений осмо- и ионорегулирующей функций почек.

В IV серии опытов эффект вилдаглиптина на функции почек оценивали при изменении водно-солевого баланса, для чего моделировали состояния гипернатриемии, гиперосмии или гипоосмии пероральным введением гипертонического и изотонического растворов NaCl или воды (табл. 3).

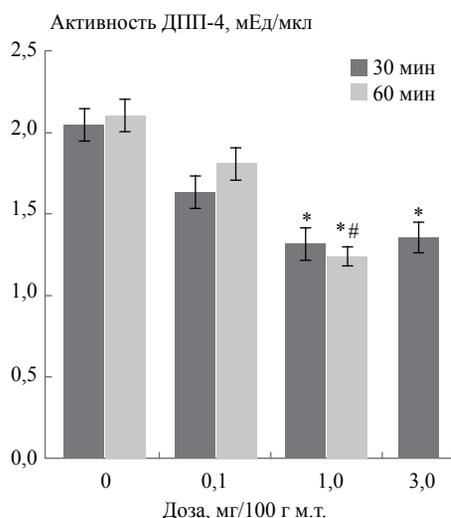


Рис. 1. Активность фермента ДПП-4 через 30 и 60 мин после введения вилдаглиптина в разных дозах. Значимые отличия (p<0,05) по сравнению: * – с контролем, # – с предшествующей дозой.

Пероральная гипертоническая натриевая нагрузка увеличила осмоляльность сыворотки крови (гиперосмия) за счет развития гипернатриемии и гиперхлоремии (табл. 3). Пероральная изотоническая натриевая нагрузка не влияла на осмоляльность сыворотки крови, но вызвала некоторое увеличение концентрации ионов натрия и хлоридов относительно контрольных значений (табл. 3). Водная нагрузка приводила к развитию гипоосмии за счет значимого снижения концентрации ионов натрия и хлорид-ионов в сыворотке крови (табл. 3).

С учетом данных о снижении активности ДПП-4 после введения ингибитора и изменений показателей сыворотки крови у крыс после нагрузочных проб, в экспериментах с изменением водно-солевого баланса вилдаглиптин инъецировали за 30 мин до нагрузочных проб. Контролем служили соответствующие серии экспериментов с натриевыми или водной нагрузками без предварительного введения вилдаглиптина. Инъекция вилдаглиптина (0,1 мг/100 г м.т.) до пероральной гипертонической натриевой нагрузки вызывала увеличение диуреза до $0,8 \pm 0,1$ мл и экскреции осмотически активных веществ до 746 ± 55 мкОсмоль на 100 г м.т. (в контроле $0,5 \pm 0,1$ мл и 531 ± 37 мкОсмоль, соответственно, $p < 0,05$), что было обусловлено практически двукратным увеличением выведения ионов натрия (рис. 2). Этот процесс сопровождался статистически значимым увеличением реабсорбции осмотически свободной воды до $-1,7 \pm 0,1$ мл на 100 г м.т. (в контроле $-1,3 \pm 0,1$ мл, $p < 0,05$) и воды, свободной от натрия (рис. 2). Вилдаглиптин (1 мг/100 г м.т.) также способствовал выведению ионов натрия (рис. 2). Реабсорбция свободной от натрия (рис. 2) и осмотически свободной воды ($-1,7 \pm 0,1$ мл на 100 г м.т.), а также экскреция осмотически активных веществ (734 ± 58 мкОсмоль на 100 г м.т.) были сопоста-

Таблица 1

Серии экспериментов и экспериментальные группы

Серия	Пероральная нагрузка на 100 г м.т.	Вилдаглиптин, (мг /100 г м.т.)	Тип эксперимента	n
I	-	0; 0,1; 1; 3	забор крови через 30 мин	40
		0; 0,1; 1	забор крови через 60 мин	30
II	-	0; 1	сбор мочи	20
III	1,8 мл 2,5% раствора NaCl	0	забор крови через 30 мин	10
	5 мл 0,9% раствора NaCl			10
	2 мл воды			10
IV	1,8 мл 2,5% раствора NaCl	0; 0,1; 1; 2	сбор мочи	40
	5 мл 0,9% раствора NaCl	0; 1; 2		30
	2 мл воды	0; 0,1; 1		30

вимы с таковыми при действии вилдаглиптина в дозе 0,1 мг на 100 г м.т. Аналогичные изменения происходили при увеличении дозы препарата до 2 мг на 100 г м.т. Диурез и экскреция осмотически активных веществ по сравнению с контролем статистически значимо возрастали до $1,0 \pm 0,1$ мл и 832 ± 61 мкОсмоль на 100 г м.т., соответственно, за счет увеличения экскреции натрия более чем в 2 раза (рис. 2). В той же степени изменялась реабсорбция воды, свободной от натрия (рис. 2). Реабсорбция осмотически свободной воды достигала — $1,8 \pm 0,1$ мл на 100 г м.т. ($p < 0,05$). Во всех экспериментальных группах с гипертонической нагрузкой NaCl у крыс не менялась скорость клубочковой фильтрации (клиренс креатинина).

При изотонической натриевой нагрузке предварительная инъекция вилдаглиптина в дозе 1 мг на 100 г м.т. увеличивала экскрецию ионов натрия (рис. 2), что обусловило рост экскреции осмотически активных веществ до 636 ± 42 мкОсмоль на 100 г м.т. (в контроле 491 ± 34 мкОсмоль, $p < 0,05$). Диурез и клиренс осмотически свободной воды статистически значимо не отличались от контрольных значений ($1,4 \pm 0,2$ мл и $-0,8 \pm 0,1$ мл по сравнению с $0,9 \pm 0,1$ мл и $-0,7 \pm 0,1$ мл на 100 г м.т., соответственно). Выведение свободной от натрия воды (рис. 2) и скорость клубочковой фильтрации также не менялись. При использовании вилдаглиптина в дозе 2 мг на 100 г м.т. наблюдалось стати-

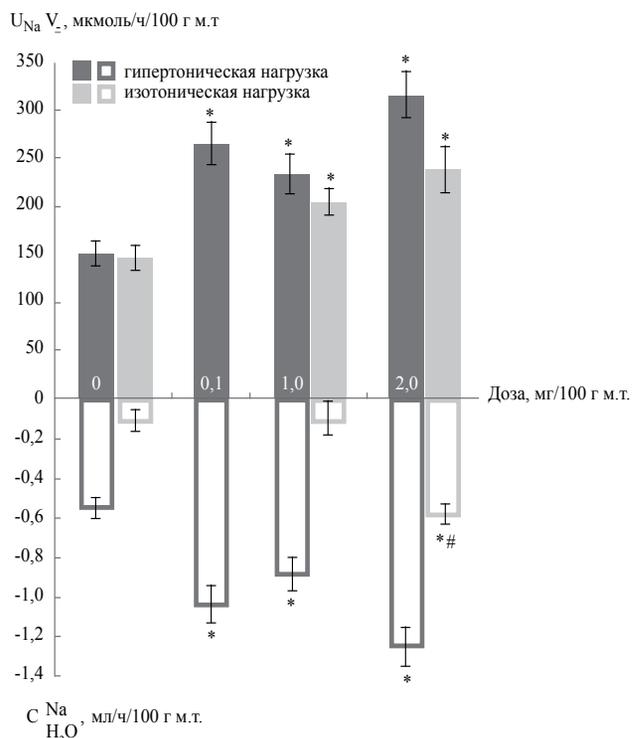


Рис. 2. Влияние вилдаглиптина на выведение натрия и свободной от натрия воды в условиях натриевых нагрузок. Данные представлены в виде $M \pm m$. Значимое отличие ($p < 0,05$) по сравнению: * – с контролем, # – с предшествующей дозой.

Таблица 2

Ионо- и осморегулирующая функции почек крыс после введения вилдаглиптина в дозе 1 мг/100 г м.т.

Параметры	Контроль	Препарат
Объем мочи, мл	$0,059 \pm 0,004$	$0,059 \pm 0,005$
C_{H_2O} , мл	$-0,31 \pm 0,02$	$-0,37 \pm 0,03$
$C_{H_2O}^{Na}$, мл	$0,032 \pm 0,009$	$0,013 \pm 0,009$
Средний C_{Cr} , мл/мин	$0,32 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$
$U_{Osm} V$, мкОсмоль	111 ± 7	128 ± 10
$U_{Na} V$, мкмоль	$3,8 \pm 0,8$	$6,6 \pm 1,5$

Примечание. Величины указаны в виде $M \pm m$ за 1 ч на 100 г м.т. * – значимое отличие по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 3

Осмоляльность и концентрация ионов в сыворотке крови крыс через 30 мин после пероральных водной и натриевых нагрузок

Параметр	Контроль	ВН	Нагрузка NaCl	
			изотоническая	гипертоническая
P_{Osm} , мОсмоль/кг H_2O	300 ± 1	$292 \pm 1^*$	300 ± 1	$311 \pm 1^*$
P_{Na} , ммоль/л	144 ± 1	$136 \pm 1^*$	$147 \pm 1^*$	$149 \pm 1^*$
P_{Cl} , ммоль/л	103 ± 1	$95 \pm 1^*$	$109 \pm 1^*$	$111 \pm 1^*$

Примечание. P_{Osm} – осмоляльность сыворотки крови, $P_{Na/Cl}$ – концентрация ионов натрия и хлоридов, ВН – водная нагрузка. Величины указаны в виде $M \pm m$. * – значимое отличие по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

стически значимое увеличение выведения осмотически активных веществ до 663 ± 55 мкОсмоль на 100 г м.т. и ионов натрия (рис. 2) относительно контроля как и при действии предшествующей дозы. Значительно возрасла реабсорбция свободной от натрия воды (рис. 2) и, в меньшей степени, осмотически свободной воды с $-0,7 \pm 0,1$ до $-1,1 \pm 0,1$ мл, наблюдалось умеренное увеличение клиренса креатинина с $0,32 \pm 0,01$ до $0,35 \pm 0,01$ мл/мин/100 г м.т. ($p < 0,05$).

Выявленное увеличение выведения изотонической и гипертонической пероральных натриевых нагрузок при действии вилдаглиптина подтверждает, что продолжение циркуляции кишечных регуляторных пептидов в кровотоке оказывает влияние на ионорегулирующую функцию почек.

Известно, что введение миметика ГПП-1 эксенатида способствует ускорению и увеличению выведения почками избытка воды из организма [15]. Ожидалось, что увеличение периода полужизни кишечных регуляторных пептидов, путем угнетения разрушающего их фермента, может оказывать подобное влияние. Однако в ходе эксперимента были получены несколько иные данные. При введении ингибитора ДПП-4 (0,1 мг на 100 г м.т.) за 30 мин до водной нагрузки было выявлено кратковременное (первые 15 мин) статистически значимое увеличение выведения ионов на-

трия, изменения остальных показателей не происходило.

При увеличении дозы вилдаглиптина до 1 мг на 100 г м.т. наблюдался антидиуретический эффект (рис. 3). Диурез и выведение свободной от натрия воды уменьшались до $0,13 \pm 0,02$ и $0,09 \pm 0,02$ мл на 100 г м.т., соответственно, реабсорбция осмотически свободной воды достигала $-0,31 \pm 0,02$ мл на 100 г м.т. Значения контрольной группы после водной нагрузки составляли $1,0 \pm 0,1$; $0,9 \pm 0,1$ и $0,4 \pm 0,1$ мл на 100 г м.т., соответственно. Выведение осмотически активных веществ, ионов натрия и клиренс креатинина не менялись. Таким образом, малая доза вилдаглиптина вызывала кратковременный натрийурез, а максимальная эффективная доза препарата – антидиуретическую реакцию почек.

Поддержание или нормализация состояния внутренней среды организма при минимальном воздействии на физиологические процессы представляет огромный интерес для исследователей и имеет значение в клинической практике. Увеличение периода циркуляции кишечных регуляторных пептидов под воздействием вилдаглиптина способствует ускорению выведения из организма избыточного количества натрия, что приводит к восстановлению гомеостаза в условиях перорального поступления избытка натрия. Аналогичный эффект описан для нормализации уровня глюкозы в крови после приема пищи [20]. Эта особенность действия вилдаглиптина может способствовать созданию оптимальных условий для функционирования сердечно-сосудистой системы у пациентов с сахарным диабетом 2 типа за счет экскреции поступающего с пищей натрия.

Механизм ускорения выведения натрия после нагрузочных проб при действии ингибитора ДПП-4 может быть связан с сочетанным влиянием на почки кишечных регуляторных пептидов (в том числе ГПП-1), снижающих реабсорбцию ионов в проксимальном сегменте нефрона, и других гормонов, регулирующих транспорт натрия в дистальном отделе. В частности, увеличение объема циркулирующей крови после изотонической нагрузки NaCl приводит к уменьшению секреции вазопрессина и альдостерона [21], что вызывает снижение как реабсорбции воды, так и натрия. Дополнительное их поступление из проксимального канальца под воздействием кишечных регуляторных пептидов ускоряет выведение натрия и воды почками. В условиях гипернатриемии, вызванной гипертонической нагрузкой NaCl, повышается секреция ГПП-1, вазопрессина, возможно, других натрийуретических факторов [12, 21]. Их совместное влияние на транспорт натрия и воды в почках приводит к зна-

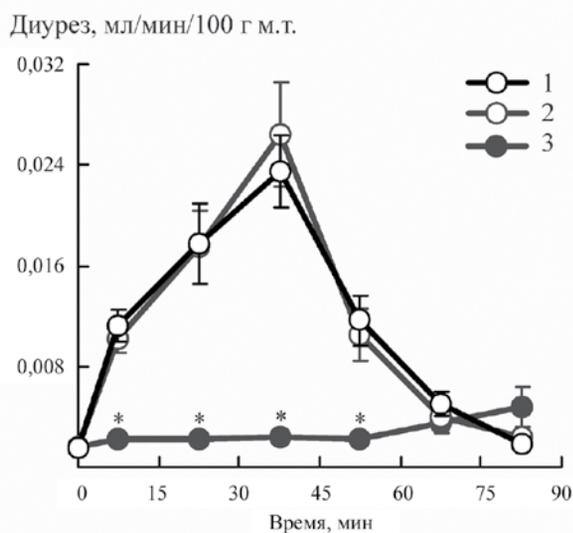


Рис. 3. Влияние ингибитора ДПП-4 на динамику диуреза после водной нагрузки у крыс. Данные представлены в виде $M \pm m$. 1 – водная нагрузка (контроль), 2 и 3 – водная нагрузка + вилдаглиптин в дозе 0,1 и 1 мг на 100 г м.т., соответственно. * – значимое отличие по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

чимому угнетению реабсорбции натрия в почечных канальцах при одновременном усилении обратного всасывания осмотически свободной воды. Механизм развития антидиуреза при введении вилдаглиптина перед водной нагрузкой в настоящий момент не вполне понятен и требует дальнейшего изучения. Вероятно, в максимальной эффективной дозе ингибитор ДПП-4 может не только продлевать период полужизни кишечных регуляторных пептидов, но и увеличивать впоследствии количество продуктов распада данных пептидов. В случае с ГПП-1 это может вызвать антидиурез, поскольку известно, что экзендин-(9-39) (продукт деградации ГПП-1) является антагонистом рецепторов ГПП-1 и обладает антидиуретическими свойствами [15].

Выводы

1. Снижение активности фермента ДПП-4 вилдаглиптином при отсутствии стимула для секреции кишечных регуляторных пептидов не приводит к изменению экскреции осмотически активных веществ и воды почками.

2. Вилдаглиптин в максимально эффективной дозе уменьшает выведение воды после водной нагрузки. Механизм развития подобного эффекта требует дальнейшего изучения.

3. Вилдаглиптин оказывает влияние на ионорегулирующую функцию почек, увеличивая выведение избыточного количества натрия как после пероральной гипертонической натриевой нагрузки (на 56%), так и после изотонической (на 40%), вероятно, за счет prolongации периода циркуляции кишечных регуляторных пептидов. Гипертоническая нагрузка NaCl вызывает значительный рост реабсорбции осмотически свободной и свободной от натрия воды (на 33% и 62%, соответственно). После изотонической нагрузки NaCl усиления реабсорбции воды не наблюдается. Данные процессы ускоряют восстановление водно-солевого гомеостаза в условиях поступления избытка натрия через желудочно-кишечный тракт.

Литература

1. Rehfeld J.F. Gastrointestinal hormones and their targets. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 817: 157-75.
2. Irwin N., Flatt P.R. Enteroendocrine hormone mimetics for the treatment of obesity and diabetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2013; 13(6): 989-95.
3. Andersen A., Lund A., Knop F.K., Vilsboll T. Glucagon-like peptide 1 in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2018; 14(7): 390-403.

4. Jorsal T., Rhee N.A., Pedersen J., Wahlgren C.D., Mortensen B., Jensen S.L. et al. Enteroendocrine K and L cells in healthy and type 2 diabetic individuals. *Diabetologia.* 2018; 61(2): 284-94.
5. Calsolaro V., Edison P. Novel GLP-1 (glucagon-like peptide-1) analogues and insulin in the treatment for Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *CNS Drugs.* 2015; 29(12): 1023-39.
6. Jia X., Alam M., Ye Y., Bajaj M., Birnbaum Y. GLP-1 receptor agonists and cardiovascular disease: a meta-analysis of recent cardiac outcome trials. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2018; 32(1): 65-72.
7. Holst J.J. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol. Rev.* 2007; 87(4): 1409-39.
8. Crajoinas R.O., Oricchio F.T., Pessoa T.D., Pacheco B.P., Lessa L.M., Malnic G. et al. Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2011; 301(2): F355-63.
9. Pezeshki A., Muench G.P., Chelikani P.K. Short communication: expression of peptide YY, proglucagon, neuropeptide Y receptor Y2, and glucagon-like peptide-1 receptor in bovine peripheral tissues. *J. Dairy Sci.* 2012; 95(9): 5089-94.
10. Fujita H., Morii T., Fujishima H., Sato T., Shimizu T., Hosoba M. et al. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential. *Kidney Int.* 2014; 85(3): 579-89.
11. Bodnaruc A.M., Prudhomme D., Blanchet R., Giroux I. Nutritional modulation of endogenous glucagon-like peptide-1 secretion: a review. *Nutr. Metab. (Lond).* 2016; 13: 92.
12. Kutina A.V., Golosova D.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Y.V. Role of vasopressin in the regulation of renal sodium excretion: interaction with glucagon-like peptide-1. *J. Neuroendocrinol.* 2016; 28(4): 1-8.
13. Наточин Ю.В., Кутина А.В., Марина А.С., Шахматова Е.И. Стимул секреции глюкагоноподобного пептида-1 у крыс. *Докл. АН.* 2018; 479(5): 593-6.
14. Марина А.С., Кутина А.В., Шахматова Е.И., Балботкина Е.В., Наточин Ю.В. Стимуляция секреции глюкагоноподобного пептида-1 водной нагрузкой у человека. *Докл. АН.* 2014; 459(1): 121-4.
15. Kutina A.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Yu.V. Physiological mechanisms of increase in renal solute-free water clearance by glucagon-like peptide-1 mimetic. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2013; 40(8): 510-7.
16. Балботкина Е.В., Баллюзек М.Ф., Воловникова В.А., Наточин Ю.В., Шахматова Е.И. Ионорегулирующая и водовывделительная функции почек при сахарном диабете 2 типа. *Сахарный диабет.* 2016; 19(1): 64-71.
17. Mentlein R., Gallwitz B., Schmidt W.E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* 1993; 214(3): 829-35.
18. Lambeir A.M., Proost P., Scharpe S., De Meester I. A kinetic study of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2 truncation by dipeptidyl peptidase IV, in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 64: 1753-6.
19. Наточин Ю.В., ред. *Почка: Справочник врача.* Санкт-Петербург; Изд-во С.-Петербургского университета; 1997.
20. Davis T.M. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: pharmacokinetics, efficacy, tolerability and safety in renal impairment. *Diabetes Obes. Metab.* 2014; 16(10): 891-9.
21. Вандер А. *Физиология почек. 5-е изд.* СПб; Издательство «Питер»; 2000.

References

1. Rehfeld J.F. Gastrointestinal hormones and their targets. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 817: 157-75.
2. Irwin N., Flatt P.R. Enteroendocrine hormone mimetics for the treatment of obesity and diabetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2013; 13(6): 989-95.
3. Andersen A., Lund A., Knop F.K., Vilsboll T. Glucagon-like peptide 1 in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2018; 14(7): 390-403.
4. Jorsal T., Rhee N.A., Pedersen J., Wahlgren C.D., Mortensen B., Jepsen S.L. et al. Enteroendocrine K and L cells in healthy and type 2 diabetic individuals. *Diabetologia.* 2018; 61(2): 284-94.
5. Calsolaro V., Edison P. Novel GLP-1 (glucagon-like peptide-1) analogues and insulin in the treatment for Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *CNS Drugs.* 2015; 29(12): 1023-39.
6. Jia X., Alam M., Ye Y., Bajaj M., Birnbaum Y. GLP-1 Receptor agonists and cardiovascular disease: a meta-analysis of recent cardiac outcome trials. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2018; 32(1): 65-72.
7. Holst J.J. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol. Rev.* 2007; 87(4): 1409-39.
8. Crajoinas R.O., Oricchio F.T., Pessoa T.D., Pacheco B.P., Lessa L.M., Malnic G. et al. Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2011; 301(2): F355-63.
9. Pezeshki A., Muench G.P., Chelikani P.K. Short communication: expression of peptide YY, proglucagon, neuropeptide Y receptor Y2, and glucagon-like peptide-1 receptor in bovine peripheral tissues. *J. Dairy Sci.* 2012; 95(9): 5089-94.
10. Fujita H., Morii T., Fujishima H., Sato T., Shimizu T., Hosoba M. et al. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential. *Kidney Int.* 2014; 85(3): 579-89.
11. Bodnaruc A.M., Prudhomme D., Blanchet R., Giroux I. Nutritional modulation of endogenous glucagon-like peptide-1 secretion: a review. *Nutr. Metab. (Lond).* 2016; 13: 92.
12. Kutina A.V., Golosova D.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Yu.V. Role of vasopressin in the regulation of renal sodium excretion: interaction with glucagon-like peptide-1. *J. Neuroendocrinol.* 2016; 28(4): 1-8.
13. Natochin Yu.V., Kutina A.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I. Stimulus for glucagon-like peptide 1 secretion in rats. *Dokl. Biol. Sci.* 2018; 479(1): 57-9.
14. Marina A.S., Kutina A.V., Shakhmatova E.I., Balbotkina E.V., Natochin Yu.V. Stimulation of glucagon-like peptide-1 secretion by water loading in human. *Dokl. Biol. Sci.* 2014; 459(1): 323-5.
15. Kutina A.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Yu.V. Physiological mechanisms of increase in renal solute-free water clearance by glucagon-like peptide-1 mimetic. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2013; 40(8): 510-7.
16. Balbotkina E.V., Ballyuzek M.F., Volovnikova V.A., Natochin Yu.V., Shakhmatova E.I. Ion- and osmoregulating renal functions in patients with type 2 diabetes mellitus. *Sakharnyy diabet.* 2016; 19(1): 64-71. (in Russian)
17. Mentlein R., Gallwitz B., Schmidt W.E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* 1993; 214(3): 829-35.
18. Lambeir A.M., Proost P., Scharpe S., De Meester I. A kinetic study of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2 truncation by dipeptidyl peptidase IV, in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 64: 1753-6.
19. Natochin Yu.V., eds. *Kidney: Doctor directory. [Pochka: Spravochnik vracha].* Saint-Petersburg; Izd-vo S.-Peterburgskogo universiteta; 1997. (in Russian)
20. Davis T.M. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: pharmacokinetics, efficacy, tolerability and safety in renal impairment. *Diabetes Obes. Metab.* 2014; 16(10): 891-9.
21. Vander A.J. *Renal physiology. 5th ed.* NY; McGraw-Hill; 1995.

Сведения об авторах:

Балботкина Евгения Владимировна, мл. науч. сотр. лаб. физиологии почки и водно-солевого обмена, e-mail: Liravega@mail.ru;

Стириденко Екатерина Александровна, ст. лаборант-исследователь лаб. физиологии почки и водно-солевого обмена, e-mail: kate-yovin@mail.ru;

Каравашкина Татьяна Анатольевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. физиологии почки и водно-солевого обмена, e-mail: tanajkan@yandex.ru;

Кутина Анна Вячеславовна, канд. мед. наук, зав. лаб. физиологии почки и водно-солевого обмена, e-mail: kutina_anna@mail.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092.9

Иванов А.Н.¹, Куртукова М.О.², Козадаев М.Н.¹, Суровцева К.А.², Савельева М.С.³, Бугаева И.О.²,
Парахонский Б.В.³, Блинникова В.В.¹, Гладкова Е.В.¹, Бабушкина И.В.¹, Чибрикова Ю.А.¹, Норкин И.А.¹

Влияние на регенерацию костной ткани локальных изменений ионного и ферментативного гомеостаза скаффолдами из поликапролактона минерализованными ватеритом

¹Научно-исследовательский институт травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО

«Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского» Минздрава России,

410002, г. Саратов, Россия, ул. Чернышевского, д. 148;

²ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского» Минздрава России,

410012, г. Саратов, Россия, ул. Большая Казачья, д. 112;

³ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»,

Образовательно-научный институт наноструктур и биосистем

Цель исследования – оценка влияния на регенерацию костной ткани локальных изменений ферментативного и ионного гомеостаза минерализованными ватеритом скаффолдами из поликапролактона. **Методика.** Эксперимент выполнен на 47 нелинейных крысах-самцах. Животные были разделены на 4 экспериментальные группы: контроль (интактные животные), группа сравнения (ложнооперированные крысы), группа отрицательного контроля (крысы с имплантацией матрицы, на которой сорбирован нативный овальбумин) и экспериментальная группа – крысы, которым имплантировали поликапролактоновый скаффолд, минерализованный ватеритом (ПКЛ/СаСО₃-скаффолд) с адсорбированной щелочной фосфатазой в дефект бедренной кости. На 7-е и 28-е сут в крови определяли содержание щелочной фосфатазы, а также концентрацию остеокальцина. Количественное определение остеокальцина производили методом иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов фирмы «Immunodiagnostic systems» (Франция) и полуавтоматического ИФА-анализатора «Anthos Reader 2020» («Biochrom», Великобритания). Для выявления изменений ферментативной активности в сыворотке крови определяли кинетическим методом активность щелочной фосфатазы на биохимическом анализаторе «Сапфир-400» («Hirose Electronic System», Япония) с использованием набора реактивов фирмы «ДиаС» (Россия). Морфологическую верификацию процессов остеогенеза осуществляли при изучении гистологических препаратов на 28-е сут эксперимента. Поперечные срезы диафиза бедренной кости изучали при помощи микроскопа AxioImager Z2 («Carl Zeiss», Германия) и микровизора проходящего света серии μVizo-103 (ООО «ЛОМО ФОТОНИКА», Россия). Оценивали интеграцию матриц с краями пропила, изменения кости в области имплантации матриц, преобладающий тип клеточных элементов матриц, наличие в них костных балок и сосудов. **Результаты.** Установлено, что изменение локального ионного гомеостаза (СаСО₃) и ферментативного гомеостаза щелочной фосфатазы, вызывает в матрице имплантированной в область дефекта формирование костных балок и биохимические изменения в крови, характеризующиеся повышением активности щелочной фосфатазы и увеличением концентрации остеокальцина. **Заключение.** При имплантации ПКЛ/СаСО₃-матриц с щелочной фосфатазой локальные изменения ферментативного и ионного гомеостаза, вызванные введением в состав кальцийсодержащих скаффолдов щелочной фосфатазы, в значительной степени стимулируют остеогенез. Биосовместимость и остеоиндуктивные свойства ПКЛ/СаСО₃-матриц с щелочной фосфатазой позволяют говорить о перспективности их клинической апробации для стимуляции процессов регенерации костной ткани.

Ключевые слова: скаффолд; поликапролактон; щелочная фосфатаза; остеогенез.

Для цитирования: Иванов А.Н., Куртукова М.О., Козадаев М.Н., Суровцева К.А., Савельева М.С., Бугаева И.О., Парахонский Б.В., Блинникова В.В., Гладкова Е.В., Бабушкина И.В., Чибрикова Ю.А., Норкин И.А. Влияние на регенерацию костной ткани локальных изменений ионного и ферментативного гомеостаза скаффолдами из поликапролактона минерализованными ватеритом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 81-87.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.81-87

Для корреспонденции: Козадаев Максим Николаевич, канд. мед. наук, мл. науч. сотр. лаб. отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований, e-mail: m_kozadaev_ortoped@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.11.2018

Ivanov A.N.¹, Kurtukova M.O.², Kozadaev M.N.¹, Surovtseva K.A.², Savel'eva M.S.³, Bugaeva I.O.², Parakhonskiy B.V.³, Blinnikova V.V.¹, Gladkova E.V.¹, Babushkina I.V.¹, Chibrikova U.A.¹, Norkin I.A.¹

The effect of local changes in ionic and enzymatic homeostasis induced by polycaprolactone scaffolds mineralized with vaterite on bone tissue regeneration

¹Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of the V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Chernyshevskogo Str. 148, Saratov 410002, Russia;

²Department of Histology, V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Bolshaya Kazachiya Str. 112, Saratov 410012;

³N.G. Chernyshevsky Saratov State National Research University, Education and Research Institute of Nanostructures and Biosystems, Astrakhanskaya Str. 83, Saratov 410012, Russia

Aim. To study the effect of local changes in enzymatic and ionic homeostasis induced by vaterite-mineralized polycaprolactone scaffolds with adsorbed alkaline phosphatase on bone tissue regeneration. The experiment was conducted on 47 mongrel male rats divided into four experimental groups: control (intact animals), comparison group (sham-operated rats), negative control (rats implanted with a matrix with adsorbed native ovabumin), and experimental group (rats implanted with PLC-CaCO₃-scaffold with adsorbed alkaline phosphatase into the femoral bone defect). Alkaline phosphatase and osteocalcin contents were measured in blood of all animals on days 7 and 28. Osteocalcin was measured using the immune enzyme assay with an Immunodiagnostic Systems (France) kit and semi-automatic immune Anthos Reader 2020 (Biochrom, Great Britain) enzyme analyzer. Changes in serum alkaline phosphatase activity were detected using the kinetic method with a Sapphire-400 biochemical analyzer (Hirose Electronic Systems, Japan) and a DiaC (Russia) kit. Osteogenesis processes were verified morphologically on day 28 of the experiment by a histological assay. Transversal sections of the femoral diaphysis were examined with an Axiomager Z2 (Carl Zeiss, Germany) microscope and a μVizo-103 transmitted-light microvisor (OOO LOMO FOTONIKA, Russia). The evaluated indexes included matrix integration with saw-cut edges; bone changes in the area of matrix implantation; predominating type of matrix cell elements and the presence there of bone trabecula and blood vessels. **Results.** Changes in the local ionic homeostasis and homeostatic changes of alkaline phosphatase induced formation of bone trabecula in the matrix implanted into the defect area and biochemical changes in blood evident as upregulation of serum alkaline phosphatase associated with increased osteocalcin. **Conclusion.** In implantation of PLC-CaCO₃ matrices with alkaline phosphatase, local changes in the enzymatic and ionic homeostasis induced by supplementation of calcium-containing scaffolds with alkaline phosphatase considerably stimulate osteogenesis. The biocompatibility and osteoinductive properties of PLC-CaCO₃ matrices with alkaline phosphatase suggested that clinical testing of the use of the matrices for stimulation of bone tissue regeneration would be promising.

Keywords: scaffold, polycaprolactone, alkaline phosphatase, osteogenesis.

For citation: Ivanov A.N., Kurtukova M.O., Kozadaev M.N., Surovtseva K.A., Savel'eva M.S., Bugaeva I.O., Parakhonskiy B.V., Blinnikova V.V., Gladkova E.V., Babushkina I.V., Chibrikova U.A., Norkin I.A. The effect of local changes in ionic and enzymatic homeostasis induced by polycaprolactone scaffolds mineralized with vaterite on bone tissue regeneration. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 81-87. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.81-87

For correspondence: *Kozadaev Maxim Nikolaevich*, e-mail: m_kozadaev_ortoped@mail.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 15.11.2018

Введение

Замещение дефектов и стимуляция репаративных процессов является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины, решением которой занимается тканевая инженерия, изучающая процессы восстановления поврежденных тканей [1]. Важным направлением тканевой инженерии является разработка и изготовление скаффолдов. Скаффолды – трехмерные матрицы с объемной структурой, которые высту-

пают в качестве субстрата для заселения клеточными элементами, а также способны обеспечивать адресную доставку биологически активных веществ для стимуляции репаративных процессов [2]. В зоне имплантации матрица формирует опорный каркас, вокруг которого в дальнейшем будут протекать процессы васкуляризации и регенерации. На сегодняшний день предпочтение отдается синтетическим материалам для

создания скаффолдов, в связи с возможностью модификации их механических свойств и параметров биодеградации [3]. Одним из таких полимеров является поликапролактон (ПКЛ), хорошая адгезия которого и пролиферация клеток была доказана в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* [4, 5]. Также одним из требований к веществам, используемым для создания скаффолдов, является наличие особых механических характеристик и волокнистая структура, которая должна быть схожа с структурой внеклеточного матрикса [6].

Учитывая высокую степень минерализации межклеточного вещества костной ткани, для стимуляции регенерации в состав матриц включают неорганические компоненты, позволяющие повышать остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства. В качестве неорганических веществ, способных изменять локальный ионный гомеостаз, применяется карбонат кальция в форме кальцита и ватерита (CaCO_3) [7]. Ватерит стимулирует пролиферацию остеобластов, а его пористая структура обеспечивает адсорбцию биологически активных веществ, необходимых для процесса регенерации и их высвобождения при перекристаллизации [8]. В качестве доставляемых скаффолдами веществ могут выступать ферменты, в частности, щелочная фосфатаза (ЩФ), участвующая в минеральном обмене посредством отщепления остатков фосфорной кислоты (ФК) от органических соединений и фосфатных групп (Р) в организме [9]. Присутствие ЩФ в имплантируемых скаффолдах способно изменить локальный ферментативный гомеостаз, что открывает новые перспективы стимуляции остеогенеза для оптимизации репаративных процессов.

Цель исследования — оценка остеоиндуктивных свойств матриц из ПКЛ/ CaCO_3 с ЩФ, обеспечивающих модуляцию ионного и ферментативного гомеостаза для стимуляции регенерации костной ткани.

Методика

Экспериментальная работа была проведена в соответствии с принципами биоэтики, Конвенцией по защите животных, используемых в эксперименте и других научных целях (принятой Советом Европы в 1986 г.), и Хельсинской Декларации по вопросам медицинской этики и Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных (1989). Исследование одобрено этическим комитетом института.

Эксперименты выполнены на 47 нелинейных белых крысах-самцах массой 200–260 г. Животные были разделены на 4 группы: 1-я — контроль, 2-я — группа сравнения (ложнооперированные крысы), 3-я (груп-

па отрицательного контроля) — животные, которым имплантировали ПКЛ-матрицы с адсорбированным на них овальбумином и 4-я (опытная группа) — животные с имплантированным ПКЛ/ CaCO_3 с ЩФ.

Эксперименты проводили под наркозом: комбинации золетила (0,1 мг/кг, Virbac Sante Animale, Франция) и ксилазина (1 мг/кг, Interchemie, Нидерланды). После обработки операционного поля на депилированном участке кожи в области бедренной кости выполнялся разрез длиной 3,5 см. Затем рассеклись мышцы бедра, и выполнялся продольный пропил в бедренной кости размерами: длина — 1,6 см, глубина — 3 мм. В сформированный дефект помещался скаффолд. Далее режущей иглой рана ушивалась нитью «Мед Капрон» полиамид (3-0). Область наложения швов обрабатывалась 70% спиртом. Крысам группы сравнения проводилось оперативное вмешательство соответствующего объема без имплантации матрицы.

Забор крови у животных производили непосредственно перед выводом из эксперимента на 7-е и 28-е сут пункцией правых отделов сердца. Получение сыворотки для биохимических исследований проводилось 15-минутным центрифугированием при 3000 g.

Количественное определение остеокальцина (ОК) проводили методом иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов фирмы «Immunodiagnostic systems» (Франция) и полуавтоматического ИФА-анализатора «Anthos Reader 2020» («Biochrom», Великобритания).

Для выявления изменений ферментативной активности в сыворотке крови определяли кинетическим методом активность щелочной фосфатазы (ЩФ) на биохимическом анализаторе «Сапфир-400» («Hirose Electronic System», Япония) с использованием набора реактивов фирмы «ДиаС» (Россия).

Животных выводили из эксперимента на 7-е и 28-е сут передозировкой наркоза. Для проведения гистоморфологического исследования производили взятие фрагмента бедренной кости с имплантированной матрицей на 28-е сут эксперимента. Материал обрабатывали общепринятыми в гистологии методами.

Поперечные срезы диафиза бедренной кости изучали в микроскопе AxioImager Z2 («Carl Zeiss», Германия) и микровизоре проходящего света серии μ Vizo-103 (ООО «ЛОМО ФОТОНИКА», Россия). Оценивали интеграцию матриц с краями пропила, изменения кости в области имплантации матриц, преобладающий тип клеточных элементов матриц, наличие в них костных балок и сосудов.

При статистической обработке данных использован пакет программ Statistica 10.0. Проверяли гипотезы о виде распределений (критерий Шапиро–Уилкса).

При несоответствии нормальному распределению использовали U-критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У животных всех экспериментальных групп на 7-е и 28-е сут эксперимента был статистически значимо повышен уровень ОК по сравнению с контролем (табл.). При имплантации ПКЛ-матриц с адсорбированным овалбумином (3-я группа) концентрации ОК в сыворотке крови на 7-е и на 21-е сут не имели статистически значимых отличий от показателей 2-й группы – ложноперирированные животные (табл.).

У крыс 4-й опытной группы при имплантации ПКЛ/СаСО₃-скаффолдов с ЩФ концентрация в сыворотке крови ОК как на 7-е, так и на 28-е сут эксперимента, была статистически значимо выше, чем у животных группы сравнения (2-я гр.) и отрицательного контроля (3-я гр.).

Динамика активности биохимических показателей в сыворотке крови животных экспериментальных групп

Группы	ОК	ЩФ
1-я, контроль (n=12)	75,6 (47,7;91,0)	191,0 (139,0;221,5)
2-я, ложноперирированные 7 сут (n=9)	136,5 (129;163,1) p ₁ =0,008114	191,0 (155,0;202,0) p ₁ =0,915106
Ложноперирированные 28 сут (n=28)	185,5 (163;207) p ₁ =0,014215 p ₂ =0,177911	218,0 (184,0;267,0) p ₁ =0,117928 p ₂ =0,266381
3-я, отрицательный контроль 7 сут (n=22)	186,6 (160,1; 195,34) p ₁ =0,014215 p ₃ =0,327188	185,0 (166,0;220,0) p ₁ =0,492492 p ₃ =0,978501
Отрицательный контроль 28 сут (n=11)	158 (105,182) p ₁ =0,026810 p ₂ =0,298618 p ₃ =0,296180	218,5 (140,5;258,5) p ₁ =0,511960 p ₂ =0,662174 p ₃ =0,562834
4-я, ПКЛ+ Ватерит+ Щелочная фосфатаза 7 сут (n=15)	271,1 (233,8;521,0) p ₁ =0,008114 p ₃ =0,019965 p ₄ =0,019965	211,5 (184,0;228,5) p ₁ =0,214495 p ₃ =0,270664 p ₄ =0,206949
ПКЛ+ Ватерит+ Щелочная Фосфатаза 28 сут (n=23)	306,1 (219,0;393,28) p ₁ =0,003405 p ₂ =0,870991 p ₃ =0,029759 p ₄ =0,003295	322 (285;365) p ₁ =0,000019 p ₂ =0,000091 p ₃ =0,003509 p ₄ =0,001316

Примечание. Приведены медиана, нижний и верхний квартили. p₁ – по сравнению с контролем; p₂ – по сравнению с животными той же группы на 7-е сутки эксперимента; p_{3,4} – по сравнению с ложноперирированными животными и группой отрицательного контроля в тот же срок наблюдения. ОК – остеокальцин, ЩФ – щелочная фосфатаза.

Установлено, что на 7-е сут после имплантации или имитации имплантации матриц активность ЩФ в крови у всех групп животных не имели статистически значимых различий по сравнению с контролем. У крыс 4-й группы (матрица на основе ПКЛ/СаСО₃ с ЩФ) на 28-е сут эксперимента активность ЩФ в крови статистически значимо возросла относительно остальных групп животных.

Морфологически у крыс сравнения (2-я гр.) на 28-е сут, определялся дефект кортикальной пластинки в виде пропила, глубиной до костномозговой полости. В области пропила у всех животных наблюдалась локальная периостальная реакция. Регенерат у всех животных не закрывал полностью сформированный дефект. У 50% животных регенерат был представлен только соединительной тканью. У 50% крыс в состав регенерата вместе с соединительной тканью входили остеоидная ткань и небольшие островки гиалиновой хрящевой ткани.

У животных 3-й группы (отрицательный контроль) на 28-е сут отмечалась выраженная периостальная реакция, в 70% случаев захватывающая весь периметр диафиза, в 30% – локализованная в зоне дефекта. У 50% животных была выявлена эндостальная реакция, приводящая к формированию остеоидной ткани внутри полости диафиза. Матрица располагалась в области дефекта, была спаяна с его краями соединительной тканью. У 70% животных отмечалось разрастание соединительной ткани вокруг матрицы. В соединительной ткани вокруг скаффолда обнаруживалось множество тонкостенных сосудов, кровоизлияния и диapedез эритроцитов. При этом по периферии скаффолда наблюдалось формирование костных балок. Большую часть объема скаффолда заполняла оксифильная бесструктурная гомогенная масса. Клеточный состав матрицы был представлен гигантскими многоядерными клетками, обнаруживались элементы костного мозга, единичные фибробласты. Признаки формирования сосудов в матрице отсутствовали, в отдельных участках встречались неизменённые эритроциты. Признаки формирования костных балок отсутствовали.

На 28-е сут экспериментального исследования у животных 4-й опытной группы в области сформированного дефекта кортикальной кости и костномозговой полости матрица была плотно сращена с краями кортикальной пластинки слоем костной ткани. Периостальных и эндостальных реакций у животных данной группы не отмечалось. В скаффолде и по его периферии визуализировались многочисленные костные балки, анастомозирующие между собой. В межбалочных пространствах присутствовали фибробластические элементы и единичные гигантские многоядерные

клетки. Отмечалась выраженная васкуляризация матриц у животных данной группы — сосуды располагались как в костных балках, так и в межбалочных пространствах скаффолда.

Учитывая, что ОК высвобождается остеобластами в процессе остеогенеза и частично поступает в кровоток, увеличение его концентрации в сыворотке крови отражает повышение метаболической активности этих клеток [9]. Обнаруженное в группе ложнопериорированных крыс увеличение концентрации ОК на 7-е и 28-е сут, вероятно обусловлено периостальными реакциями, обнаруженными при морфологическом исследовании препаратов данной группы животных. Вместе с тем активность ЩФ у животных группы сравнения не имела отличий от контрольных значений, что отражало низкую интенсивность процессов минерализации [10]. Низкая интенсивность минерализации морфологически проявляется тем, что до 28-х сут эксперимента регенерат не закрывал область дефекта и был представлен преимущественно соединительной, а не костной тканью.

При имплантации матриц с овальбумином повышение концентрации ОК на 7-е и 28 сут было выражено в той же степени, что и в группе ложнопериорированных животных, что свидетельствует об отсутствии стимулирующего влияния этого типа матриц на активность остеобластов. Как и в группе сравнения у животных данной группы не отмечалось повышение активности ЩФ в крови, что отражает низкую интенсивность минерализации. Морфологически формирование костной ткани у животных данной группы проявлялось только в виде периостоза и единичных костных балок по периферии матрицы, вероятно выполняющих барьерную функцию. Причина подобных изменений может заключаться в том, что данный тип матриц индуцирует повышение концентрации провоспалительных цитокинов, в частности ФНО и ИЛ-1- β при имплантации крысам, как было продемонстрировано ранее при субкутанных тестах этих матриц [11]. Несмотря на то, что воспалительная реакция является неотъемлемой частью процесса регенерации при травме костей, ее чрезмерная интенсивность препятствует остеогенезу [12], в частности, ФНО обладает ингибирующим влиянием на остеобласты, подавляющим продукцию остеокальцина и щелочной фосфатазы [13].

Полученные данные свидетельствуют, что имплантация ПКЛ/СаСО₃-скаффолда с ЩФ вызывает увеличение концентрации ОК в 4 раза по сравнению с контрольными значениями и в 2,5 раза по сравнению с показателями групп сравнения и отрицательного контроля. Такое повышение активности остеобластов, по-видимому, обусловлено модуляцией ионного гоме-

остаза СаСО₃ так, как в условиях *in vitro* было продемонстрировано стимулирующее влияние карбоната кальция на экспрессию остеокальцина и пролиферацию этих клеток [14]. Рост активности ЩФ в сыворотке крови на 28-е сут указывает на повышение интенсивности процессов минерализации [13]. Вместе с тем, у животных 4-й опытной группы на 7-е сут активность ЩФ не превышает контрольных значений, что свидетельствует об отсутствии поступления фермента, сорбированного на скаффолдах, в кровоток. Следовательно, повышение активности ЩФ к 28-м сут, в большей степени обусловлено его продукцией остеобластами. Результатами локального воздействия ЩФ, находящейся в структуре скаффолда, совместно с эндогенной выработкой её остеобластами посредством сдвига ионного гомеостаза СаСО₃, ведет к активной минерализации матрицы, что морфологически проявляется образованием костных балок и остеоинтеграции матриц.

Таким образом, при имплантации ПКЛ/СаСО₃-матриц с ЩФ локальные изменения ферментативного и ионного гомеостаза, вызванные введением в состав кальцийсодержащих скаффолдов щелочной фосфатазы, в значительной степени стимулируют остеогенез. Биосовместимость и остеоиндуктивные свойства ПКЛ/СаСО₃-матриц с ЩФ позволяют говорить о перспективности их клинической апробации для стимуляции процессов регенерации костной ткани.

Литература

1. Иванов А.Н., Норкин И.А., Пучиньян Д.М. Возможности и перспективы использования скаффолд-технологий для регенерации костной ткани. *Цитология*. 2014; 56(8): 543-8.
2. Şaşmazel H., Gümüşderelioğlu M., Gürpınar A., Onur M. Comparison of Cellular Proliferation on Dense and Porous PCL Scaffolds. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2008; 18(3): 119-28.
3. Козадаев М.Н. Исследование биосовместимости скаффолда на основе поликапролактона в условиях *in vivo* // 3-я Межрегиональная конференция (с международным участием) «Наследственная и приобретенная патология свертывания крови — тромбозы и кровотечения: диагностика, профилактика, лечение, экономика». *Физиология и патофизиология*. 2016.
4. Иванов А.Н., Козадаев М.Н., Богомолова Н.В., Матвеева О.В., Пучиньян Д.М., Норкин И.А. Исследование динамики заселения клеточными элементами и биосовместимости скаффолда на основе поликапролактона в условиях *in vivo*. *Фундаментальные исследования*. 2015; № 1-2.
5. Hou J, Fan D, Zhao L, Yu B, Su J, Wei J, Shin JW. Degradability, cytocompatibility, and osteogenesis of porous scaffolds of nanobredigite and PCL-PEG-PCL composite. *International Journal of Nanomedicine*. 2016; p.3545-55.
7. Кузнецова Д.С., Тимашев П.С., Баграташвили В.Н., Загайнова Е.В. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии (обзор). *Соврем. технол. мед.* 2014; 6(4).

8. Erisken C., Kalyon D.M., Wang H. Functionally graded electrospun polycaprolactone and beta-tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2008; 29(30): 4065-73.
9. Миханов В.А., Колосова Н.И., Полякова В.С., Денисов Е.Н. Способ количественной оценки динамики заживления переломов трубчатых костей крыс в эксперименте. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2017; 6(1): 58-62.
10. Gulcihan Gulseren, I. Ceren Yasa, Oya Ustahuseyin, E. Deniz Tekin, Ayse B. Tekinay, Mustafa O. Guler. Alkaline Phosphatase-Mimicking Peptide Nanofibers for Osteogenic Differentiation. *Biomacromolecules*. 2015, June.
11. Захаров И.С., Колпинский Г.И., Ушакова Г.А., Вавин Г.В. Биохимические маркеры в диагностике нарушений ремоделирования костной ткани при остеопорозе. *Вестник Авиценны*. 2013; 57(4): 119-23.
12. Норкин И.А., Иванов А.Н., Куртукова М.О., Савельева М.С., Мартюкова А.В., Горин Д.А., Паракхонский Б.В. Особенности микроциркуляторных реакций при субкутанной имплантации поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2018; 14(1): 35-41.
13. Kovtun A., Messerer DAC., Scharffetter-Kochanek K., Huber-Lang M., Ignatius A. Neutrophils in Tissue Trauma of the Skin, Bone, and Lung: Two Sides of the Same Coin. *Journal of Immunology Research*. 2018.
14. Gilbert LC., Chen H., Lu X., Nanes MS. Chronic low dose tumor necrosis factor- α (TNF) suppresses early bone accrual in young mice by inhibiting osteoblasts without affecting osteoclasts. *Bone*. 2013; 56(1): 174-83.
15. Neunzehn J., Szuwart T., Wiesmann HP. Eggshells as natural calcium carbonate source in combination with hyaluronan as beneficial additives for bone graft materials, an in vitro study. *Head Face Med*. 2015.
16. Treatment, Economy. *Bulleten meditsinskikh Internet-konferentsiy (ISSN 2224-6150)*. 2016; 6(8): 1423-24. (in Russian)
4. Ivanov A.N., Kozadaev M.N., Bogomolova N.V., Matveeva O.V., Puchinian D.M., Norkin I.A. In vivo research of cell elements colonization changes with time and PCL scaffold biocompatibility. *Fundamentalnye issledovaniya*. 2015; 1(2): 275-8. (in Russian)
5. Hou J, Fan D, Zhao L, Yu B, Su J, Wei J, Shin JW. Degradability, cytocompatibility, and osteogenesis of porous scaffolds of nanobredigite and PCL-PEG-PCL composite. *International Journal of Nano-medicine*. 2016; 11: 3545-55.
6. Kuznetsova D.S., Timashev P.S., Bagratashvili V.N., Zagainova E.V. Scaffold- and Cell System-Based Bone Grafts in Tissue Engineering (Review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2014; 6(4): 201-12. (in Russian)
7. Erisken C., Kalyon D.M., Wang H. Functionally graded electrospun polycaprolactone and beta-tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2008; 29(30): 4065-73.
8. Mikhanov V.A., Kolosova N.I., Poliakova V.S., Denisov E.N. The Method to Measure the Evolution Healing Fractures of the Tubular Bones of Rats in the Experiment. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2017; 6 (1): 58-62. (in Russian)
9. Gulcihan Gulseren, I. Ceren Yasa, Oya Ustahuseyin, E. Deniz Tekin, Ayse B. Tekinay, Mustafa O. Guler. Alkaline Phosphatase-Mimicking Peptide Nanofibers for Osteogenic Differentiation. *Biomacromolecules*. 2015; 16: 2198-2208.
10. Zakharov I.S., Kolpinskiy G.I., Ushakov G.A., Vavin G.V. Biochemical markers in the diagnosis of bone remodeling in osteoporosis. *Vestnik Avitsenny*. 2013; 57(4): 119-23. (in Russian)
11. Norkin I.A., Ivanov A.N., Kurtukova M.O., Savelyeva M.S., Martuyukova A.V., Gorin D.A., Parakhonsky B.V. Peculiarities of micro-circulatory reactions after subcutaneous implantation of polycaprolactone matrices mineralized by vaterite. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2018; 14(1): 35-41. (in Russian)
12. Kovtun A., Messerer DAC., Scharffetter-Kochanek K., Huber-Lang M., Ignatius A. Neutrophils in Tissue Trauma of the Skin, Bone, and Lung: Two Sides of the Same Coin. *Journal of Immunology Research*. 2018. Apr 23; 2018:817398.
13. Gilbert LC., Chen H., Lu X., Nanes MS. Chronic low dose tumor necrosis factor- α (TNF) suppresses early bone accrual in young mice by inhibiting osteoblasts without affecting osteoclasts. *Bone*. 2013; 56(1): 174-83.
14. Neunzehn J., Szuwart T., Wiesmann HP. Eggshells as natural calcium carbonate source in combination with hyaluronan as beneficial additives for bone graft materials, an in vitro study. *Head & Face Medicine*. 2015; 11: 12.

References

1. Ivanov A.N., Norkin I.A., Puchinyan D.M. The possibilities and perspectives of using scaffold technology for bone regeneration. *Tsitologiya*. 2014; 56(8): 543-8. (in Russian)
2. Şaşmazel H., Gümüşdereliolu M., Gürpınar A., Onur M.A.. Comparison of Cellular Proliferation on Dense and Porous PCL Scaffolds. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2008; 18(3): 119-28.
3. Kozadaev M.N. Investigation biocompatibility of polycaprolactone scaffold in in vivo. The 3rd Interregional Conference (with overseas participants) On Congenital and Acquired Blood Coagulation Pathology – Thromboses and Hemorrhages: Diagnosis, Prevention,

Сведения об авторах:

Иванов Алексей Николаевич, НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, зав. отд-нием лаб. диагностики, гл. науч. сотр. отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований; зав. ЦНИЛ ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского, доктор мед. наук, e-mail: lex558452@gmail.com;

Куртукова Мария Олеговна, ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, каф. гистологии, доцент, канд. мед. наук, e-mail: kurtukovamaria@mail.ru;

Козадаев Максим Николаевич, ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, мл. науч. сотр. отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований, канд. мед. наук, e-mail: m_kozadaev_ortoped@mail.ru;

Суrowцева Карина Анатольевна, ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России студентка, e-mail:surovcevak@gmail.com;

Савельева Мария Сергеевна, ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», Образовательно-научный институт наноструктур и биосистем, аспирант;

Бугаева Ирина Олеговна, ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, проректор по учебной работе, зав. каф. гистологии, проф., доктор мед. наук;

Порахонский Богдан Владиславович, ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», Образовательно-научный институт наноструктур и биосистем;

Блиникова Вероника Валерьевна, ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, врач отд-ния лаб. диагностики;

Гладкова Екатерина Вячеславовна, ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, начальник отдела фундаментальных и клинико- экспериментальных исследований НИИТОН, канд. биол. наук;

Бабушкина Ирина Владимировна, ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, ст. науч. сотр. отдела фундаментальных и клинико- экспериментальных исследований НИИТОН, канд. мед. наук;

Норкин Игорь Алексеевич, ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, директор НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, проф., доктор мед. наук.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Геворкян Н.М.¹, Тишевская Н.В.², Бабаева А.Г.³

Роль суммарных РНК лимфоидных и стволовых клеток в коррекции уровня глюкозы в крови при экспериментальном сахарном диабете

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», 119121, г. Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8;

²ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», 454092, г. Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», 117418, г. Москва, Россия, ул. Цюрупы, д. 3

Цель – оценка влияния препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток на уровень глюкозы в крови при экспериментальном аллоксановом диабете. **Методика.** Работа выполнена на 68 белых беспородных крысах обоего пола массой 180-220 г. Для моделирования аллоксанового сахарного диабета 1 типа животным однократно подкожно вводили полный адъювант Фрейнда в дозе 0,5 мл/крысу. Через 24 ч (на фоне 24-часового голодания, при свободном доступе к воде) однократно подкожно вводили препарат аллоксан тригидрат («La Chema», Чехия) в дозе 200 мг/кг (4% раствор в 0,9% NaCl). Для предотвращения фатального кетоацидоза, начиная с 3-х сут после введения аллоксана, все крысы получали базисную инсулинотерапию. В экспериментах использовано 8 разновидностей препаратов суммарной РНК: из лимфоидных клеток селезенки, из костного мозга и хвостовой части поджелудочной железы интактных крыс (РНКс-1, РНКкм-1 и РНКп/ж, соответственно); из лимфоидных клеток селезенки крыс, подвергнутых кровопусканию в объеме 2% от массы тела за 17 ч до выделения РНК (РНКс-2 с индуцированной повышенной морфогенетической активностью); из лимфоидных клеток селезенки и тимуса крыс, подвергнутых кровопусканию в объеме 2% от массы тела за 96 ч до выделения РНК (РНКс-3 и РНКт-3, соответственно, с высокой ингибирующей морфогенез активностью); из лимфоцитов периферической крови здорового человека (РНКлпкч), а также из стволовых клеток стромы пупочного канатика человека. **Результаты.** Показана возможность восстановления функции инсулярного аппарата и стойкой нормализации уровня глюкозы в крови крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом 1 типа. Установлено наличие корректирующей способности аллогенных и ксеногенных препаратов суммарной РНК, выделенной из лимфоидных органов крыс и лимфоцитов периферической крови человека, а также из мезенхимных стромальных клеток пуповины человека, в отношении уровня глюкозы крови у крыс. Продемонстрирован различный вклад препаратов суммарной РНК, полученной из разных лимфоидных органов и стволовых клеток, в восстановлении нормального уровня глюкозы в крови животных. Установлено, что указанные препараты действуют на разные ткани-мишени в процессе восстановления функции инсулярного аппарата. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности эффективного лечения сахарного диабета 1 и 2 типов. Доказана эффективность неинвазивного интраназального введения аллогенных и ксеногенных препаратов суммарной РНК лимфоидных и стволовых клеток. Полученные результаты ставят вопрос о необходимости разработки более адекватной экспериментальной модели, а также о перспективности поиска подходов к персонализированному индивидуальному лечению этой патологии с учетом особенностей ее развития в каждом конкретном случае.

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет, аллоксан, поджелудочная железа, регенерация, лимфоидные клетки, стволовые клетки, суммарная РНК.

Для цитирования: Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г. Роль суммарных РНК лимфоидных и стволовых клеток в коррекции уровня глюкозы в крови при экспериментальном сахарном диабете. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 88-95.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.88-95

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг. 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).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.08.2018

Gevorkyan N.M.¹, Tishevskaya N.V.², Babaeva A.G.³

The role of lymphoid and stem cell total RNAs in correction of blood glucose level in experimental diabetes mellitus

¹Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya Str. 10, Moscow 119121, Russia;

²South Ural State Medical University, Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk, 454092, Russia;

³Research Institute of Human Morphology, Tsuryupy Str. 3, Moscow, 117418, Russia

Aim. To study the effect of total RNA from lymphoid cells on blood glucose in experimental alloxan diabetes mellitus (DM). **Methods.** The study was conducted on 68 white mongrel rats of both sexes weighing 180-220 g. Alloxan DM was modeled with full Freund's adjuvant (0.5 ml/rat). After 24 h of fasting with free access to water, a single dose of alloxan trihydrate (La Chemas, Czech Republic) was injected subcutaneously (200 mg/kg as a 4% solution in saline). All rats received basis insulin therapy starting from day 3 of the alloxan injection to prevent fatal ketoacidosis. Eight types of total RNA were used: from splenic lymphoid cells, bone marrow, and caudal part of the pancreas of intact rats; from splenic lymphoid cells of rats after blood withdrawal (2% of body weight 17 h prior to RNA isolation) (RNA after induction of increased morphogenetic activity); from splenic and thymic lymphoid cells of rats after blood withdrawal (2% of body weight 96 h prior to RNA isolation) (RNAs with high morphogenesis-inhibiting activity); and from peripheral blood lymphocytes and umbilical cord stromal stem cells of a healthy human. **Results.** The study showed a possibility for functional recovery of the insular apparatus and stable normalization of blood glucose level in rats with experimental alloxan DM, a model of clinical type 1 DM. Allogenic and xenogeneic total RNAs isolated from rat lymphoid organs, peripheral blood lymphocytes, and mesenchymal stromal cells of human umbilical cord were able to correct the blood glucose level in rats. Total RNAs isolated from different lymphoid organs and stem cells differently contributed to normalization of blood glucose in rats. These total RNAs were shown to influence different target tissues during restoration of the insular apparatus function. **Conclusion.** The study showed a principle possibility of effective therapy for types 1 and 2 DM and demonstrated the efficacy of non-invasive intranasal administration of allogenic and xenogeneic total RNAs from lymphoid and stem cells. These results indicated a need for developing a more relevant experimental model and offered a promising outlook for individualized treatment of this disease with due account of its peculiar features in each specific case. The study was conducted as a part of the Program for Basic Research of State Academies of Science in 2013-2020 on Development of Cell Models for Molecular Processes in Organs and Tissue (V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry) and the complex Research Work #01201354257 on Regulation of Hemopoietic and Nonhemopoietic Functions of Bone Marrow Cells in Experiment and Clinic (South Ural State Medical University).

Keywords: experimental diabetes mellitus, alloxan, pancreas, regeneration, lymphoid cells, stem cells, total RNA.

For citation: Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. The role of lymphoid and stem cell total RNAs in correction of blood glucose level in experimental diabetes mellitus. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 88-95. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.88-95

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 10.08.2018

В настоящей работе с целью дальнейшего изучения морфогенетических возможностей препаратов суммарных РНК лимфоидных клеток исследовали их способность осуществлять регенерацию поврежденного инсулярного аппарата поджелудочной железы крыс. Как было показано ранее, при оперативном вмешательстве регенерация эндокринной части поджелудочной железы, представленной островками Лангерганса, происходит достаточно интенсивно за счет размножения β -клеток, с некоторой гипертрофией клеток островков, приводя к восстановлению эндокринной функции железы [1, 2]. При функциональной недостаточности островковой ткани при сахарном диабете имеет место сходная компенсаторная реакция, с раз-

множением и слабой гипертрофией клеток, не приводящая, однако, к восстановлению функции β -клеток. То есть при сохраняющейся способности клеток островков к пролиферации утрачивается их способность к полноценной дифференцировке. Цель работы – оценка влияния препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток на уровень глюкозы в крови при экспериментальном аллоксановом диабете.

Аллоксановый диабет считается моделью сахарного диабета (СД) 1 типа. Аллоксан имеет трехкетонную структуру, сходную по своему строению с глюкозой. Он избирательно захватывается переносчиком глюкозы GLUT-2 и переносится в панкреатические β -эндокриноциты. В процессе окисления в цитоплаз-

ме этих клеток аллоксан продуцирует цитотоксичные свободнорадикальные метаболиты, которые вызывают массивный некроз β -клеток островков Лангерганса с последующим развитием абсолютной недостаточности инсулина и выраженной, стойкой гипергликемии.

Методика

Эксперименты были проведены в соответствии с Национальным стандартом РФ «Принципы надлежащей лабораторной практики», утвержденным и введенным в действие Приказом Ростехрегулирования от 02.12.2009 (№544-ст, ГОСТ Р 53434-2009). Работа одобрена этическим комитетом ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии». Работа выполнена на 68 белых беспородных крысах обоего пола массой 180-220 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария, на стандартном рационе и при свободном доступе к воде.

Для воспроизведения стойкой аллоксановой модели СД 1 типа животным однократно подкожно вводили полный адьювант Фрейнда в дозе 0,5 мл/крысу. Через 24 ч (на фоне 24-часового голодания, но при свободном доступе к воде) однократно п/к вводили препарат аллоксана тригидрат («La Chema», Чехия) из расчета 200 мг/кг (4% раствор в 0,9% NaCl) [3, 4]. Для предотвращения фатального кетоацидоза, начиная с 3-х сут после введения аллоксана, все крысы получали базисную инсулинотерапию [5]. Для этого животным 1 раз в сут п/к вводили раствор инсулина аспарата двухфазного (НовоМикс 30 Пенфилл, «Novo nordisk», Дания) в дозе 3 МЕД/кг. При снижении уровня глюкозы в крови ниже 10 ммоль/л введение инсулина прекращали. Через 14 сут после введения аллоксана, перед введением препаратов РНК, уровень глюкозы в крови крыс составлял от 19 до 24 ммоль/л.

В экспериментах было использовано 8 разновидностей препаратов суммарной РНК: из лимфоидных клеток селезенки, из костного мозга и хвостовой части поджелудочной железы интактных крыс (РНКс-1, РНКкм-1 и РНКп/ж, соответственно); из лимфоидных клеток селезенки крыс, подвергнутых кровопусканию в объеме 2% от массы тела за 17 ч до выделения РНК (РНКс-2 с индуцированной повышенной морфогенетической активностью); из лимфоидных клеток селезенки и тимуса крыс, подвергнутых кровопусканию в объеме 2% от массы тела за 96 ч до выделения РНК (РНКс-3 и РНКт-3, соответственно, с высокой ингибирующей морфогенез активностью); из лимфоцитов периферической крови здорового человека (РНКлпкч), а также из стволовых клеток строма пупочного канатика человека, любезно предо-

ставленных сотрудниками лаборатории роста и развития Института морфологии человека (РНКмск). Суммарную РНК во всех случаях выделяли методом гуанидин тиоцианат–фенол–хлороформной экстракции [6].

Статистическую значимость различий оценивали с помощью критерия Манна-Уитни и Уилкоксона (различия считались статистически значимыми при вероятности ошибки 1 рода $< 0,05$).

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании, помимо основной задачи по восстановлению уровня глюкозы в крови экспериментальных животных, была предпринята попытка оценить вклад суммарной РНК гомологичного органа и регуляторных РНК лимфоидных органов в восстановление функции продуцирующих инсулин β -клеток поджелудочной железы. Считается, что добавление в эту схему органной РНК, гомологичной больному органу, повышает компенсаторные возможности пораженной ткани.

С этой целью в предварительном эксперименте было предпринято сначала двукратное (в 1 и 7 сут) внутрибрюшинное (в/б) введение трем подопытным крысам только препарата суммарной РНК органа, гомологичного больному органу, в данном случае РНК поджелудочной железы, что к исходу 14-х сут способствовало снижению уровня глюкозы в крови животных примерно на 12%, 18% и 22% (табл. 1). Как видно из этой таблицы, второе введение РНК п/ж практически не вызывало дальнейшего снижения уровня глюкозы крови, что свидетельствует о достаточно ограниченной корригирующей активности РНК п/ж здоровых животных.

При выборе препаратов для коррекции диабета на аллоксановой модели СД 1 типа, были учтены данные о наличии микроангиопатий в костном мозге у больных СД (<http://www.medkurs.ru/news/39325.html>). Это обстоятельство, наряду с описанными нами ранее результатами, свидетельствующими о высокой морфогенетической активности регуляторных препаратов суммарной РНК из костного мозга [7,8], послужило дополнительным аргументом в пользу применения препаратов РНКкм в комплексном лечении аллоксанового диабета. Кроме того, считая препараты регуляторных РНК лимфоидных клеток селезенки и тимуса также очень важными компонентами в лечении патологических состояний, мы и на данной модели проверили их действие.

Из **таблицы 1** видно, что только после введения препаратов РНКкм и РНКс-1 животным 2 и 3 началось существенное снижение уровня глюкозы крови. Это до-

казывает, что система лимфоидной регуляции эффективнее органной РНКп/ж здоровых животных в отношении коррекции уровня глюкозы крови. Тем не менее, в конечном итоге, под действием указанных препаратов РНК у обоих животных была достигнута полная нормализация гликемического статуса.

В двух последующих сериях опытов в общей сложности на 65 животных, по 5 крыс в экспериментальных и контрольных группах, изучали корригирующий эффект аллогенных суммарных РНКкм-1, РНКс-1, РНКс-2, РНКт-3, РНКп/ж, а также ксеногенных РНКлпкч и РНКмск, вводимых в разных сочетаниях, в разной последовательности и разными путями, при этом в каждом случае препараты РНК вводили один раз в 7 сут в дозе 15 мкг/100 г массы тела.

В 1-й серии эксперимента уже были выявлены некоторые особенности механизмов действия суммарных РНК, о которых стоит упомянуть.

Так, корригирующее действие препарата РНКс-2 оказалось менее эффективным, чем РНКс-1. Препарат РНКт-3, который был опробован на предмет торможения возможных аутоиммунных реакций, не только не снижал уровень глюкозы крови, но, напротив, повышал его. Следует отметить, что корригирующее действие препаратов было нами проверено ранее на мутантных мышцах линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+, считающейся адекватной моделью человеческого СД 2 типа. На этой модели нами также были выявлены определенные различия эффектов, вызываемых препаратами РНКс-1 и РНКс-2, но при этом оба они всего лишь при однократном внутривнутрибрюшинном введении способствовали быстрому и полному заживлению всех участков мацерации кожи (которые образуются, согласно данным О.И. Степановой [9], на холке у 25% этих животных и не восстанавливаются до самой их гибели). Весьма примечательным оказался и тот факт, что процесс активации регенерации кожи не зависел от того, снижался уровень глюкозы в крови мышей или нет. Что касается ингибирующего морфогенез препарата РНКс-3, то его действие на мышей в модели СД 2 типа было прямо противоположным тому, что наблюдалось у крыс с аллоксановым диабетом под действием аналогичного супрессорного препарата РНКт-3: у всех мышей после однократного в/б введения РНКс-3 существенно (причем почти одинаково, ≈ на 34%, у каждого из 9 подопытных животных) снижался уровень глюкозы в крови, что может указывать на наличие аутоиммунного компонента в патогенезе СД 2 типа. Следует отметить, что у некоторых мышей, несмотря на снижение уровня глюкозы под действием этого препарата, на холке появились участки мацерации кожи, состояние которых заметно ухудшалось к концу

трехнедельного срока после введения РНКс-3 – по видимому, в результате одновременного ингибирования процессов регенерации и в других органах (в частности, в коже) [7, 10].

Во 2-й серии опытов на крысах с аллоксановым диабетом изучили эффективность отдельного или сочетанного введения тех препаратов РНК, которые оказались, по результатам 1-й серии экспериментов, оптимальными для нормализации уровня глюкозы, а также возможность использования интраназального пути введения РНК. Протокол эксперимента представлен в **табл. 2**.

В **табл. 3** представлены результаты данной серии эксперимента.

Следующей группе крыс с аллоксановым диабетом однократно в/б вводили одновременно по 15 мкг/100 г всех тестируемых препаратов: РНКкм-1, РНКс-1 и РНКп/ж, чтобы проверить, имеет ли принципиальное значение поэтапное введение РНК. Результаты данного опыта, представленные в **табл. 4**, свидетельствуют о том, что однократное сочетанное введение всех 3 ком-

Таблица 1

Влияние препаратов РНКкм-1 и РНКс-1, вводимых на фоне предварительного введения РНКп/ж, на динамику уровня глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом

Сроки наблюдения	1	2	3
	Фон	21,8	20,9
Введение препарата	РНКп/ж	РНКп/ж	РНКп/ж
3 сут	20,5	18,3	19,3
7 сут	18,6	18,1	20,2
Введение препарата	РНКп/ж	РНКп/ж	РНКп/ж
10 сут	20,8	18,5	18,3
14 сут	17,0	18,4	18,2
Введение препарата	-	РНКкм-1	РНКс-1
17 сут	16,7	11,9	16,9
21 сут	17,1	8,2	14,7
24 сут	15,5	7,0	12,0
28 сут	15,6	5,9	9,6
Введение препарата	-	-	РНКс-1
35 сут	16,6	5,3	6,8
42 сут	15,8	5,3	6,7
56 сут	11,5	5,1	4,9

Примечание. 1) эксперимент начат через 60 сут после введения аллоксана интактным крысам; 2) препараты РНК вводили внутривнутрибрюшинно в дозе 15 мкг/100 г массы тела.

понентов (каждого по 15 мкг/100 г массы) приводит к такому же быстрому темпу нормализации уровня глюкозы, как и в случае их последовательного введения (группа 2 в табл. 3).

На основании полученных результатов можно считать установленным, что полного восстановления нормальных гликемических показателей, а следовательно, и функции островкового аппарата поджелудочной железы у крыс с аллоксановым диабетом можно добиться уже за 3 нед (21 сут) в результате еженедельного последовательного в/б введения препаратов суммарных РНКкм-1, РНКс-1 и РНКп/ж, в дозах 15 мкг/100 г (группы 3 и 4 в табл. 2 и 3). При трехкратном сочетанном еженедельном введении равных количеств всех 3 указанных препаратов РНК, в суммарной дозе на одно введение 15 мкг/100 г, восстановление нормального уровня глюкозы крови, а значит, и функции β-клеток поджелудочной железы, наблюдалось на 42-е сут. Важно подчеркнуть, что при та-

кой схеме лечения аллогенными препаратами суммарной РНК внутрибрюшинный и интраназальный пути введения оказались практически одинаковыми по эффективности. Это открывает широкие возможности для неинвазивного лечения сахарного диабета на основе природных и неиммуногенных компонентов клеток здорового организма.

Важно отметить, что каждый из использованных нами препаратов (РНКкм-1, РНКс-1 или РНКп/ж) требовал вполне определенного времени для реализации восстановительных процессов, происходящих с его участием. По прошествии необходимого периода, падение уровня глюкозы в крови под действием каждого из препаратов прекращалось, после чего дальнейшего падения не происходило, хотя достигнутый уровень удерживался системой организма достаточно стабильно. Дальнейшее восстановление функции островкового аппарата поджелудочной железы при

Таблица 2

Схемы введения суммарных РНК животным с аллоксановым СД

Группы	Начало лечения	7 сут	14 сут
1	0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl
2	РНКкм-1 (15 мкг/100 г) в/б	РНКс-1 (15 мкг/100 г) в/б	РНКпж (15 мкг/100 г) в/б
3	РНКкм-1+РНКс-1+ РНКп/ж (5+5+5)мкг/100 г в/б	РНКкм-1+ РНКс-1+РНКп/ж (5+5+5)мкг/100 г в/б	РНКкм-1+РНКс-1+РНКп/ж (5+5+5)мкг/100 г в/б
4	РНКкм-1+РНКс-1+РНКп/ж (5+5+5)мкг/100 г интраназально	РНКкм-1+РНКс-1+РНКп/ж (5+5+5)мкг/100 г интраназально	РНКкм-1+РНКс-1+РНКп/ж (5+5+5)мкг/100 г интраназально

Таблица 3

Динамика уровня глюкозы (ммоль/л) в крови крыс с аллоксановым диабетом под влиянием суммарных РНК

Срок наблюдения	Группа 1 (контроль)	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Фон	21,73±0,46	21,76±0,86	22,04±0,44	21,64±0,43
3 сут	21,58±0,64	11,98±0,41*	12,48±0,52*	13,46±0,71*
7 сут	21,09±0,31	11,40±0,49*	11,32±0,65*	11,34±0,41*
10 сут	20,42±0,41	8,90±0,41*	11,94±0,57*■	11,76±0,69*
14 сут	18,87±0,53	8,26±0,24*	9,28±0,61*	9,72±0,47*
17 сут	18,72±0,36	6,72±0,21*	9,46±0,27*■	9,71±0,35*
21 сут	19,12±0,41	5,86±0,21*	8,04±0,40*■	8,30±0,36*
24 сут	18,53±0,36	5,52±0,18*	6,78±0,20*■	7,18±0,32*
28 сут	18,19±0,46	5,56±0,18*	6,34±0,22*■	6,56±0,19*
42 сут	18,68±1,02	5,54±0,15*	5,16±0,14*	5,62±0,12*

Примечание. * – статистически значимые различия между показателями контрольных животных и животных опытных групп; ■ – достоверные различия между показателями групп 2 и 3; □ – статистически значимые различия между показателями групп 3 и 4.

воздействию следующим препаратом из указанной триады тоже требовало определенного времени для реализации его регенераторной функции и приводило к дальнейшему снижению уровня глюкозы в крови, но тоже до определенных значений, ниже которых этот показатель не опускался даже при длительном интервале между введениями (14 и более сут). И только под действием всех трех указанных препаратов, вводимых в количестве 15 мкг/100 г и в любой последовательности, обеспечивалась полная нормализация уровня глюкозы в крови и восстановление функции инсулярного аппарата.

Из этого следует, что изученные в данной работе препараты суммарных РНК качественно различны, и они не являются взаимозаменяемыми, а это определенно означает, что каждый из них имеет свою мишень.

Опыт, результаты которого приведены в табл. 5, был поставлен на последних двух контрольных животных с аллоксановым диабетом (оставленных для оценки стойкости примененной модели сахарного диабета). Даже спустя 70 сут после введения аллоксана уровень глюкозы в их крови снизился незначительно и составлял в среднем 18 ммоль/л. С целью проверки возможного гипогликемического эффекта ксеногенных препаратов этим крысам были введены суммарные РНК стволовых клеток стромы пупочного канатика человека (РНКмск) и лимфоцитов периферической крови человека (РНКлпкч). Несмотря на длительность заболевания, результат оказался быстрым и стойким даже после однократного введения указанных суммарных РНК, особенно при сочетании РНКмск и РНКлпкч, когда уровень глюкозы достиг нормальных значений уже на 14–17-е сут после их введения. Таким образом, эффективными оказались оба

варианта лечения, в одном из которых была использована только суммарная РНК стволовых клеток пуповины человека, а в другом — она же в сочетании с регуляторной суммарной РНК лимфоцитов периферической крови здоровых доноров.

Таким образом, был решен поставленный в самом начале вопрос о способности препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток оказывать регуляторное воздействие на негомологичную ткань. По-видимому, лимфоцитарная РНК способна вызывать не только увеличение численности [7, 11–15], но и дифференцировку инсулярных клеток, приводящую к нормализации их функции.

Результаты исследования свидетельствуют об активном участии лимфоидной системы в развитии СД у экспериментальных животных, поскольку введение им суммарных РНК, выделенных из нормальных регуляторных или стволовых клеток, полностью нормализовало уровень глюкозы у всех без исключения заболевших животных. И, напротив, в других наших экспериментах при введении суммарной РНК лимфоцитов селезенки крыс с аллоксановым диабетом здоровым животным мы наблюдали у последних временное (3–4 недельное) повышение уровня глюкозы в крови. В свете этих результатов и данных других исследователей [16–18], распространенное мнение, что только СД 1 типа сопровождается развитием аутоиммунного процесса, не подтверждается.

Таблица 5

Динамика уровня глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом при введении суммарных РНК из клеток стромы пупочного канатика человека (РНКмск) и лимфоцитов периферической крови человека (РНКлпкч)

	1	2
Исходный фон (70 сут после индукции СД аллоксаном)	17,9 ммоль/л	18,3 ммоль/л
Введение препаратов	РНКмск (10,7 мкг/100 г)	РНКмск (10,0 мкг/100 г) + РНКлпкч-1 (23,4 мкг/100 г)
3 сут	16,1 ммоль/л	15,5 ммоль/л
7 сут	13,3 ммоль/л	11,0 ммоль/л
10 сут	9,3 ммоль/л	7,8 ммоль/л
14 сут	7,7 ммоль/л	6,1 ммоль/л
17 сут	6,9 ммоль/л	5,8 ммоль/л
21 сут	5,5 ммоль/л	5,6 ммоль/л
27 сут	5,7 ммоль/л	5,6 ммоль/л
35 сут	5,1 ммоль/л	5,3 ммоль/л

Таблица 4

Динамика уровня глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом при сочетанном внутрибрюшинном введении суммарных РНК (РНКм-1 + РНКс-1 + РНКп/ж) в дозах 15 мкг/100 г

Сроки наблюдения	Содержание глюкозы в крови (ммоль/л)
Фон	18,63±0,18
3 сут	10,53±0,28
7 сут	9,47±0,32
10 сут	7,63±0,26
14 сут	6,73±0,18
21 сут	5,40±0,15
28 сут	5,10±0,17
42 сут	5,23±0,15

В таком случае, поскольку у человека аутоиммунный компонент присутствует в патогенезе СД обоих типов, встает вопрос об адекватности общепринятых моделей этой патологии. По мнению ряда исследователей, именно супрессорные Т-лимфоциты ответственны за иммунорегуляцию при СД 1 типа [19-21], кроме того, обнаружено наличие наследственных дефектов в регуляторной Т-клеточной популяции у пациентов с СД 1 типа [18]. Однако в наших опытах введение супрессорного препарата РНКт-3 крысам с аллоксановым СД, считающимся моделью СД 1 типа у человека, привело к ухудшению гликемического статуса этих животных, а введение аналогичного препарата РНКс-3 мышам линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+, которые считаются моделью СД 2 типа у человека, способствовало значительному улучшению их гликемического статуса.

Таким образом, полученные результаты прежде всего свидетельствуют о принципиальной возможности эффективного лечения СД обоих типов. Доказана эффективность неинвазивного интраназального введения аллогенных и ксеногенных препаратов суммарной РНК лимфоидных и стволовых клеток. Полученные результаты ставят вопрос о необходимости разработки более адекватной экспериментальной модели, а также о перспективности поиска подходов к персонализированному лечению этой патологии с учетом особенностей ее развития в каждом конкретном случае.

Литература

1. Саркисов Д.С. Очерки истории общей патологии. М.; Медицина. 1993.
2. Лиознер Л.Д. Новое в учении о регенерации. М.; Медицина. 1977.
3. Волчегорский И.А., Долгушин О.Л., Колесников В.Е., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск; Челябинский гос. педагогический университет. 2000.
4. Волчегорский И.А., Тишевская Н.В., Дементьева Е.В. Антианемическое действие реамберина при остром аллоксановом диабете у крыс. Экспериментальная и клиническая фармакология, 2008; 71(6): 23-7.
5. Federiuk, I.F., Casey H.M., Quinn M.J., Wood M.D., Ward W.K. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: Route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp. Med.* 2004; 54(3): 252-7.
6. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-9.
7. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах. М.; «Группа МДВ»; 2016.
8. 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.
9. Степанова О.И. Трансплантация клеток костного мозга для коррекции патогенетических нарушений при сахарном диабете 2 типа (экспериментальное исследование): Дис. ...канд. биол. наук. Москва. 2009.
10. Бабаева А.Г., Арсентьева В.В. Подавление пролиферации эпителиальных клеток у мышей спленоцитами односторонне сиалденэктомированных сингенных доноров. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1991; 112(9): 217-9.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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(25): 31-5.
16. Полетаев А.Б. Иммунофизиология и иммунопатология (избранные главы). М.; «МИА»; 2008.
17. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Патологическая физиология. Том 2. Патохимия (эндокринно-метаболические нарушения). СПб; «ЭЛБИ-СПб», 2007.
18. Саприна Т.В., Лазаренко Ф.Э., Прохоренко Т.С., Рязанцева Н.В., Ворожцова И.Н. Ролт Th1/Th2 дисбаланс иммунного ответа в детерминации клинических особенностей аутоиммунного сахарного диабета взрослых. *Sakharnyyu diabet.* 2011; 14(2): 12-7.
19. Саприна Т.В., Прохоренко Т.С., Новицкий В.В., Ворожцова И.Н., Рязанцева Н.В. Механизмы формирования аутоиммунных заболеваний поджелудочной и щитовидной желез. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016. 60(2): 101-6.
20. Atkinson M.A. Thirty years of investigating the autoimmune basis for the type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005. 54: 1253-63.
21. Саприна Т.В., Прохоренко Т.С., Мартинова С.Ю., Дзюман А.Н., Зима А.П., Попов О.С. и др. Дисбаланс системы «лиганд-рецептор» фактора некроза опухолей а и экспрессия TNF-RI в ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса. Клиническая и экспериментальная тиреоидология. 2013; 3: 56-65.

References

1. Sarkisov D.S. *Essays on the history of general pathology [Ocherki istorii obshchey patologii]*. Moscow; Meditsina. 1993.

2. Liozner L.D. *New in the doctrine of regeneration [Novoe v uchenii o regeneratsii]*. Moscow; Meditsina. 1977.
3. Volchegorskiy I.A., Dolgushin O.L., Kolesnikov V.E., Ceylikman V.E. *Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the organism [Eksperimental'noe modelirovanie i laboratornaya otsenka adaptivnykh reaktsiy organizma]*. Chelyabinsk; Chelyabinskiy gos. pedagogicheskiy universitet, 2000.
4. Volchegorskiy I.A., Tishevskaya N.V., Dementeva E.V. Anti-anemic action of reamberin in acute alloxan diabetes in rats. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2008, 71(6): 23-7.
5. Federiuk, I.F., Casey H.M., Quinn M.J., Wood M.D., Ward W.K. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: Route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp. Med.* 2004, 54(3): 252-7.
6. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-9.
7. 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)
8. 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)
9. Stepanova O.I. *Transplantation of bone marrow cells for correction of pathogenetic disorders in type 2 diabetes mellitus (experimental study): [Transplantatsiya kletok kostnogo mozga dlya korrektsii patogeneticheskikh narusheniy pri saharom diabete 2 tipa (eksperimental'noe issledovanie)]*: Dis. ... cand. Biol. sciences. Moscow. 2009.
10. Babaeva A.G., Arsenteva V.V. Suppression of proliferation of epithelial cells in mice with splenocytes of unilateral sialadenectomized syngeneic donors. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1991; 112(9): 217-9.
11. 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)
12. 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)
13. 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 fiziologicheskiy Zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2015; 101(4): 451-61. (In Russian)
14. 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)
15. 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)
16. Poletaev A.B. *Immunophysiology and immunopathology (selected chapters)*. Moscow; "MIA", 2008.
17. Zaychik A.S., Churilov L.P. *Pathological physiology. Vol. 2. Pathochemistry (endocrine-metabolic disorders) [Patologicheskaya fiziologiya. Tom 2. Patohimiya (endokrino-metabolicheskie narusheniya)]*. St. Petersburg; "ELBI-SPb", 2007.
18. Saprina T.V., Lazarenko F.Je., Prokhorenko T.S., Ryazanceva N.V., Vorozhova I.N. The role of Th1/Th2 immune response imbalance determination in clinical features of autoimmune diabetes. *Saharnyy diabet*. 2011; 14(2): 12-7. (in Russian)
19. Saprina T.V., Prokhorenko T.S., Noviczkiy V.V., Vorozhova I.N., Ryazanceva N.V. Mechanisms for the formation of autoimmune diseases of the pancreas and thyroid glands. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(2): 101-6.
20. Atkinson M.A. Thirty years of investigating the autoimmune basis for the type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005. 54: 1253-63.
21. Saprina T.V., Prokhorenko T.S., Martynova S.Yu., Dzjuman A.N., Zima A.P., Popov O.S. et al. System imbalance "ligand-receptor" tumor necrosis factor a and TNF-RI expression in the thyroid gland in patients with Graves' disease tissue. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*. 2013; 3: 56-65. (in Russian)

Сведения об авторах:

Геворкян Нина Михайловна, науч. сотр. лаб. биосинтеза белков «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» РАН, e-mail: gevorgiann@yandex.ru;

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

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

© Коллектив авторов, 2019

УДК 615.252.349:616.379-008.64-092.4+616.831-005.4-092.4

Бакулин Д.А., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Логвинова Е.О., Авдиенко К.А., Тюренков И.Н.

Психоневрологические нарушения у животных с ишемией головного мозга на фоне сахарного диабета и их коррекция новым агонистом GPR119 и его комбинациями с метформинном и цитиколином

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, 400131, Волгоградская область, г. Волгоград, Россия, пл. Павших борцов, д. 1

Сахарный диабет (СД) 2 типа значительно повышает риск развития инсульта и выбор гипогликемической терапии может оказать влияние не только на вероятность развития, но и на тяжесть течения нарушения мозгового кровообращения (НМК).

Цель: оценить влияние комбинированного введения агониста GPR119 с метформинном и цитиколином на выраженность психоневрологических нарушений у животных с НМК на фоне СД. **Методика.** Исследование проведено на крысах линии Wistar, которым моделировали фокальную ишемию ГМ на фоне 28 дневного стрептозототин-никотинамид-индуцированного СД. Агонист рецептора GPR119 (дипиарон) и его комбинацию с метформинном вводили с первого дня развития СД, а цитиколин – после моделирования НМК. Психоневрологические нарушения оценивались с использованием шкал «Combs & D'Alencu» и «García», и тестов «Открытое поле», «Ротарод», УРПИ и ТЭИ. **Результаты и обсуждение.** Введение метформина приводило к нормализации уровня гликемии, но не снижало выраженность неврологического дефицита при последующем моделировании НМК. По сравнению с контролем в группах, получавших дипиарон и в большей степени его комбинацию с метформинном, помимо улучшения контроля гликемии наблюдалось значительное снижение объема инфаркта и отека мозга, а также выраженности психоневрологических нарушений у выживших животных ($p < 0,05$). Введение цитиколина без гипогликемической терапии не приводило к снижению уровня неврологического дефицита по сравнению с контрольной группой, при этом добавление цитиколина к гипогликемической терапии значимо не снижало тяжесть течения НМК.

Заключение. Комбинированное введение агониста GPR119 и метформина животным с экспериментальной ишемией ГМ на фоне СД значительно повышает терапевтический потенциал обоих препаратов, обеспечивая лучший контроль уровня гликемии и снижая выраженность психоневрологического дефицита при моделировании НМК.

Ключевые слова: инсульт; сахарный диабет; метформин; цитиколин; дипиарон; инкретины

Для цитирования: Бакулин Д.А., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Логвинова Е.О., Авдиенко К.А., Тюренков И.Н.

Психоневрологические нарушения у животных с ишемией головного мозга на фоне сахарного диабета и их коррекция новым агонистом GPR119 и его комбинациями с метформинном и цитиколином. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3):96-104.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.96-104

Для корреспонденции: Бакулин Дмитрий Александрович, канд. мед. наук, доцент каф. фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, e-mail: mbfdoc@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства промышленности и торговли РФ, в рамках реализации государственного контракта «Доклинические исследования лекарственного средства для лечения СД2 на основе агонистов GPR119 рецептора» № 13411.1008799.154 от 24.07.2013.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.08.2018

Bakulin D.A., Kurkin D.V., Volotova E.V., Logvinova E.O., Avdienko K.A., Tyurenkov I.N.

Neurological disorders in animals with cerebral ischemia and diabetes mellitus and their correction by a new agonist gpr119 and its combinations with metformin and citicoline

Volgograd State Medical University, 400131, Russian Federation, Volgograd, Pavshikh Bortsov Sq.1

Type 2 diabetes mellitus (DM2) significantly increases the risk of stroke, and the choice of hypoglycemic therapy may influence not only a probability of stroke but also severity of cerebrovascular disease. **Objective:** To evaluate the effect of combination treatment with a GPR119 agonist, metformin and citicoline on severity of neurological disorders in animals with stroke and diabetes. Cerebral ischemia was modeled by intraluminal occlusion of the middle cerebral artery (OMCA). **Methods.** The study was performed on Wistar rats with 28-day streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes. The GPR119 receptor agonist (dipiaron) and

its combination with metformin were administered starting from the first day of DM, and citicoline was administered after the induction of brain ischemia. Behavioral and neurological disorders were evaluated using the Combs & D'Alecy and Garcia scales, and the open field, Rotarod, and active and passive avoidance tests. **Results.** The metformin treatment normalized glycemia but did not alleviate severity of the neurological deficit induced by subsequent OMCA. The groups treated with dipiaron and its combination with metformin, in addition to improved glycemic control, showed significant decreases in brain infarction volume and edema and the severity of neurological disorders in surviving animals compared to the control ($p < 0.05$). Administration of citicoline without the hypoglycemic therapy reduced the neurological deficit in comparison with the control group. Addition of citicoline to the hypoglycemic therapy did not significantly reduce the severity of brain ischemia. **Conclusion.** The combination treatment of animals with brain ischemia and diabetes with the GPR119 agonist and metformin significantly enhanced the therapeutic potential of both drugs evident as a better glycemic control and alleviated severity of the neurological deficit following OMCA.

Keywords: stroke; diabetes; metformin; citicoline; dipiaron; incretins

For citation: Bakulin D.A., Kurkin D.V., Volotova E.V., Logvinova E.O., Avdienko K.A., Tyurenkov I.N. Neurological disorders in animals with cerebral ischemia and diabetes mellitus and their correction by a new agonist GPR119 and its combinations with metformin and citicoline. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 96-104. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.96-104

For correspondence: Dmitry A. Bakulin, Candidate of Medical Sciences, assistant professor, Department for Pharmacology and Biopharmacy, Volgograd State Medical University, 1, Pl. Pavshikh Bortsov Square, Volgograd, Russia, 400131, e-mail: mbfdoc@gmail.com

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

Acknowledgments. These studies were supported by the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation as the part of a governmental contract (Preclinical studies of drugs based on GPR119 receptor agonists for diabetes mellitus treatment № 13411.1008799.154, July 24, 2013).

Information about authors:

Bakulin D.A., <http://orcid.org/0000-0003-4694-3066>

Kurkin D.V., <http://orcid.org/0000-0002-1116-3425>

Volotova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-3916-7249>

Tyurenkov I.N. <http://orcid.org/0000-0001-7574-3923>

Received 16.08.2018

Введение

Наличие в анамнезе сахарного диабета (СД) 2 типа повышает риск развития инсульта в 3-7 раз, а риск смерти от инсульта возрастает в 3-4 раза. Это является следствием многих факторов, в том числе метаболических нарушений, эндотелиальной дисфункции, истощением компенсаторных и адаптивных возможностей, что приводит к развитию микро- и макроангиопатий [1].

Согласно современным рекомендациям, при подборе сахароснижающей терапии отдается предпочтение препаратам, которые не вызывают гипогликемических состояний и снижают риск развития сосудистых осложнений СД [2]. Показано, что препараты некоторых групп (агонисты рецепторов ГПП-1 (лираглутид) и ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2 типа (эмпаглифлозин и канаглифлозин) способны снижать риск развития сосудистых осложнений СД [3, 4]. Поэтому уже в доклинических исследованиях для новых веществ с гипогликемической активностью появилась необходимость оценки действия на сердечно-сосудистую систему.

В последние годы разрабатываются препараты, стимулирующие выработку эндогенных инкретинов: глюкагонподобный пептид-1 (ГПП-1) и глюкагонза-

висимый инсулинотропный полипептид (ГИП). Повышение секреции ГПП-1 и ГИП происходит при активации компонентами пищи ряда рецепторов на энтероэндокринных клетках кишечника (GPR40, GPR41, GPR43, GPR119, GPR120 и др.). Фармакологическая активация данных рецепторов представляет собой новый подход в воздействии на систему инкретинов, а синтетические агонисты рецепторов GPR40 и GPR119 представляют собой потенциальные противодиабетические препараты с низкой токсичностью и высоким терапевтическим потенциалом [5].

В рамках программы «Фарма-2020» фармакологами Волгоградского государственного медицинского университета совместно с химиками Исследовательского Института Химического Разнообразия (АО «ИИХР», г. Химки, РФ) был разработан селективный агонист рецептора GPR119 (дипиарон), повышающий секрецию ГПП-1 [6] и обладающий выраженной гипогликемической активностью [7]. Было установлено, что дипиарон обладает и дополнительными свойствами: улучшает липидный обмен и функциональное состояние эндотелия в условиях экспериментального диабета [8]. В настоящее время для дипиарона выполнен

весь комплекс доклинических исследований и он будет рекомендован для лечения СД 2 типа в моно- и комбинированной терапии у пациентов с метаболическими нарушениями и высоким риском развития сосудистых осложнений.

Цель исследования – оценка церебропротекторного потенциала дипиарона и метформина в отдельности и в комбинации, а также при добавлении к терапии нейропротекторного препарата (цитиколин) у животных с острым нарушением мозгового кровообращения на фоне экспериментального СД.

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 региональным независимым этическим комитетом ГУ Волгоградского медицинского научного центра (протокол № 191-2014 от 25.02.2014 г). Работа выполнена на 114 крысах-самцах Wistar массой 360-380 г, возрастом 8-10 мес (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово», Россия), содержащихся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище.

На рис. 1 представлен дизайн исследования, который можно разделить на этапы: I этап – моделирование сахарного диабета и гипогликемическая терапия в течение 28 сут; II этап – моделирование ишемии головного мозга (ГМ) и оценка выраженности психоневрологического дефицита.

Экспериментальный СД моделировали путём внутривентрикулярного введения стрептозотоцина (65 мг/кг, Sigma-Aldrich, США), после предварительно введенного никотинамида (230 мг/кг, Sigma-Aldrich, США) [9]. Спустя 72 ч у животных измеряли уровень гликемии (после 6 ч голодания).

На I этапе (рис. 1) в исследование были включены 114 животных с уровнем гликемии в пределах 8-16 ммоль/л, которые были распределены на 4 группы (средний уровень глюкозы в группах был от 13,0 до 13,4 ммоль/л). В течение 28 сут животные получали per os соответственно: 1-я группа (n=36) – физ. р-р; 2-я (n=26) – дипиарон 1 мг/кг; 3-я (n=26) метформин 400 мг/кг и 4-я (n=26) – метформин+дипиарон 400 и 1 мг/кг соответственно (табл. 1).

На II этапе исследования (рис. 1) моделировали ишемию ГМ путем окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА). Группа животных с СД без лечения (СД+физ. р-р, n=36) по принципу рандомизации была разделена на

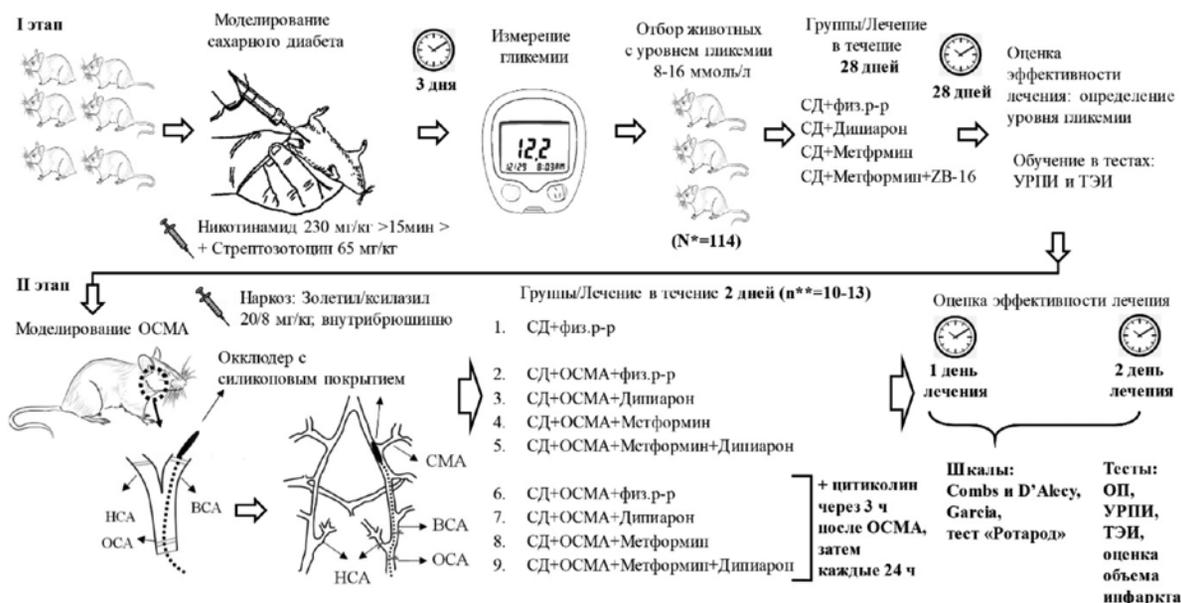


Рис. 1. Дизайн исследования.

Примечание: * – общее число животных (N); ** – число животных в группе (n); СД – сахарный диабет; физ. р-р – физиологический раствор; ОСА – общая сонная артерия; ВСА – внутренняя сонная артерия; НСА – наружная сонная артерия; СМА – средняя мозговая артерия; ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии; ЛО – ложная операция; ОП – открытое поле; УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания; ТЭИ – тест экстраполяционного избегания.

3 подгруппы: ложнооперированные (ЛО) животные (СД+физ. р-р, $n=10$), контрольная – подгруппа с ишемией ГМ без лечения (СД+ОСМА+физ. р-р, $n=13$) и подгруппа с ишемией ГМ, получавшая после операции нейропротектор цитиколин (СД+ОСМА+Цитиколин, $n=13$).

Каждая из опытных групп (СД+ОСМА+дипиарон, СД+ОСМА+метформин и СД+ОСМА+метформин+дипиарон) была разделена на 2 (по 13 животных в каждой), одной из которых помимо соответствующей гипогликемической терапии после операции вводили цитиколин.

Метформин (Глюкофаж, Merck Sante, Франция, 400 мг/кг, per os) и цитиколин (Цераксон, Ferrer Internacional, Испания, 500 мг/кг, в/б) использовали в дозах, выбранных на основе данных литературы [10, 11]. Доза агониста GPR119 (1 мг/кг) выбрана, как наиболее эффективная по результатам предыдущих исследований [7].

Фокальная ишемия ГМ моделировалась посредством временной (30 мин) внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии [12]. В течение последующих 2 сут с использованием неврологических шкал («Combs & D'Alecy» и «García» [13]) и установки «Ротарод» (ООО «Нейроботикс», РФ) определяли выраженность неврологических нарушений. На 2-е сут поведенческие нарушения оценивали в тесте «Открытое поле», а сохранность памятного следа – в тестах «условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ) и «тесте экстраполяционного избавления» (ТЭИ) (экспериментальные установки произведены «НПК Открытая Наука», Москва, Россия) [14]. Обучение животных в тестах УРПИ и ТЭИ производилось до моделирования ишемии (рис. 1). На заключительном этапе эксперимента определяли относительный объем некроза (окраска срезов больших полушарий 1% раствором 2,3,5,-трифенилтетразолия хлорида) и увеличение объема пораженной гемисферы. Оперативные вмешательства осуществляли с использованием комбинированного наркоза (золетил 20 мг/кг + ксилазил 8 мг/кг). Эвтаназию осуществляли путем двукратной передозировки хлоралгидрата (800 мг/кг).

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием ПО Prism 6 и критериев (Дана и Ньюмена-Кейлса). Значения $p < 0,05$ расценивали как статистически значимые.

Результаты и обсуждение

Через 24 и 48 ч после моделирования ишемии ГМ у животных в контроле наблюдался наиболее выраженный неврологический дефицит (рис. 2), при этом суммарный балл по шкалам «Combs & D'Alecy» и «García» был ниже, чем в подгруппе ложнооперированных (ЛО),

через 24 ч на 26% и 57%, а через 48 ч – на 62% и 55% соответственно. Лечебное введение цитиколина животным без гипогликемической терапии приводило к незначительной позитивной динамике (рис. 2). В группах, получавших гипогликемическую монотерапию (дипиарон и метформин) к 48 ч наблюдался значимо меньший уровень неврологического дефицита по сравнению с контролем (соответственно на 79% и 42% по шкале «Combs & D'Alecy», рис. 2, А). Комбинированное лечебно-профилактическое введение дипиарона и метформина оказывало более выраженное действие, чем каждый из препаратов в отдельности (по сравнению с контролем группой на 98% в баллах по шкале «Combs & D'Alecy»). Дополнительное введение цитиколина животным (после моделирования ишемии ГМ), получавшим гипогликемическую моно- и комбинированную терапию, не приводило к более выраженному снижению уровня неврологического дефицита (рис. 2).

Через 24 и 48 ч после моделирования ишемии ГМ у животных оценивали моторную функцию (силу и координацию движений конечностей) в тесте «Ротарод». В контрольной группе по сравнению с группой ЛО отмечалось выраженное снижение времени удержания на вращающемся стержне (на 68% и 67% через 24 и 48 ч соответственно) (рис. 3, А). У животных с ишемией ГМ и сахарным диабетом, получавших цитиколин после моделирования нарушения мозгового кровообращения время удержания на вращающемся стержне было несколько больше. В группах, получавших в качестве гипогликемической терапии дипиарон и комбинацию метформин+дипиарон среднее время удержания на вращающемся стержне статистически значимо превышало (более чем в 2 раза) таковое в контроле. Добавление к гипогликемической терапии цитиколина не влияло на физическую выносливость и координацию движений животных с ишемией ГМ, воспроизведённой на фоне экспериментального СД.

Таблица 1

Параметры углеводного обмена в группах после 28 сут лечения.

Группа	Уровень гликемии (ммоль/л натощак)	Площадь под кривой «гликемия-время» при глюкозной нагрузке, ммоль/л*мин
Интактные животные	4,6±0,2	662±13
СД+физ. р-р	9,6±0,3	2764±145
СД+Дипиарон	7,9±0,4	1832±139
СД+Метформин	7,5±0,6	1707±146
СД+Метформин+Дипиарон	7,1±0,5	1502±100

Через 48 ч после моделирования ишемии мозга в тестах УРПИ и ТЭИ оценивали сохранность памятного следа по способности воспроизведения навыков пассивного и активного избегания аверсивной среды, сформированных до моделирования нарушения мозгового кровообращения. У животных контрольной группы был отмечен значительно более короткий латентный период захода в темный отсек с электродным полом в тесте УРПИ, а также более продолжительное время для решения экстраполяционной задачи (подныривания) в тесте ТЭИ (рис. 3, Б), что свидетельствует о нарушении сохранности памятного следа у животных с ишемией ГМ и СД. В группах, получавших гипогликемическую монотерапию (дипиарон и метформин), показатели когнитивной функции – время захода в темный отсек было больше, а время подныривания (избавления от аверсивной среды) меньше, чем у животных негативного контроля. Введение цитиколина в дополнение к гипогликемической терапии значимо не влияло на оцениваемые показатели.

В тесте «Открытое поле» (рис. 4, А, Б) у контрольной группы животных с ишемией ГМ и СД наблюдалось зна-

чительно более низкая двигательная (число пересеченных секторов) и ориентировочно-исследовательская (суммарное количество заглядываний в отверстия установки и вставания на задние лапы) активность (рис. 4, Б_ц) по сравнению с ложнооперированными животными (рис. 4, Б_л). У животных, которые до и после ишемии ГМ получали дипиарон показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности были статистически значимо выше, чем в группе негативного контроля. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность у животных, получавших метформин была выше, чем у контрольной группы, но ниже по сравнению с группой, получавшей дипиарон. Несколько более высокие показатели наблюдались в группе, получавшей дипиарон в комбинации с метформином: животные более полно обследовали пространство открытого поля, чаще выполняли стойки и заглядывали в норки (рис. 4, Б_ш). В тесте «Открытое поле» у животных с ишемией ГМ на фоне СД, которым вводился только цитиколин число поведенческих актов было лишь незначительно выше, чем у животных группы негативного контроля. Добавление цитиколина

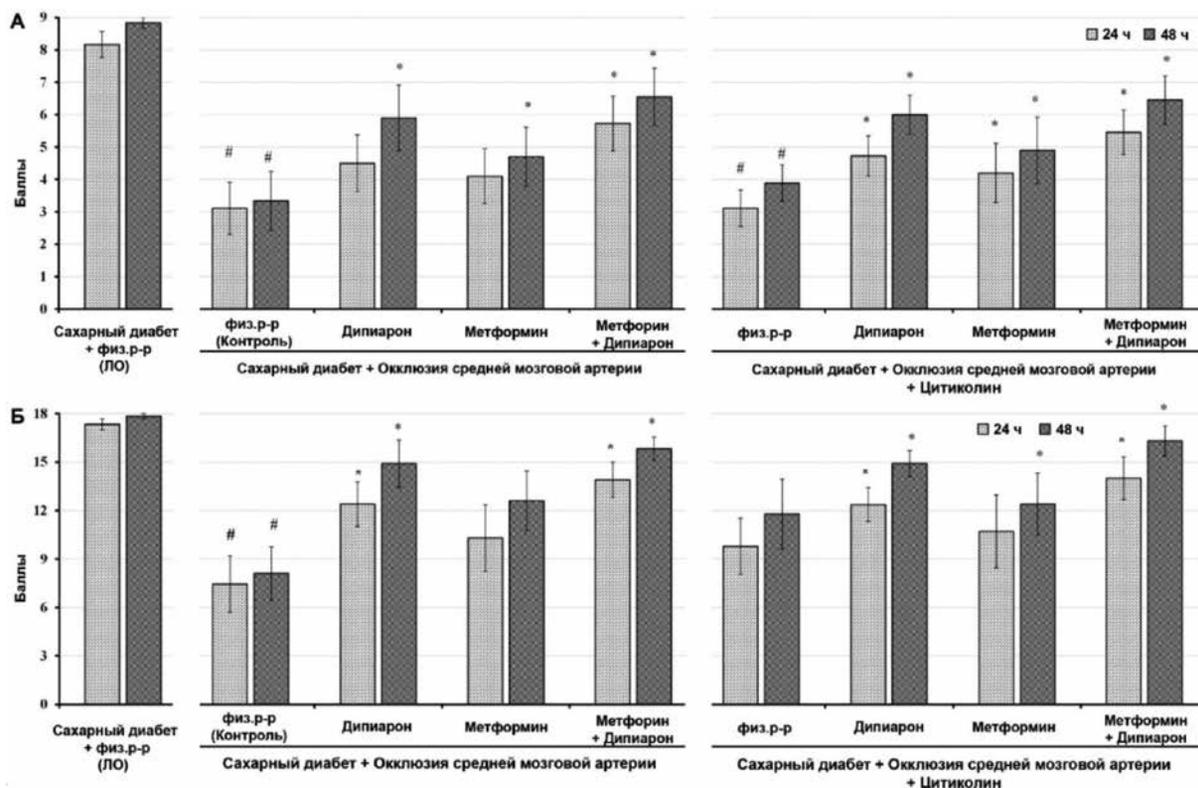


Рис. 2. Уровень неврологического дефицита у животных в баллах по шкалам «Combs & D'Alecy» (А) и «Garcia» (Б) через 24 и 48 часов после моделирования ОСМА у животных с экспериментальным СД.

Обозначения: # – различия статистически значимы по отношению к подгруппе ложнооперированных животных с СД (ЛО) при $p < 0,05$; * – различия статистически значимы достоверны по отношению к животным с СД и окклюзией средней мозговой артерией (контроль), $p < 0,05$.

к терапии дипиароном, метформином и их комбинацией не оказывало значимого влияния на показатели поведения в тесте «ОП».

Размер инфаркта у животных (контроль) с ишемией ГМ и СД без лечения составлял $33 \pm 3,6\%$ от пораженной гемисферы, которая при этом, вследствие отека, была увеличена на 15% относительно интактной (рис. 5). У животных, получавших метформин относительный размер инфаркта и выраженность отека были несколько ниже ($24 \pm 4,5\%$ и $10 \pm 1,6\%$ соответственно. Данные статистически незначимы). У животных, получавших дипиарон и комбинацию дипиарон+метформин относительный размер инфаркта был сопоставим и составил $19 \pm 4\%$ и $17,5 \pm 4,4\%$ соответственно (изменения статистически незначимы). У животных без гипогликемической терапии, но с лечебным введением цитиколина относительный размер инфаркта и выраженность отека были незначительно ниже, чем в контроле ($29 \pm 3,4\%$ и $12 \pm 2,8\%$ соответственно). В группах с гипогликемической терапией добавление цитиколина после моделирования ишемии ГМ не оказывало влияния на размер инфаркта и выраженность отека.

Ишемия ГМ на фоне сахарного диабета отличается тяжелым течением с быстрой трансформацией зоны пенумбры в некротизированную ткань [1]. В основе этого лежит ряд патогенетических факторов диабета: длительная гипергликемия, образование конечных продуктов гликирования, развитие эндотелиальной дисфункции и воспаления в сосудистой стенке, а также прокоагулянтное состояние системы свертывания [1, 15].

Выбор сахароснижающей терапии влияет не только на риск развития сердечно-сосудистых осложнений у пациента с СД 2 типа, но и на тяжесть течения ишемии ГМ благодаря контролю гликемии и свойственным ряду препаратов плейотропным эффектам [16]. Установлено, что метформин проявляет не только выраженную гипогликемическую активность, но и снижает риск развития сосудистых осложнений СД 2 типа [16]. Это реализуется благодаря снижению периферической инсулинорезистентности, улучшению утилизации глюкозы, липидного профиля и эндотелиопротекторному действию. Однако в литературе нет однозначных данных о его непосредственном влиянии на проявления нарушения мозгового кровообращения

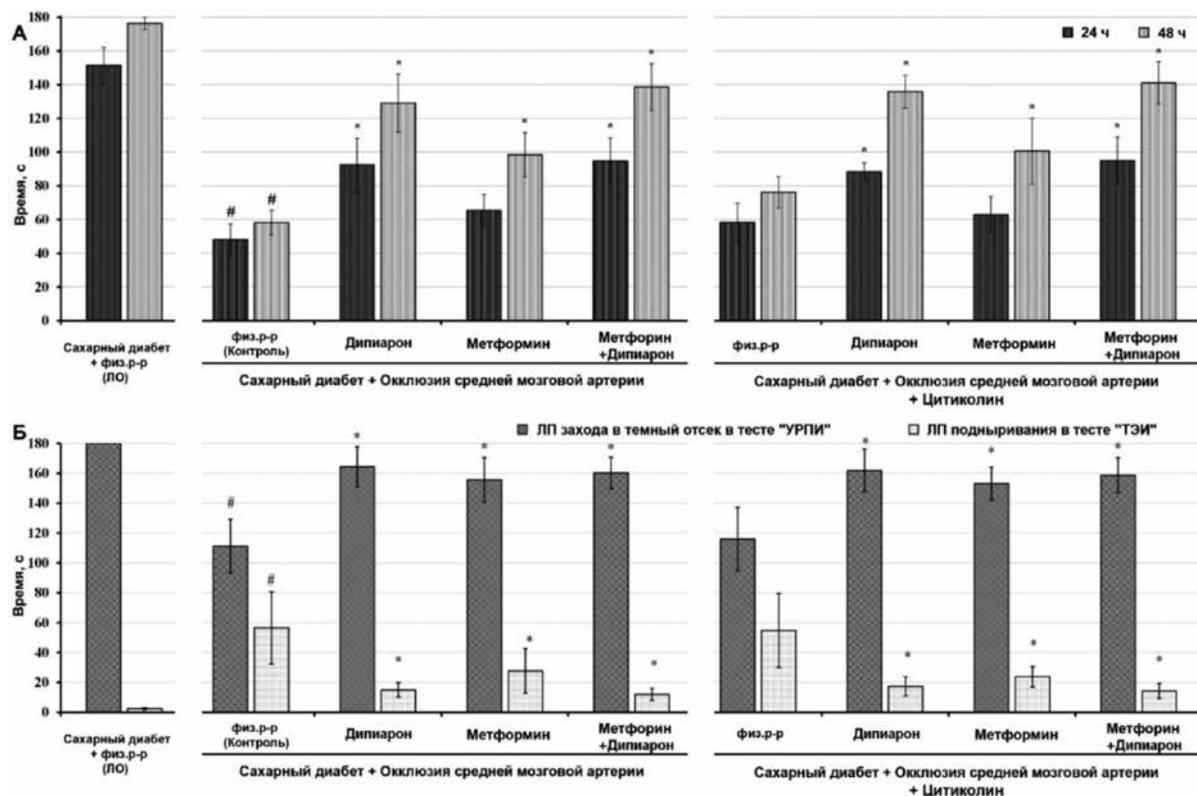


Рис. 3. Время удержания животных на вращающемся стержне в тесте «Ротарод», через 24 и 48 ч после моделирования ОСМА (А); время захода в темный отсек установки «УРПИ» и время подныривания в «ТЭИ» (Б) через 48 ч после моделирования ОСМА у животных с экспериментальным СД. Обозначения те же как на рис. 2.

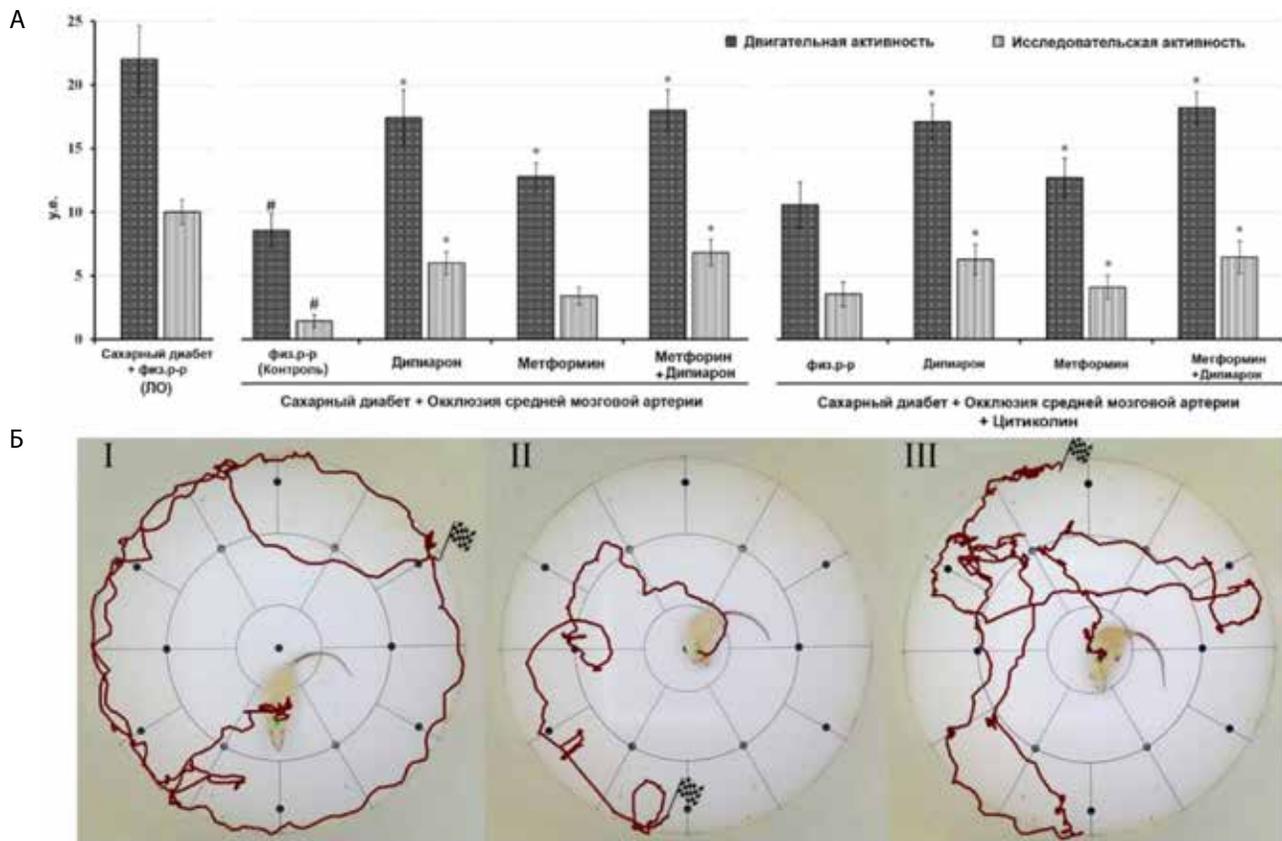


Рис. 4. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных через 48 ч после моделирования ишемии ГМ на фоне СД в тесте «Открытое поле» (А); характерная траектория движений в установке для групп (Б): (I) СД+физ. р-р (ЛО), (II) СД+ОСМА+физ. р-р (Контроль), (III) СД+ОСМА+Метформин+Дипиарон. Обозначения те же, как на рис. 2.

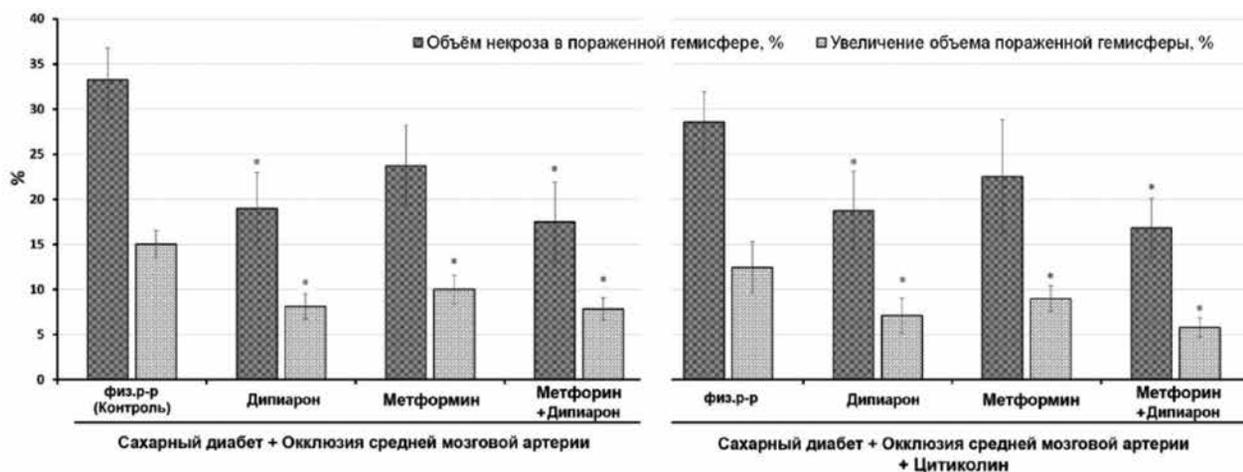


Рис. 5. Относительный объем некроза и увеличение объема пораженной гемисферы, через 48 часов после моделирования ОСМА у животных с экспериментальным СД.

Обозначения: * – $p < 0,05$ различия статистически значимы по отношению к группе животных с СД и окклюзией средней мозговой артерией (контроль)

[17]. С другой стороны, агонисты рецепторов ГПП-1 и ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа уступают метформину по сахароснижающей активности, но при этом значимо снижают риск развития сердечно-сосудистых осложнений СД [3, 4].

В проведенном исследовании влияние метформина незначимо превосходило влияние агониста GPR119 (дипиарона) по гипогликемическому действию. Однако после моделирования ишемии ГМ на фоне СД в группе, получавшей метформин, по результатам большинства тестов наблюдался более выраженный психоневрологический дефицит, чем у животных, получавших дипиарон. Необходимо отметить, что показатели психоневрологического дефицита незначительно отличались в группах, получавших дипиарон и комбинацию дипиарон и метформин, превышая таковые в группе с монотерапией метформином, что может указывать на незначительный вклад метформина в нейропротекторный эффект комбинации.

Механизм действия дипиарона связан с двукратным повышением секреции ГПП-1 и увеличением секреции инсулина при поступлении глюкозы [6]. Также помимо снижения уровня гликемии у животных с СД, при введении дипиарона отмечалась нормализация параметров коагуляционного гемостаза [18] и функционального состояния эндотелия [8]. Известно, что плейотропные свойства ГПП-1 связаны с широкой распространенностью рецептора к ГПП-1 в разных тканях и его способность запускать внутриклеточные сигнальные каскады, поддерживающие функциональную активность клетки и ингибирующие апоптоз в условиях патологии [3, 19]. Плейотропные эффекты дипиарона могут быть связаны как со снижением гипергликемии, так и с эндотелио- и нейропротекторными свойствами ГПП-1, что может объяснять церебропротекторный потенциал агониста GPR119 в условиях ишемии ГМ.

Введение цитиколина животным с фокальной ишемией без гипогликемической терапии не приводило к существенному снижению последствий нарушений мозгового кровообращения за короткий курс лечения. Причиной тому, вероятно, являются нарушения, формировавшиеся на фоне продолжительной (4 нед) гипергликемии (эндотелиальная дисфункция, нарушения в системе гемостаза, повышение образования продуктов ПОЛ и др.), которые способны значительно снижать возможности нейропротекторной терапии.

Таким образом, введение метформина значительно снижает уровень гликемии при экспериментальном СД, но не оказывает выраженного церебропротекторного эффекта при последующем моделировании нарушений мозгового кровообращения. Введение дипиарона,

повышающего секрецию инкретинов, помимо гипогликемического действия приводит к статистически значимому снижению психоневрологического дефицита у животных с ишемией ГМ на фоне СД. При комбинированном введении дипиарона с метформином увеличивается терапевтический потенциал обоих препаратов с гипогликемическим и церебропротекторным действием. Добавление нейропротектора цитиколина к дипиарону, метформину и их комбинации после моделирования ишемии ГМ на фоне сахарного диабета не приводит к значимому снижению психоневрологических нарушений.

Литература

1. Гудкова В.В., Стаховская Л.В., Мешкова К.С., Шанина Т.В. Инсульт у больных сахарным диабетом как мультидисциплинарная проблема. *Consilium Medicum*. 2015; 17(9): 27-31.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю., Викулова О.К., Галстян Г.Р., Кураева Т.Л. и др. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом 8-й выпуск. *Сахарный диабет*. 2017; 20(1S): 1-121.
3. Тюренков И.Н., Бакулин Д.А., Куркин Д.В., Волотова Е.В. Кардиоваскулярные эффекты инкретиномиметиков и их терапевтический потенциал. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2017; 72(1): 66-75.
4. Shigiyama F., Kumashiro N., Miyagi M., Ikehara K., Kanda E., Uchino H. et al. Effectiveness of dapagliflozin on vascular endothelial function and glycemic control in patients with early-stage type 2 diabetes mellitus: DEFENCE study. *Cardiovasc Diabetol*. 2017; 16(1): 84.
5. Тюренков И.Н., Озеров А.А., Куркин Д.В., Логвинова Е.О., Бакулин Д.А., Волотова Е.В. и др. Структура и биологическая активность эндогенных и синтетических агонистов рецептора GPR119. *Успехи химии*. 2018; 87(2): 151-166.
6. Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Bakulin D.A., Volotova E.V., Chafeev M.A., Smirnov A.V. et al. ZB-16, a novel GPR119 agonist, relieves the severity of streptozotocin-nicotinamide induced diabetes in rats. *Frontiers in Endocrinology*. 2017; 8: 1-8.
7. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Волотова Е.В., Шафеев М.А. Сравнение гипогликемической активности нового агониста GPR119 и ингибитора ДПП-4 ситаглиптина. *Проблемы эндокринологии*. 2016; 62(1): 38-43.
8. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Волотова Е.В., Шафеев М.А. Гиполипидемическое, антиоксидантное и эндотелиоопозитивное действие нового агониста рецептора GPR 119 соединения ZB-16 при экспериментальном сахарном диабете. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2017; 80(1): 18-23.
9. Masiello P., Broca C., Gross R., Roye M., Manteghetti M., Hillaire-Buys D. et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 1998; 47: 224-9.
10. Парфенов В.А. Цитиколин в лечении инсульта и сосудистых когнитивных нарушений. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2009; (3-4): 69-74.
11. Ismail T.A., Soliman M.M., Nassan M.A. Molecular and immunohistochemical effects of metformin in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *Exp Ther Med*. 2015; 9(5): 1921-30.
12. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Волотова Е.В. Изучение нейропротекторного действия нового производного глутаминовой кислоты – нейроглутама при фокальной ишемии мозга у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2014; 77(9): 8-12.
13. Дайнеко А.С., Шмонин А.А., Шумеева А.В. Методы оценки неврологического дефицита у крыс после 30-минутной фокаль-

- ной ишемии мозга на ранних и поздних сроках постишемического периода. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2014; 13(1): 68-78.
14. Воронина Т.А., Островская Р.У. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ. В кн.: Хабриев Р.У., ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: ИИА «Ремедиум»; 2000: 153-61.
 15. Какорин С.В., Тулякова Э.В., Воронкова К.В., Мкртумян А.М. Острое нарушение мозгового кровообращения у больных сахарным диабетом 2 типа. *Сахарный диабет*. 2013; (1): 63-70.
 16. Eriksson L., Nyström T. Antidiabetic agents and endothelial dysfunction – beyond glucose control. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015; 117(1): 15-25.
 17. Jia J., Cheng J., Ni J., Zhen X. Neuropharmacological Actions of Metformin in Stroke. *Curr Neuropharmacol*. 2015; 13(3): 389-94.
 18. Куркин Д.В., Волотова Е.В., Бакулин Д.А., Чафеев М.А., Тюренокв И.Н. Влияние нового агониста рецептора GPR119 соединения ZB-16 на коагуляционный гемостаз крыс при экспериментальном сахарном диабете. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2016; (1): 48-51.
 19. Власов Т.Д., Симаненкова А.В., Дора С.В., Шляхто Е.В. Механизмы нейропротективного действия инкретиномиметиков. *Сахарный диабет*. 2016; 19(1): 16-23.
- the severity of streptozotocin–nicotinamide induced diabetes in rats. *Frontiers in Endocrinology*. 2017; 8: 1-8.
7. Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Bakulin D.A., Volotova E.V. Comparing hypoglycemic activity of novel GPR119 agonist and DPP-4 inhibitor sitagliptin. *Problemy Endokrinologii*. 2016; 62(1): 38-43. (in Russian)
 8. Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Bakulin D.A., Volotova E.V., Shafeev M.A. Hypolipidemic, antioxidant, and endothelial protective effect of compound ZB-16 (novel GPR119 receptor agonist) in rats with experimental type 2 diabetes. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2017; 80(1): 18-23. (in Russian)
 9. Masiello P., Broca C., Gross R., Roye M., Manteghetti M., Hillaire-Buys D. et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 1998; 47: 224-9.
 10. Parfenov V.A. Citicoline in the treatment of stroke and vascular cognitive impairment. *Nevrologiya, neyropsikhiatriya, psichosomatika*. 2009; (3-4): 69-74. (in Russian)
 11. Ismail T.A., Soliman M.M., Nassan M.A. Molecular and immunohistochemical effects of metformin in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *Exp Ther Med*. 2015; 9(5): 1921-30.
 12. Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Bakulin D.A., Volotova E.V. Studying the neuroprotective effect of the novel glutamic acid derivative neiroglutam on focal cerebral ischemia in rats. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2014; 77(9): 8-12. (in Russian)
 13. Daineko A.S., Shmonin A.A., Shumeeva A.V. Methods for assessing neurological deficits in rats after a 30-minute focal cerebral ischemia in the early and late stages of the postischemic period. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2014; 13(1): 68-78. (in Russian)
 14. Voronina T.A., Ostrovskaya R.U. Guidance on studying nootropic activity of pharmacological substances. In: Habriev R.U., eds. *Guideline for experimental (preclinical) studying of new pharmacological substances*. Moscow; Remedium; 2000: 153-61. (in Russian)
 15. Какорин С.В., Тулякова Е.В., Воронкова К.В., Мкртумян А.М. Cerebrovascular accidents in patients with type 2 diabetes mellitus. *Sakharnyy diabet*. 2013; (1): 63-70. (in Russian)
 16. Eriksson L., Nyström T. Antidiabetic agents and endothelial dysfunction – beyond glucose control. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015; 117(1): 15-25.
 17. Jia J., Cheng J., Ni J., Zhen X. Neuropharmacological Actions of Metformin in Stroke. *Curr Neuropharmacol*. 2015; 13(3): 389-94.
 18. Куркин Д.В., Волотова Е.В., Бакулин Д.А., Чафеев М.А., Тюренокв И.Н. The influence of novel GPR119 receptor agonist ZB-16 on hemostasis in diabetic rats. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2016; (1): 48-51. (in Russian)
 19. Vlasov T.D., Simanenkova A.V., Dora S.V., Shlyakhto E.V. Mechanisms of neuroprotective action of incretin mimetics. *Sakharnyy diabet*. 2016; 19(1): 16-23. (in Russian)

References

1. Gudkova V.V., Stakhovskaya L.V., Meshkova K.S., Shanina T.V. Stroke patients with diabetes as a multidisciplinary problem. *Consilium Medicum*. 2015; 17(9): 27-31. (in Russian)
2. Dedov I.I., Shestakova M.V., Mayorov A.Y., Vikulova O.K., Galstyan G.R., Kuraeva T.L. et al. Standards of specialized diabetes care. 8th edition. *Diabetes mellitus*. 2017; 20(1S): 1-121. (in Russian)
3. Tyurenkov I.N., Bakulin D.A., Kurkin D.V., Volotova E.V. Cardiovascular effects of incretin-based therapies and their therapeutic potential. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2017; 72(1): 66-75. (in Russian)
4. Shigiyama F., Kumashiro N., Miyagi M., Ikehara K., Kanda E., Uchino H. et al. Effectiveness of dapagliflozin on vascular endothelial function and glycemic control in patients with early-stage type 2 diabetes mellitus: DEFENCE study. *Cardiovasc Diabetol*. 2017; 16(1): 84.
5. Tyurenkov I.N., Ozerov A.A., Kurkin D.V., Logvinova E.O., Bakulin D.A., Volotova E.V. et al. Structure and biological activity of endogenous and synthetic agonists of GPR119. *Uspekhi khimii*. 2018; 87(2): 151-66.
6. Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Bakulin D.A., Volotova E.V., Chafeev M.A., Smirnov A.V. et al. ZB-16, a novel GPR119 agonist, relieves

Сведения об авторах:

Бакулин Дмитрий Александрович, канд. мед. наук, доцент каф. фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, e-mail: mbfdoc@gmail.com;

Куркин Денис Владимирович, доктор фарм. наук, доцент каф. фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, e-mail: strannik986@mail.ru;

Волотова Елена Владимировна, доктор мед. наук, доцент каф. фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ;

Логвинова Екатерина Олеговна, соискатель каф. фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ ВолгГМУ;

Авдиенко Ксения Андреевна, студент-исследователь;

Тюренокв Иван Николаевич, чл.-корр. РАН, доктор мед. наук, проф., зав. каф. фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.24-006.6-033.2:615.277.3:612.014.482.4]-092.9

Филимонова М.В., Макаrchук В.М., Шевченко Л.И., Филимонов А.С.

Исследование влияния ингибитора NOS T1023 в сочетании с γ -излучением и циклофосфамидом на рост и метастазирование карциномы лёгких льюис

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, 249036, Калужская область, Россия, г. Обнинск, ул. Королева, д. 4

Цель работы – изучение антинеопластических эффектов при комбинированном воздействии ингибитора NOS T1023 с γ -излучением и циклофосфамидом. **Методика.** В работе использован штамм эпидермоидной карциномы легких Льюиса. Выполнено 2 независимых эксперимента: в одном изучали антинеопластические эффекты при раздельном и комбинированном воздействии T1023 и γ -излучения, в другом – при раздельном и комбинированном воздействии T1023 и циклофосфамида. Особая 1-й опытной группы в обоих экспериментах с 7-х по 20-е сут роста карциномы ежедневно вводили соединение T1023 в дозе 60 мг/кг внутривенно. В первом эксперименте животные 2-й опытной группы на 7-е сут роста неоплазии получали сеанс облучения (доза 5 Гр). Во втором эксперименте животным этой группы на 7-е сут роста неоплазии вводили однократно внутривенно циклофосфамид в дозе 100 мг/кг в виде 1,0% раствора фармакопейного препарата на основе 0,9% раствора натрия хлорида. Животным 3-й опытной группы в обоих экспериментах проводили соответствующие комбинированные воздействия по этим же схемам и в таких же дозах. Первое введение T1023 на 7-е сут роста карциномы этим животным проводили через 4 ч после облучения или введения циклофосфамида. Влияние на рост опухоли оценивали по межгрупповым различиям объемов опухолевых узлов, длительности задержки роста и индексу торможения роста опухоли. Влияние на активность метастазирования карциномы оценивали по межгрупповым различиям числа легочных метастазов на 21-е сут роста опухоли и индексу ингибирования метастазирования. Статистическую оценку значимости межгрупповых различий количественных показателей проводили с помощью дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с применением Q-критерия Данна. **Результаты.** Показано, что воздействие T1023, как в комбинации с γ -излучением, так и в комбинации с циклофосфамидом, сопровождается статистически значимым подавлением роста и метастазирования карциномы легких Льюис. При этом антинеопластические эффекты обоих комбинированных воздействий соответствовали аддитивному противоопухолевому и антиметастатическому действию ингибитора NOS, γ -излучения и циклофосфамида. **Заключение.** Полученные результаты отражают способность ингибиторов NOS повышать эффективность радио- и химиотерапии злокачественных новообразований, что свидетельствует о перспективности дальнейшей разработки препаратов типа соединения T1023.

Ключевые слова: производные изотиомочевины; ингибиторы NOS, γ -излучение; циклофосфамид, противоопухолевое действие.

Для цитирования: Филимонова М.В., Макаrchук В.М., Шевченко Л.И., Филимонов А.С. Исследование влияния ингибитора NOS T1023 в сочетании с γ -излучением и циклофосфамидом на рост и метастазирование карциномы легких Льюис.

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2019; 63(3): 105-109.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.105-109

Для корреспонденции: *Филимонова Марина Владимировна*, доктор биол. наук, зав. лабораторией радиационной фармакологии, e-mail: mari_fil@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 28.12.2017

Filimonova M.V., Makarchuk V.M., Shevchenko L.I., Filimonov A.S.

EFFECT OF A NOS INHIBITOR, T1023, IN COMBINATION WITH γ -IRRADIATION AND CYCLOPHOSPHAMIDE ON GROWTH AND METASTASIS OF LEWIS LUNG CARCINOMA

A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of the National Medical Research Radiological Center, Koroleva Str. 4, Obninsk 249036, Kaluga Region, Russia

The aim was to study antineoplastic effects of a NOS inhibitor, T1023, in combination with γ -irradiation and cyclophosphamide.

Methods. Epidermoid Lewis lung carcinoma (LLC) was used as a tumor model. Two independent experiments were performed. In the first experiment, antitumor effects of T1023 and γ -irradiation were studied individually and combined. In the second experiment,

antitumor effects of T1023 and cyclophosphamide were studied individually and combined. In both experiments, mice from the first experimental group were daily injected with T1023 60 mg/kg from day 7 to 20. In the first experiment, animals of the second group were treated with γ -irradiation at 5 Gy on day 7 of tumor growth. In the second experiment, mice of the second group were injected with cyclophosphamide 100 mg/kg on day 7 of tumor growth. In both experiments, mice of the third group received a respective combined treatment according to the protocols described above. The first injection of T1023 was performed on day 7 after tumor transplantation at 4 hours after the irradiation or cyclophosphamide treatment. 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. The effect of treatments on metastatic activity of carcinoma was evaluated by the intergroup difference in number of pulmonary metastases inhibition index on day 21 of tumor growth. Statistical significance was determined using the Kruskal-Wallis dispersion analysis with the Dunn Q-test. **Results** of the study showed that the T1023 treatment both in combination with γ -irradiation and with cyclophosphamide was associated with a significantly greater inhibition of tumor growth and metastasis. The antineoplastic effect of both combinations was consistent with the additive antitumor and antimetastatic effect of the NOS inhibitor, γ -radiation, and cyclophosphamide. **Conclusion.** The study showed the ability of NOS inhibitors to enhance the effectiveness of radio- and chemotherapy for malignant tumors and suggested a promising outlook for further development of T1023.

Keywords: isothioureia derivatives; NOS inhibitors, γ -radiation; cyclophosphamide, antitumor effect.

For citation: Filimonova M.V., Makarchuk V.M., Shevchenko L.I., Filimonov A.S. Effects of the NOS inhibitor T1023 in the combination with γ -irradiation and cyclophosphamide on the growth and metastasis of Lewis lung carcinoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 105-109. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.105-109

For correspondence: Marina V. Filimonova, Doctor of Biological Science, Head of Laboratory of Radiation Pharmacology of A.Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of FSBI NMRRRC 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>

Makarchuk V.M., <https://orcid.org/0000-0001-6066-1415>

Filimonov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-4398-1764>

Received 28.12.2017

Ведение

Ранее нами показано, что гидробромид 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевин (далее, соединение T1023), являющийся эффективным ингибитором eNOS и iNOS, при субхроническом введении в дозе 60 мг/кг ($\sim 1/4$ ЛД₅₀) вызывает значительное (на 45-75%) торможение роста и подавление (на 40-80%) метастазирования карциномы легких Льюис (КЛЛ), которые развиваются вследствие нарушений неопластической васкуляризации [1]. Цель исследования – изучение влияния T1023 в сочетании с γ -излучением и циклофосфамидом на развитие и метастазирование КЛЛ. Оценка перспективности дальнейшей разработки соединения T1023.

Методика

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

дицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба.

Эксперименты выполнены на 120 самцах мышей F₁ (СВА \times С₅₇BL_{6j}) в возрасте 8–10 нед массой 20–23 г из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Мышей содержали в виварии МРНЦ в клетках Т-3 на древесно-стружечном подстиле при естественном освещении и 10-кратной вентиляции воздуха, температуре 18–20 °С и относительной влажности 40–70%, со свободным доступом к корму ПК-120-1 и питьевой воде.

Штамм эпидермоидной КЛЛ получен из ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Трансплантировали КЛЛ в область латеральной поверхности правого бедра мышей подкожно введением $1,5 \times 10^6$ клеток карциномы в 0,1 мл суспензии на основе среды 199 (ООО Пан-Эко, РФ).

Выполнено 2 серии независимых экспериментов. В I (n=60) серии изучали антинеопластические эффекты при отдельном и комбинированном воздействии T1023 и γ -излучения, во II серии (n=60) – при отдельном и комбинированном воздействии T1023 и цикло-

фосфамида. Мышей ($n=60$) для исследования брали на 7-е сут после перевивки КЛЛ, когда опухолевые узлы у всех особей имели объем 100-150 мм³. В каждой серии животные были распределены в 4 экспериментальные группы — контрольную и 3 опытные, по 15 мышей в каждой.

Животные контрольных групп в дальнейшем не получали каких-либо воздействий. Особям 1-й опытной группы в обеих сериях с 7-х по 20-е сут роста КЛЛ вводили ежедневно внутривенно соединение Т1023 (60 мг/кг) в виде 0,6% раствора на основе 0,9% раствора натрия хлорида (ОАО Дальхимфарм, РФ).

В I серии опухоли животных 2-й опытной группы на 7-е сут роста облучали на установке Луч-1 с источником ⁶⁰Со при мощности дозы 80 мГр/с (γ -излучение 5 Гр). В поле облучения выводили конечность с привитой КЛЛ, тело экранировали свинцовыми пластинами. Во II серии животным этой группы на 7-е сут роста неоплазии вводили однократно в/б циклофосфамид в дозе 100 мг/кг в виде 1,0% раствора фармакопейного препарата (циклофосфан; ОАО Биохимик, РФ) на основе 0,9% раствора натрия хлорида.

Животным 3-й опытной группы в обеих сериях проводили соответствующие комбинированные воздействия по тем же схемам и в тех же дозах. Первое введение Т1023 на 7-е сут роста КЛЛ этим животным проводили через 4 ч после облучения или введения циклофосфамида.

Влияние воздействий на рост КЛЛ оценивали по межгрупповым различиям объемов опухолевых узлов, длительности задержки роста и индексу торможения роста опухоли (ТРО) [2]. Влияние экспериментальных воздействий на активность метастазирования карциномы оценивали по межгрупповым различиям числа легочных метастазов на 21-е сут роста КЛЛ и индексу ингибирования метастазирования (ИИМ) [2]. Оценку объема опухолевых узлов на различных сроках наблюдения и подсчет числа легочных метастазов проводили по методикам [1]. Статистическую оценку значимости межгрупповых различий количественных показателей проводили с помощью дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с применением Q-критерия Данна.

Результаты и обсуждение

Результаты анализа динамики роста и активности метастазирования КЛЛ в I серии показали, что все использованные варианты экспериментальных воздействий обнаруживали статистически значимые антинеопластические эффекты (табл. 1, 2).

В то же время, выраженность этих эффектов в опытных группах животных существенно различалась. У мы-

шей, получавших отдельные воздействия γ -излучения и соединения Т1023, наблюдался статистически равный противоопухолевый эффект. В обеих группах в течение 5-6 сут после облучения и начала применения Т1023 развивалась задержка роста КЛЛ на 2-2,2 сут, и в дальнейшем до конца опыта сохранялось умеренное торможение роста неоплазии — величина ТРО составляла 30-35%. Сходным, статистически равным был и антиметастатический эффект при отдельном воздействии γ -излучения и Т1023. В обоих случаях наблюдалось статистически значимое подавление процессов метастазирования и роста легочных метастазов карциномы — величина ИИМ составляла 45—60%.

В группе животных, получавших комбинированное воздействие γ -излучения и соединения Т1023, наблюдалось выраженное, статистически значимое возрастание как противоопухолевого, так и антиметастатического эффектов. В этом случае задержка роста опухоли увеличилась до 4,2-4,4 сут, и в дальнейшем до конца опыта сохранялось выраженное торможение роста неоплазии — величина ТРО составляла 50-55%. Выращенно возрастало при этом и антиметастатическое действие — величина ИИМ превышала 70%.

При этом количественный анализ полученных в этом эксперименте данных свидетельствовал, что наблюдаемые антинеопластические эффекты в группе мышей, получавших комбинированное воздействие, статистически соответствовали уровню аддитивного, независимого противоопухолевого и антиметастатического действия γ -излучения и Т1023.

Аналогичная картина прослеживалась и во II серии экспериментов. В этом случае также все использованные варианты экспериментальных воздействий вызывали статистически значимые антинеопластические эффекты, выраженность которых в опытных группах животных существенно различалась (табл. 3, 4).

У мышей, получавших отдельные воздействия циклофосфамида и соединения Т1023, также наблюдался близкий, статистически равный противоопухолевый эффект. После начала применения Т1023 развивалась задержка роста КЛЛ на 2,7—2,9 сут, и в дальнейшем сохранялось умеренное торможение роста неоплазии — величина ТРО составляла 35-45%. После воздействия циклофосфамида задержка роста КЛЛ была более выраженной (на 5,3-5,5 сут) и в дальнейшем наблюдалось значительное торможение роста опухоли — величина ТРО составляла 50-65%. Статистически равным в этих группах было и антиметастатическое действие. В обоих случаях наблюдалось значительное, статистически значимое подавление процессов метастазирования и роста легочных метастазов — величина ИИМ составляла 73—77%.

Таблица 1

Влияние T1023 и γ -излучения при раздельном и комбинированном применении на динамику роста карциномы легких Льюис

Время роста КЛЛ, сутки	Средний относительный объем опухоли (V), отн. ед. (M \pm SD); TPO, %								
	Контроль V	T1023		γ -излучение		γ -излучение + T1023		Аддитивный эффект (расчет)	
		V	TPO	V	TPO	V	TPO	V	TPO
7	1,0	1,0	0	1,0	0	1,0	0	1,0	0
10	3,4 \pm 1,2	2,8 \pm 0,9	18	3,3 \pm 0,9	3	2,2 \pm 0,6	35	2,7 \pm 1,3	21
14	11,3 \pm 2,7	7,4 \pm 1,7 ¹	35	8,1 \pm 1,9 ¹	28	5,3 \pm 1,3 ¹²³	53	5,3 \pm 2,6	53
17	19,0 \pm 4,8	13,3 \pm 2,9 ¹	30	13,2 \pm 2,7 ¹	31	9,6 \pm 2,0 ¹²³	49	9,2 \pm 4,2	52
21	37,4 \pm 8,2	26,1 \pm 6,1 ¹	30	25,0 \pm 5,6 ¹	33	16,7 \pm 4,2 ¹²³	55	17,4 \pm 8,3	53

Примечания. Здесь и в табл. 2 – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по критерию Данна: ¹ – с контрольной группой; ² – с группой, получавшей только воздействие T1023; ³ – с группой, получавшей только воздействие γ -излучения (в группах $n = 15$).

Таблица 2

Влияние T1023 и γ -излучения при раздельном и комбинированном применении на метастазирование карциномы легких Льюис

Показатель	Среднее число легочных метастазов на 21-е сут роста (M \pm SD); ИИМ, %				
	Контроль	T1023	γ -излучение	γ -излучение + T1023	Аддитивный эффект (расчет)
Крупные метастазы	9,5 \pm 3,2	4,2 \pm 3,4 ¹	1,4 \pm 1,1 ¹	1,1 \pm 1,0 ¹	0,6 \pm 3,6
Малые метастазы	23,1 \pm 5,6	13,3 \pm 4,9 ¹	11,8 \pm 4,8 ¹	7,7 \pm 4,5 ¹²	6,8 \pm 6,9
Все метастазы	32,6 \pm 7,1	17,5 \pm 7,1 ¹	13,2 \pm 5,7 ¹	8,8 \pm 5,1 ¹²	7,1 \pm 9,1
ИИМ		46	60	73	77

Таблица 3

Влияние T1023 и циклофосфида при раздельном и комбинированном применении на динамику роста карциномы легких Льюис

Время роста КЛЛ, сутки	Средний относительный объем опухоли (V), отн. ед. (M \pm SD); TPO, %								
	Контроль V	T1023		Циклофосфамид		Циклофосфамид + T1023		Аддитивный эффект (расчет)	
		V	TPO	V	TPO	V	TPO	V	TPO
7	1,0	1,0	0	1,0	0	1,0	0	1,0	0
10	9,6 \pm 3,5	5,4 \pm 2,4 ¹	44	3,2 \pm 1,3 ¹	67	1,8 \pm 0,9 ¹²	81	1,8 \pm 2,7	81
14	18,3 \pm 6,1	11,6 \pm 5,1 ¹	37	6,6 \pm 2,6 ¹	64	4,5 \pm 1,7 ¹²	75	4,2 \pm 5,7	77
17	34,1 \pm 11,8	19,2 \pm 8,1 ¹	44	13,2 \pm 3,8 ¹	61	8,2 \pm 3,3 ¹²³	76	7,4 \pm 8,9	78
21	41,2 \pm 12,4	26,7 \pm 9,0 ¹	35	19,7 \pm 5,7 ¹	52	12,3 \pm 5,1 ¹²³	70	12,8 \pm 10,7	69

Примечания. Здесь и в табл. 4 – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по критерию Данна: ¹ – с контрольной группой; ² – с группой, получавшей только воздействие T1023; ³ – с группой, получавшей только воздействие циклофосфида (в группах $n = 15$).

Таблица 4

Влияние T1023 и циклофосфида при раздельном и комбинированном применении на метастазирование карциномы легких Льюис

Показатель	Среднее число легочных метастазов на 21-е сут роста (M \pm SD); ИИМ, %				
	Контроль	T1023	Циклофосфамид	Циклофосфамид + T1023	Аддитивный эффект (расчет)
Крупные метастазы	3,8 \pm 0,9	0,9 \pm 0,4 ¹	0,6 \pm 0,3 ¹	0,1 \pm 0,1 ¹²³	0,1 \pm 0,5
Малые метастазы	20,1 \pm 2,6	4,5 \pm 0,6 ¹	5,8 \pm 0,8 ¹	1,9 \pm 0,5 ¹²³	1,3 \pm 1,0
Все метастазы	23,9 \pm 2,8	5,4 \pm 0,7 ¹	6,4 \pm 0,8 ¹	2,0 \pm 0,5 ¹²³	1,4 \pm 1,1
ИИМ		77	73	92	94

В группе животных, получавших комбинированное воздействие, наблюдалось статистически значимое возрастание антинеопластических эффектов. На фоне комбинированного воздействия циклофосфида и T1023 задержка роста опухоли увеличилась до 8,1-8,3 сут и в дальнейшем сохранялось выраженное торможение роста КЛЛ – величина ТРО составляла 70-80%. При этом неоплазия метастазировала крайне слабо, и практически полностью подавлялся рост легочных метастазов – величина ИИМ превышала 90%.

Как и в первом опыте, количественный анализ полученных данных свидетельствовал, что антинеопластические эффекты при комбинированном воздействии статистически соответствовали уровню аддитивного противоопухолевого и антиметастатического действия циклофосфида и соединения T1023.

В целом, усиление противоопухолевых эффектов при комбинированном применении соединения T1023 в сочетании с γ -излучением и циклофосфамидом, в целом, согласуется с результатами работ, в которых показана способность некоторых известных ингибиторов NOS (L-NNA, L-NAME, L-NIL, аминоганидин) повышать эффективность лучевой, химио- и фотодинамической терапии экспериментальных неоплазий [3-7]. При этом отчетливый аддитивный характер фармакодинамического взаимодействия T1023 с γ -излучением и циклофосфамидом в противоопухолевом и антиметастатическом действии, вероятно, является отражением различия механизмов и независимости реализации этих эффектов при воздействии этих факторов.

Наблюдаемая в экспериментах выраженность антинеопластической активности ингибитора NOS T1023 и позитивный характер его фармакодинамического взаимодействия с ионизирующими излучениями и цитостатическими средствами свидетельствуют о целесообразности дальнейшей разработки этого соединения в качестве противоопухолевого средства.

Литература

1. Филимонова М.В., Южаков В.В., Шевченко Л.И., Бандурко Л.Н., Севанькаева Л.Е., Макачук В.М. и др. Экспериментальное исследование противоопухолевой активности нового ингибитора синтеза оксида азота T1023. *Молек. медицина*. 2015; (1): 61-4.

Сведения об авторах:

Филимонова Марина Владимировна, зав. лаб. радиационной фармакологии, доктор биол. наук;
Макачук Виктория Михайловна, ст. науч. сотр. лаб. радиационной фармакологии, канд. биол. наук;
Шевченко Людмила Ивановна, вед. науч. сотр. лаб. радиационной фармакологии, канд. химич. наук;
Филимонов Александр Сергеевич, науч. сотр. лаб. радиационной фармакологии.

2. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть первая. М.; Гриф и К, 2012.
3. Cardnell R.J., Mikkelsen R.B. Nitric oxide synthase inhibition enhances the antitumor effect of radiation in treatment of squamous carcinoma xenografts. *PLoS One*. 2011; 6(5): e20147.
4. Ridnour L.A., Cheng R.Y., Weiss J.M., Soto Pantoja D.R., Basudhar D., Heinecke J.L. et al. NOS inhibition modulates immune polarization and improves radiation-induced tumor growth delay. *Cancer Res*. 2015; 75(14): 2788-99.
5. Sikora A.G., Gelbard A., Davies M.A., Sano D., Ekmekcioglu S., Kwon J. et al. Targeted inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits growth of human melanoma in vivo and synergizes with chemotherapy. *Clin. Cancer Res*. 2010; 16(6): 1834-44.
6. Sinha B.K., Kumar A., Bhattacharjee S., Espey M.G., Mason R.P. Effect of nitric oxide on the anticancer activity of the topoisomerase-active drugs and adriamycin in human melanoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2013; 347(3): 607-14.
7. Girotti A.W., Fahey J.M., Korytowski W. Multiple means by which nitric oxide can antagonize photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem*. 2016; 23(24): 2754-69.

References

1. 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)
2. *A guide to preclinical drug research. Part one [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. Chast' pervaya]*. Moscow; Grif I K; 2012. (in Russian)
3. Cardnell R.J., Mikkelsen R.B. Nitric oxide synthase inhibition enhances the antitumor effect of radiation in treatment of squamous carcinoma xenografts. *PLoS One*. 2011; 6(5): e20147.
4. Ridnour L.A., Cheng R.Y., Weiss J.M., Soto Pantoja D.R., Basudhar D., Heinecke J.L. et al. NOS inhibition modulates immune polarization and improves radiation-induced tumor growth delay. *Cancer Res*. 2015; 75(14): 2788-99.
5. Sikora A.G., Gelbard A., Davies M.A., Sano D., Ekmekcioglu S., Kwon J. et al. Targeted inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits growth of human melanoma in vivo and synergizes with chemotherapy. *Clin. Cancer Res*. 2010; 16(6): 1834-44.
6. Sinha B.K., Kumar A., Bhattacharjee S., Espey M.G., Mason R.P. Effect of nitric oxide on the anticancer activity of the topoisomerase-active drugs and adriamycin in human melanoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2013; 347(3): 607-14.
7. Girotti A.W., Fahey J.M., Korytowski W. Multiple means by which nitric oxide can antagonize photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem*. 2016; 23(24): 2754-69.

Джусоева Е.В.¹, Колокольцова Т.Д.^{1,2}, Сабурин И.Н.^{1,2}

Меланоциты кожи человека: их роль в норме и патологии

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

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России,
125993, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

Обзор включает данные анализа современной литературы по вопросам происхождения и дифференцировки клеток-предшественников меланоцитов в эмбриогенезе и взрослом состоянии, их локализации и роли в пигментации кожи и волос. Особое внимание в обзоре уделено рассмотрению факторов, участвующих или влияющих на процессы нормального меланогенеза и патологических нарушений пигментации, обусловленных влиянием генетических и эпигенетических факторов, а также процессов старения клеток. Идентификация и понимание процессов меланогенеза, а также механизмов изменения функциональной активности меланоцитов кожи человека облегчит понимание патогенеза нарушений пигментации и позволит разрабатывать новые высокоэффективные препараты для профилактики и терапии заболеваний, коррекции возрастных изменений, а также препаратов, снижающих риск развития рака кожи.

Ключевые слова: меланоцит; меланогенез; пигментация кожи; старение кожи.

Для цитирования: Джусоева Е.В., Колокольцова Т.Д., Сабурин И.Н. Меланоциты кожи человека: их роль в норме и патологии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(3):110-117.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.110-117

Финансирование. Работа не имеет финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Колокольцова Т.Д., e-mail: kolokoltd@mail.ru

Поступила 08.04.2019

Djussoeva E.V.¹, Kolokoltsova T.D.^{1,2}, Saburina I.N.^{1,2}

Human skin melanocytes: their role in normal and pathological conditions

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315;

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education,
Barrikadnaya Str. 2/1, Bld.1, Moscow 125993

Melanocytes represent an important type of human skin cells. They synthesize the pigment melanin, which determines skin pigmentation and provides protection from ultraviolet radiation and other external factors. Regulation of pigmentation involves many factors essential for development, regeneration, and aging of melanocytes and their precursors as well as the factors involved in synthesis of melanin, formation, transport and distribution of melanosomes and melanocyte-specific transcription factors that control the expression and function of all these genes.

This review focused on origination and differentiation of melanocyte progenitor cells in embryogenesis and adulthood, their localization and role in skin and hair pigmentation. Particular attention was paid to the factors involved in or affecting processes of normal melanogenesis, pigmentation abnormalities due to genetic and epigenetic factors, and the processes of cell aging. The authors underlined that melanogenesis and the pigment packing and transportation to epithelial cells are complex and multifactorial processes determined by many external and internal factors, such as performance of genes, enzymes, structural proteins, and effects of hormones and medicines. Age-related changes in cells and the body as a whole are serious factors of pigmentation disorders. Despite numerous studies, information about possibilities of influencing the processes of aging or pathological disorders of skin pigmentation is extremely scarce. Identification and understanding processes involved in melanogenesis and mechanisms of changes in the functioning of human skin melanocytes will facilitate understanding the pathogenesis of pigmentation disorders and help developing new, highly effective drugs for prevention and treatment of diseases or age-related changes, specifically for prevention or reducing the risk of skin cancer.

Keywords: melanocyte; melanogenesis; skin pigmentation; skin aging.

For citation: Djussoeva E.V., Kolokoltsova T.D., Saburina I.N. Human skin melanocytes: their role in normal and pathological conditions. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 110-117. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.110-117

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 08.04.2019

Кожа является жизненно важным органом, создающим физический барьер, служит основным защитным механизмом от патогенов, обезвоживания и агрессивного воздействия окружающей среды. Под воздействием внутренних и внешних факторов, кожа часто реагирует, изменяя пигментацию. Влияние окружающей среды, например, ультрафиолета (УФ), определенные лекарственные средства и химические соединения, а также эндокринные факторы вызывают временные (например, во время беременности) или постоянные (например, в процессе старения организма) изменения цвета кожи.

Меланоциты – один из важных типов клеток кожи человека, которые отвечают за процессы ее пигментации, защиты от ультрафиолетового излучения и других факторов внешнего воздействия. Высокая частота нарушений процессов, обеспечивающих пигментацию, а также высокая вероятность повреждения кожи при травмах подчеркивают актуальность понимания механизмов меланогенеза, изучения источников стволовых клеток, исследования факторов, влияющих на их дифференцировку в меланоциты.

Цель обзора – анализ современных данных литературы по меланоцитам кожи человека, источнику их в эмбриогенезе и взрослом организме, процессу их дифференцировки и функциональной активности меланоцитов в норме и патологии.

Меланоциты: их роль, морфология и локализация в организме. Меланоциты являются высокоспециализированными клетками, вырабатывающими пигмент меланин, определяющий цвет кожи. Большинство их располагается в коже, внутреннем ухе, пигментированной части эпителия сетчатки глаза, а также сосудистого слоя сетчатки глаз и в других органах, включая сердце и центральную нервную систему. В коже человека они, в основном, локализованы в базальном слое эпидермиса, но также в дерме, волосяных фолликулах. В коже мышей меланоциты расположены только в волосяных фолликулах и в голых областях эпидермиса или дермы, таких как хвост, ухо и лапа [1].

Меланоциты имеют вид разветвленных клеток, тело которых лежит в базальном слое эпидермиса, а длинные отростки идут в шиповатый слой [2]. Эпидермальные меланоциты прикреплены к базальной пластинке с помощью рецепторов интегрин, а к окружающим кератиноцитам с помощью E-кадгериновых контактов [3]. Обычно они имеют длину около 7 мкм, хотя их размер может варьировать. Как правило, от 1000 до 2000 меланоцитов находится на одном квадратном миллиметре кожи или приблизительно от 5% до 10% клеток в базальном слое эпидермиса. Показано, что относительное количество этих клеток примерно

одинаково для обоих полов и для всех рас. Отдельная популяция меланоцитов находится в волосяных фолликулах и участвует в пигментации волосков. Существует мнение, что различия в окраске кожи определяются относительной активностью этих клеток, а не их количеством [3].

Меланоциты синтезируют меланин: черно-коричневый (эумеланин) или желто-красный (феомеланин), создавая разнообразие цвета кожи и волос. Меланин является сложным гетерополимером, который поглощает свет ультрафиолетового и видимого спектра, обеспечивая наиболее эффективную защиту кожи от солнечного излучения. Пигментпродуцирующая активность меланоцитов в коже человека сложным образом регулируется кератиноцитами и окружающей стромой [4]. Меланин накапливается в меланосомах, которые транспортируются в отростки (дендриты) клеток. Перенос меланосом достигается, когда кератиноциты охватывают и меланосомосодержащие цитоплазматические дендритные отростки меланоцитов. Из последних они поступают в кератиноциты эпидермиса, где защищают ядерный аппарат от повреждения ультрафиолетовыми лучами, а в дальнейшем разрушаются лизосомами. Показано, что в фетальных клетках кожи человека разрушение меланосом и меланина возможно как в аутофагосомах меланоцитов, так в фагосомах кератиноцитов с участием эндоплазматического ретикулаума [5]. Воздействие ультрафиолетового (УФ) света увеличивает скорость образования меланосом и скорость их доставки в кератиноциты [6, 7]. Кроме УФ и солнечных лучей синтез меланина и его транспорт в эпителиальные клетки активируются меланоцитстимулирующим (МСГ) и адренкортикотропным (АКТГ) гормонами. Показана роль меланоцитов в иммунной защите организма [8].

Меланоциты, характеризуются высокой тирозиназной активностью. МСГ играет важную роль в регуляции дифференцировки меланоцитов в эпидермисе и волосяной луковице, влияет на активность тирозиназы, образование меланосом, их перенос и увеличение дендритогенеза. Установлено, что пролиферативная активность дифференцирующихся эпидермальных меланоцитов новорожденных мышей во время заживления кожных ран контролируется полудоминантными генами [9]. На функциональную активность меланоцитов и, главным образом, меланогенез, значительное влияние оказывают кератиноциты и фибробласты кожи. При культивировании эпидермальных меланобластов в бессывороточной среде отмечено, что фактор роста фибробластов стимулирует устойчивую пролиферацию меланобластов в присутствии дибутирил аденозин 3'-5'-цикли-

ческого монофосфата и кератиноцитов. Показано, что полученный из фибробластов кератиноцитстимулирующий ростовой фактор (KGF) стимулирует дифференциацию и пролиферацию меланобластов человека совместно с циклическим аденозинмонофосфатом (цАМФ), основным фактором роста фибробластов (bFGF) и эндотелином -1 (ET-1), а также неопределенными факторами, происходящими от кератиноцитов. Эти результаты подтверждают, что функциональная активность меланоцитов в эпидермисе и волосистой луковице контролируются не только генетическими, но и другими факторами, такими как гормоны и факторы роста.

Источники клеток-предшественников в эмбриогенезе и взрослом организме. Меланобласты являются клетками-предшественниками меланоцитов в эмбриогенезе и формируются во время гаструляции у развивающегося эмбриона на дорсальном крае нервного гребня (НГ) [10]. Клетки НГ очень мобильны и способны давать начало многим типам клеток, включая меланоциты, которые мигрируют в базальный слой эпидермиса и волосяные фолликулы [11, 12].

На процессы миграции, пролиферации и дифференцировки клеток в меланинпродуцирующие влияют медиаторы, выделяемые клетками дорсальной части нервной трубки, эктодермы и кератиноцитами. В качестве медиаторов могут выступать семейство гликопротеинов WNT, эндотелин 3 (EDN3) и фактор стволовых клеток (SCF), который связывает тирозинкиназу с рецептором *c-kit* в меланоцитах и меланобластах [11, 13, 14]. Показано, что мутации в генах *c-kit* и *SCF* вызывают пьебалдизм, генодерматоз с депигментированными макулами [11]. Образование бипотентных глиально-меланоцитарных клеток зависит от активности генов *Pax3*, *Sox10* и *Wnt* белков [15].

Во взрослом организме меланоциты являются долгоживущими дендритными клетками с медленным клеточным циклом, не имеющими значительного источника стволовых клеток во взрослом организме. Это означает, что если меланоцит повреждается или начинает хуже работать в каком-то отношении, он не может правильно сохранять и передавать кератиноцитам меланосомы, содержащие пигмент. Результатом является местная гипо- или гиперпигментация. Для продолжительного существования организма и его защиты от внешних воздействий необходим источник стволовых или прогениторных клеток. Многие исследования показали, что одним из источников, позволяющим поддерживать и восстанавливать популяцию меланоцитов в зрелой коже, являются стволовые клетки меланоцитов (McSCs), расположенные в волосяных

фолликулах или в области выпуклости волосяного фолликула [14, 16].

В ответ на различные виды повреждений стволовые клетки меланоцитов (McSC), расположенные в выпуклости волосяных фолликулов, могут дифференцироваться в зрелые меланоциты. Группой ученых из Китая и США показано, что после эпиляции мышей McSCs дифференцируются в фолликулярные и эпидермальные меланоциты. Это приводит к гиперпигментации кожи и волос. Результаты этих исследований подтвердили, что эпиляция приводит к эндогенной активации эндотелина 3 (EDN3) в каждом сосочке, вторичных зародышевых клетках волос и эпидермисе [17].

О молекулярных факторах индукции дифференцировки и функционирования меланоцитов известно немного. MITF (микрофальма транскрипционный фактор) является специфическим молекулярным маркером меланоцитов и тесно связан с их развитием. Показано, что мутации в гене MITF человека могут приводить к синдрому Ваарденбурга типа 2 (WS2) и синдрому Титца, которые преимущественно наследуются и связаны с фенотипом болезни гипопигментации и потери слуха [13].

В процессе дифференцировки меланоцитов экспрессия MITF регулируется такими факторами транскрипции, как PAX3 (paired-box 3) и SOX10 (sex-determining region Y (SRY)-box 10) [18-20]. Показано, что FOXD3 и SOX2 подавляют экспрессию гена MITF, активированного PAX3 и SOX10 в клетках НГ, благодаря чему их дифференцировка может смещаться в сторону нейрональной линии. Отмечено, что в регуляции развития меланоцитов участвуют также WNT3A и факторы роста, например, фактор стволовых клеток (SCF, лиганд KIT), эндотелины, эфрин и костный морфогенетический белок 4 (BMP4) [21, 22]. Данные литературы свидетельствуют о сложности, многофакторности и недостаточной изученности процесса дифференцировки меланоцитов. Новые возможности для проведения молекулярно-биологических исследований, в том числе изучения процессов дифференцировки и функционирования клеток, дает использование модели клеток, культивированных *in vitro* [23].

Большинство млекопитающих имеют пигментированный волосяной покров. Ключом к пониманию механизма образования меланина и пигментации волоса является описанная выше популяция стволовых клеток меланоцитов (McSCs), ранее известная как «амеланотические меланоциты». В настоящее время в зрелом волосяном фолликуле выделяют 3 группы анатомически и функционально различимых меланоцитов: стволовые клетки меланоцитов (McSCs), клетки-

предшественники меланоцитов и терминально дифференцированные меланоциты. McSCs впервые были идентифицированы в области выпуклости волосяного фолликула, который и в настоящее время считается их главной нишей [13, 24]. Низкая концентрация Pax10, высокие уровни трансформирующего ростового фактора TGF β и повышенная активность Notch защищают McSCs от процесса дифференцировки в меланоциты [25]. Кроме McSCs, здесь присутствуют стволовые клетки волосяного фолликула (HFSC). Обычно HFSC и McSCs мигрируют к основанию волосяного фолликула, дифференцируются в кератиноциты и меланоциты и участвуют в формировании пигментированного волоса. Показано, что в определенных условиях, McSCs из волосяного фолликула могут мигрировать и дифференцироваться в меланоциты базального слоя эпидермиса [14].

Меланоциты формируются в волосяном фолликуле в начале цикла роста волос (фаза анагена) и умирают апоптозом в конце цикла (фаза катагена). Клетки-предшественники, локализованные в области выпуклости волосяного фолликула, могут сохраняться в виде стволовых клеток меланоцитов или дифференцироваться в меланоциты, продуцирующие меланин. Меланосомы, содержащие меланин, переносятся в соседние кератиноциты, что определяет цвет волос. Согласно данным Sarin KY. и Artandi SE. стволовые клетки меланоцитов и прогениторные меланоциты, локализованные в области выпуклости, экспрессируют допахом тауроминазу (Dct) и родственную тирозиназу белок 1 (Trp1), но не имеют фермента тирозиназы (Tyr), регулирующего скорость синтеза пигмента, поэтому они не продуцируют меланин [13]. В анагенной фазе цикла роста волос клетки-предшественники дифференцируются в зрелые меланоциты, которые производят ферменты, необходимые для синтеза меланина (Trp1, Dct и Tyr).

В результате оркестрового поведения популяций этих стволовых и прогениторных клеток, кератиноциты волосяного матрикса, которые содержат переданные меланоцитами меланин, собираются и формируют пигментированные стержни волос. В ответ на ранение или ультрафиолетовое облучение McSCs могут выйти из фолликулярной ниши стволовых клеток, мигрировать к базальному слою эпидермиса и дифференцироваться в функциональные эпидермальные меланоциты [26]. Эти факты позволяют объяснить, что шрамы кожи очень часто гипопигментированы и это происходит из-за разрушения волосяного фолликула.

Несмотря на множество проведенных исследований, остается открытым вопрос о возможном существовании других ниш стволовых клеток меланоцитов.

Показано, что мультипотентные дермальные стволовые клетки, выделенные из крайней плоти человека, где отсутствуют волосяные фолликулы, дифференцировались в меланоциты. В трехмерной модели кожного эквивалента сферообразующие клетки дифференцировались в HMB45-положительные меланоциты (маркер клеток меланомы человека), которые мигрировали из дермы в эпидермис и располагались среди кератиноцитов базального слоя аналогично пигментированным меланоцитам, выделенным из эпидермиса [16, 27, 28]. Исследование этих фактов может значительно изменить наши представления о влиянии ранних эпигенетических или генетических факторов на трансформацию меланоцитов и получить новые данные о причинах нарушения пигментации кожи. Понимание механизмов функционирования целого ансамбля клеток в коже и ее регенерации представляет особый интерес для биоинженеров, поскольку при создании заменителя кожи необходимо решать не только проблемы восстановления кожного покрова, но и проблемы меланогенеза и пигментации.

Меланогенез. Пигментация кожи является важной фенотипической чертой человека. Процесс продукции меланина в меланоцитах называется меланогенезом. Показано, что меланоцит взаимодействует с эндокринной, иммунной и центральной нервной системами, а его пигментпродуцирующая активность также регулируется внешними факторами, такими как УФ излучение и лекарственные препараты [29]. Меланин выполняет не только защитную, но и иммунорегуляторную роль. Показано, что перенос подкисленных меланин-содержащих меланосом из меланоцитов в соседние кератиноциты в наружном слое эпидермиса может принимать участие в подкислении рогового слоя пигментированной кожи и, таким образом, повышает не только барьерную функцию кожи и целостность/плотность рогового слоя, но и оказывать антимикробное действие [8].

Несмотря на множество проведенных исследований, условия регуляции пигментации кожи и волос до сих пор полностью не понятны. Показано, что ультрафиолет активирует ростовой фактор на поверхности клеток и цитокиновые рецепторы, что запускает каскад сигнальных путей, регулирующих экспрессию множества генов [30]. Отмечается центральная роль тирозиназы в качестве ключевого фермента при иницировании меланогенеза. Последняя тесно связана с 6ВН4-зависимой фенилаланингидроксилазой (phenylalanine hydroxylase, PAH) и изоформой тирозингидроксилазы I (tyrosine hydroxylase isoform, THI), что подтверждает известную концепцию работы 3 ферментов для иницирования пигментации [31]. Ме-

ланогенез — это сложный биохимический процесс, контролируемый в основном тремя факторами: тирозиназой, которая окисляет тирозин до 3,4-дигидроксифенилаланина (DOPA), родственным тирозиназе белком 1 (TyRP-1), и родственным тирозиназе белком 2 (TyRP-2). Также показано, что контроль пигментации кожи осуществляется с участием более 150 генов [3]. Одним из важных уровней контроля является связывание меланоцит-стимулирующего гормона с рецептором меланокортина-1 (MC-1R) на меланоцитах. Ферменты, контролирующие меланогенез, транспортируются в меланосоме, где биохимические процессы происходят в защищенной среде. Пигмент формируется в меланосомах, которые транспортируются в кератиноциты и создают защитный «зонтик» над ядром. Полиморфизмы в MC-1R контролируются относительными количествами трех ключевых ферментов. Снижение TyRP-1 и TyRP-2 приводит к выработке феомеланина, коричнево-красного пигмента с низкими фотозащитными свойствами. Этот тип пигмента наблюдается у рыжеволосых людей и связан с пониженной защитой от солнца, повышенным фотостарением и более высоким уровнем возникновения меланомы и немеланомного рака кожи. Ультрафиолетовый свет может трансформировать меланоциты в злокачественную меланому, самую опасную форму рака кожи [32].

Эпидермальные кератиноциты человека экспрессируют NMDA-рецептор 1 (N-methyl-D-aspartate), стимуляция которого приводит к увеличению количества филоподий, а его блокирование антагонистом к уменьшению их количества. Эти морфологические изменения сопровождаются дезорганизацией микрофиламентов β -тубулина во внутриклеточном цитоскелете. Есть мнение, что NMDAR управляет переносом меланосом, способствуя их доставке, в то время как его антагонист МК-801 (Dizocilpine) влияет на внутриклеточное перераспределение β -тубулина и формирование филоподий между меланоцитами и кератиноцитами [33]. Авторы полагают, что NMDA-рецептор-зависимая передача сигналов участвует в процессе переноса меланосом и связана с притоком кальция, перераспределением белков цитоскелета, образованием дендритов и филоподий. Детальное понимание процесса переноса меланосом имеет решающее значение для разработки методов лечения гипер- и гипопигментных нарушений кожи.

Таким образом, анализ литературы показал, что меланогенез является сложным и многофакторным процессом, регулируемым не только внешними факторами, но также на молекулярном и генетическом уровнях. Механизм меланогенеза окончательно не определен. Отмечено, что важную роль в процессе меланогене-

за играют следующие группы факторов: структурные белки меланосом, ферменты, необходимые для синтеза меланина, и белки, необходимые для транспорта и распределения меланосом [34, 35]. Любые нарушения функций этих ферментов или белков вызывают нарушения пигментации, список которых регулярно обновляется и публикуется на сайте Европейского общества исследований пигментных клеток.

Нарушения пигментации. Как уже отмечалось, меланогенез — сложный процесс. Нарушения его могут выражаться в разных дефектах пигментации, классифицируемых как гипо- или гиперпигментация, которые могут быть обусловлены изменением количества меланоцитов или их активности [29]. Как известно, цвет кожи определяет не количество меланоцитов, а количество, размер и распределение меланосом. У людей с бледной кожей меньше меланосом, упакованных в мембраносвязанные комплексы [3]. Данные современной литературы свидетельствуют о большом разнообразии причин нарушения пигментации кожи человека. Показано, что лейкодерма или заболевания, вызывающие «осветление» или «побеление» кожи, могут быть вызваны уменьшением количества меланоцитов, в то время как витилиго является результатом аутоиммунного разрушения меланоцитов. Альбинизм, с другой стороны, вызван дефицитом полностью пигментированных меланосом.

Серьезным нарушением является и увеличение пигмента. Показано, что увеличение выработки пигмента при нормальном количестве меланоцитов приводит к появлению веснушек. Черные «солнечные ожоги» или «чернильные пятна» являются результатом базальной гиперпигментации и повышенного содержания меланина в роговом слое кожи. Невусы являются результатом активной пролиферации меланоцитов, что приводит к формированию доброкачественных образований, в то время как меланомы являются результатом злокачественных новообразований [36]. Приобретенные нарушения гиперпигментации включают в себя старческие лентигоны, меланоз Рилия, губную меланозную макулу, эритромеланоз фолликулярной фасции Китамуры, пигментацию, вызванную ультрафиолетовым излучением, химическую или лекарственную пигментацию и многие другие [35].

Отмечено, что серьезной проблемой остаются генетические нарушения меланогенеза. Альбинизм может быть вызван нарушением ряда генов, таких как OCA2, SLC45A2, TYRP1, и HPS1. Согласно данным литературы признано 17 видов окуло-кожного альбинизма. Каждый ген регулирует разные белки, которые играют роль в производстве пигментов. Люди с синдромом Хедиака-Хигаси имеют обильное накопление

гранул меланина из-за аномальной функции микротрубочек [11].

Гиперпигментация, связанная с системными расстройствами, включает нарушения обмена веществ или ферментов (гемохроматоз, болезнь Вильсона, болезнь Гоше, болезнь Нимана-Пика, амилоидоз), эндокринные расстройства (болезнь Аддисона, синдром Кушинга и гипертиреоз) нарушения питания (пеллагра, дефицит витамина В12, дефицит фолиевой кислоты, болезнь бродяги и др.), мастоцитоз, нарушения в продукции коллагена, дисфункцию печени или почек. Гиперпигментация также может быть связана с инфекционными заболеваниями (корь, сифилис) и синдромами ряда заболеваний (болезнь фон Реклингхаузена, синдром Сотоса, синдром ПОЭМС, и др.) [35].

Как уже отмечалось выше, любые нарушения процесса дифференцировки клеток или меланогенеза могут приводить к серьезным изменениям меланоцитов, включая процессы, способствующие развитию опухоли. Отмечено, что основными факторами риска развития меланом являются УФО, фенотип (белая кожа, светлые (голубые) глаза), наличие в анамнезе солнечных ожогов, невусы, наследственность (семейный анамнез меланомы), возраст старше 50 лет [36]. Но самая большая опасность, возникающая вследствие воздействия избытка ультрафиолета, особенно, УФ-В, – это повреждение ДНК меланоцитов [7, 37]. Избыточная инсоляция может спровоцировать неконтролируемое деление меланоцитов и привести к неравномерному распределению повышенной концентрации пигментов в верхнем слое кожи, что обуславливает появление доброкачественного новообразования в виде пигментных пятен (Лентиги), либо формированию меланомы. Считается, что развитие меланомы возникает из-за нарушенного гомеостаза меланоцитов [4, 38]. Меланома (меланобластома) – опухоль, развивающаяся из меланоцитов. Наряду с плоскоклеточным и базальноклеточным раком кожи относится к злокачественным опухолям кожи. По данным ВОЗ, в 2000г. во всем мире было диагностировано более 200 000 случаев заболевания меланомой и имело место 65 000 связанных с меланомой летальных исходов [39]. В программе SEER (The Surveillance, Epidemiology, and End Results) отмечается, что заболеваемость меланомой возросла на 600% с 1950 по 2000 гг.

Возрастные изменения пигментации кожи и волос. Старение – комплексный биологический процесс метаболических и структурно-функциональных изменений организма, захватывающий как внутренние органы и системы, так и ткани, определяющие внешний облик [40]. Воздействие солнечных лучей является основным экологическим стресс-фактором, который повреждает кожу. А годы накопленного экологическо-

го стресса в клеточных структурах приводят к раннему старению кожи [41]. Нельзя не отметить, что с возрастом в коже происходят значительные структурные и функциональные изменения, включая кожные и эпидермальные истончения, снижение эпидермальной пролиферации и восстановления повреждений, потерю кожной эластичности и появление морщин, а также седина, истончение и потеря волос [42]. Накопление в коже стареющих клеток со временем снижает активность регенеративных процессов в коже, способствуя ее старению. Показано, что кератиноциты и дермальные фибробласты также подвергаются старению в ответ на внутренние и внешние стрессорные воздействия, включая укорочение теломер, перепроизводство активных форм кислорода и воздействие солнечного света [41].

Генетические и эпигенетические механизмы широко вовлечены в процессы старения, которые характеризуются широкой индивидуальной вариабельностью, связанной с многообразием плейотропных генов [43]. В настоящее время известно, что более 350 локусов прямо или косвенно связаны с процессами старения у мышей, мутации многих из этих генов приводят к пигментным расстройствам у человека [35]. Регулирование процесса пигментации включает в себя множество факторов, необходимых для развития, регенерации и старения меланоцитов и их предшественников, а также тех факторов, которые участвуют в синтезе меланина, формировании, транспорте и распределении меланосом и специфических для меланоцитов факторов транскрипции, которые контролируют экспрессию и функцию всех этих генов. Эпигенетические механизмы непосредственно регулируют гомеостаз и регенерацию кожи, но они также влияют на старение клеток, естественные и патологические процессы старения организма [43, 44]. Анализируя современную литературу, авторы подтверждают патогенную роль продуктов конечного гликирования (AGE) в старении и заживлении кожных ран [45].

Несмотря на многочисленные исследования сведения о возможности влияния на процессы старения или патологические нарушения пигментации кожи крайне ограничены. Установлено, что по мере старения активность меланоцитов снижается, делая кожу более восприимчивой к действию УФ. С возрастом меланоциты могут группироваться, приводя к появлению возрастных пигментных пятен или патологическим изменениям кожи. Ученые из Калифорнии полагают, что на процесс старения кожи и функции кератиноцитов и меланоцитов значительно влияет дисфункция митохондрий в фибробластах кожи [42]. Показано нарушение скорости аутофагии или процесса «очистки клет-

ки», снижение скорости протеолиза клеток, что приводит к ускорению старения клетки [46].

Инсоляция, курение, загрязнение воздуха и нарушения питания ускоряют естественное старение. Солнечное облучение, помимо явных рисков возникновения злокачественных новообразований кожи или трансформации предраковых состояний, способствует старению кожи вследствие своего негативного эффекта на эластические волокна [6]. Появляются «сенильные пятна», развивается солнечный эластоз кожи лица и шеи в области наиболее подверженных инсоляции, а следовательно, и наиболее повреждаемых зон [40].

Заключение

Анализ современной литературы показал, что сложный и многофакторный процесс пигментпродуцирующей активности меланоцитов - меланогенез, упаковка пигмента и его передача эпителиальным клеткам зависит от множества внешних и внутренних факторов, включая работу генов, ферментов, структурных белков, влияния гормонов, лекарственных препаратов. Серьезными факторами нарушения защитной функции меланоцитов являются возрастные изменения на организменном и клеточном уровнях, обусловленные генетическими и эпигенетическими факторами. Многочисленные исследования отечественных и зарубежных авторов свидетельствуют о влиянии разных факторов на дифференцировку меланоцитов, меланогенез и процессы старения, однако детальный механизм их функционирования в норме и патологии до сих пор не ясен. Понимание же процессов меланогенеза, а также механизмов изменения функциональной активности меланоцитов кожи человека облегчит понимание патогенеза нарушений пигментации и позволит бороться с проблемами возрастных изменений, а также разработать новые высокоэффективные препараты для профилактики и терапии кожных заболеваний.

Литература (п.п.: 1; 3-22; 24-38; 41-46 см. References)

2. Быков В. Л. *Частная гистология человека*. СПб; СОТИС, 2011.
23. Сабурин И.Н., Джусоева Е.В., Горкун А.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Колокольцова Т.Д. и др. 3D культура меланоцитов как тест-система и клеточная модель для изучения патологии меланогенеза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 236-29.
39. Ультрафиолетовое излучение и здоровье детей. ВОЗ, *Информационный бюллетень*. № 305 декабрь 2009 г.
40. Юсупова Л. А. Современный взгляд на проблему старения кожи. *Лечащий врач*. 2017; 6: 75-80.

References

1. Metcalfe AD, Ferguson MW. Skin stem and progenitor cells: using regeneration as a tissue-engineering strategy. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Jan; 65(1): 24-32.
2. Bikov V.L. *Private human histology [Chastnaya gistologiya cheloveka]*. Saint Petersburg; SOTIS, 2011. (in Russian)
3. Fenner J., Clark R. A. Anatomy, physiology, histology, and immunohistochemistry of human skin. *Skin tissue engineering and regenerative medicine*. 2016; 1: 1-17.
4. Santiago-Walker A. et al. Melanocytes: from morphology to application. *Skin pharmacology and physiology*. 2009; 22(2): 114-21.
5. Xiao L., Zhang R., Zhu W. The distribution of melanocytes and the degradation of melanosomes in fetal hair follicles. *Micron*. 2019; 119: 109-16.
6. Zamarrón A. et al. Fernblock Prevents Dermal Cell Damage Induced by Visible and Infrared A Radiation. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19 (8): 2250.
7. Pines A. et al. Differential activity of UV-DDB in mouse keratinocytes and fibroblasts: impact on DNA repair and UV-induced skin cancer. *DNA repair*. 2009; 8(2): 153-61.
8. Hong Y. et al. Melanocytes and skin immunity. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Elsevier, 2015; 17(1): 37-9.
9. Hirobe T. Structure and function of melanocytes: microscopic morphology and cell biology of mouse melanocytes in the epidermis and hair follicle. *Histology and histopathology*. 1995; 10(1): 223-37.
10. Thomas A. J., Erickson C. A. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment cell & melanoma research*. 2008; 21(6): 598-610.
11. Costin G.E., Hearing V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB journal*. 2007; 21(4): 976-94.
12. Ernfors P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Experimental cell research*. 2010; 316 (8):1397-407.
13. Sarin K. Y., Artandi S. E. Aging, graying and loss of melanocyte stem cells. *Stem cell reviews*. 2007; 3(3): 212-7.
14. Mull A., Zolekar A., Wang Y.C. Understanding melanocyte stem cells for disease modeling and regenerative medicine applications. *International journal of molecular sciences*. 2015; 16 (12): 30458-69.
15. Hou L., Pavan W.J. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? *Cell research*. 2008; 18(12): 1163.
16. Li H. et al. Epilation induces hair and skin pigmentation through an EDN3/EDNRB-dependent regenerative response of melanocyte stem cells. *Scientific reports*. 2017; 7 (1): 7272.
17. Bondurand N. et al. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Human molecular genetics*. 2000; 9(13):1907-17.
18. Potterf S. B. et al. Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. *Human genetics*. 2000; 107 (1): 1-6.
19. Watanabe K. et al. Identification of a distal enhancer for the melanocyte-specific promoter of the MITF gene. *Pigment cell research*. 2002; 15(3): 201-11.
20. Cooper C. D., Raible D. W. Mechanisms for reaching the differentiated state: Insights from neural crest-derived melanocytes. *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press. 2009; 20(1): 105-10.

21. Hirobe T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment cell & melanoma research*. 2011; 24(3): 462-78.
22. Gola M. et al. Melanocyte stem cells: biology and current aspects. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2012; 18(10): RA155.
23. Saburina I.N., Djussoeva E.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Kolokoltsova T.D., Skuratovskaya L.N., Repin V.S. 3D culture of melanocytes as a test system and cell model for studying the pathology of melanogenesis. Pathological physiology and experimental therapy. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(4): 265-8. (in Russian)
24. Nishimura E.K. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment cell & melanoma research*. 2011; 24(3): 401-10.
25. Kubic J.D. et al. Pigmentation PAX-ways: the role of Pax3 in melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance, and disease. *Pigment cell & melanoma research*. 2008; 21(6): 627-45.
26. Chou W.C., Takeo M., Rabbani P. et al. Direct migration of follicular melanocyte stem cells to the epidermis after wounding or UVB irradiation is dependent on Mc1r signaling. *Nat. Med.* 2013; 19: 924-9.
27. Li L., Fukunaga-Kalabis M., Herlyn M. Isolation and cultivation of dermal stem cells that differentiate into functional epidermal melanocytes. *Human Cell Culture Protocols*. Humana Press. 2012; 15-29.
28. Li L. et al. Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *J. Cell Sci.* 2010; 123(6): 853-60.
29. Videira I.F.S., Moura D.F.L., Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2013; 88(1): 76-83.
30. Rittié L., Fisher G.J. UV- light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing research reviews*. 2002; 1(4): 705-20.
31. Schallreuter K.U. et al. Regulation of melanogenesis—controversies and new concepts. *Experimental dermatology*. 2008; 17(5): 395-404.
32. Craig S., Earnshaw C.H., Virós A. Ultraviolet light and melanoma. *The Journal of pathology*. 2018; 244(5): 578-85.
33. Ni J. et al. The effect of the NMDA receptor-dependent signaling pathway on cell morphology and melanosome transfer in melanocytes. *Journal of dermatological science*. 2016; 84(3): 296-304.
34. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors*. 2009; 35: 193-9.
35. Yamaguchi Y., Hearing V. J. Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014; 4(5): a017046.
36. Hsu Y.C., Li L., Fuchs E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature medicine*. 2014; 20(8): 847.
37. D'Errico M. et al. Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2007; 614 (1-2): 37-47.
38. Haass NK, Herlyn M: Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2005; 10: 153-63.
39. *Ultraviolet radiation and children's health. WHO Newsletter*. 2009; December, 305.
40. Yusupova L.A. Modern view on the problem of aging skin. *Lechashchiy vrach*. 2017; 6: 75-5. (In Russian)
41. Orioli D., Dellambra E. Epigenetic Regulation of Skin Cells in Natural Aging and Premature Aging Diseases. *Cells*. 2018; 7(12): 268.
42. Chang A.L. S. Expanding our understanding of human skin aging. *Journal of Investigative Dermatology*. 2016; 136(5): 897-9.
43. Zhang Q. et al. Systems-level analysis of human aging genes shed new light on mechanisms of aging. *Human molecular genetics*. 2016; 25(14): 2934-47.
44. Ashapkin V.V. et al. Epigenetic mechanisms of peptidergic regulation of gene expression during aging of human cells. *Biochemistry (Moscow)*. 2015; 80(3): 310-22.
45. Van Putte L., De Schrijver S., Moortgat P. The effects of advanced glycation end products (ages) on dermal wound healing and scar formation: A systematic review. *Scars, burns & healing*. 2016; 2: 2059513116676828.
46. Kim H. et al. Autophagy in human skin fibroblasts: Impact of Age. *Int. journal of molecular sciences*. 2018; 19(8): 2254.

Сведения об авторах:

Джусоева Екатерина Витальевна, мл. науч. сотр. НИИОПП, аспирант;

Колокольцова Тамара Дмитриевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. НИИОПП, e-mail: kolokoltd@mail.ru;

Сабурина Ирина Николаевна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.12-005.4-089.811 + 577.152.341.51

Маслов Л.Н.¹, Нарыжная Н.В.¹, Цибульников С.Ю.¹, Воронков Н.С.¹, Бушов Ю.В.²

Ангиотензин II и его роль в регуляции толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии. Ингибиторы АПФ и антагонисты AT₁-рецептора ангиотензина II

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

² Томский государственный университет, 634050, г. Томск, пр. Ленина, д. 36

Цель обзора – анализ данных о роли ангиотензина II в регуляции толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии, а также анализ данных о кардиопротекторных свойствах ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) и антагонистов AT₁-рецептора ангиотензина II. Установлено, что ангиотензин II оказывает инфаркт-лимитирующий эффект, который, по одним данным, связан с активацией AT₁-рецептора, по другим – является следствием стимуляции AT₂-рецептора. Кроме того, ангиотензин способствовал улучшению сократимости сердца в реперфузионном периоде, эффект был связан с активацией AT₁-рецептора. Установлено, что ангиотензин II и AT₁-рецептор участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте ишемического preconditionирования. Экспериментальные данные о способности антагонистов AT₁-рецептора влиять на размер инфаркта носят противоречивый характер: есть сообщения о способности этих антагонистов оказывать инфаркт-лимитирующий эффект, есть данные об отсутствии у них подобного эффекта. Экспериментальные данные свидетельствуют, что ингибиторы АПФ оказывают инфаркт-лимитирующий эффект, который связан с увеличением уровня брадикинина и усилением продукции NO. Нет убедительных данных о том, ингибиторы АПФ и антагонисты AT₁-рецептора оказывают инфаркт-лимитирующий эффект у пациентов с острым инфарктом миокарда. Однако ингибиторы АПФ и антагонисты AT₁-рецептора препятствуют постинфарктному ремоделированию сердца.

Ключевые слова: сердце, ишемия, реперфузия, ангиотензина II, AT₁-рецептор.

Для цитирования: Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Воронков Н.С., Бушов Ю.В. Ангиотензин II и его роль в регуляции толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии. Ингибиторы АПФ и антагонисты AT₁-рецептора ангиотензина II. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 118-126.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.118-126

Для корреспонденции: Маслов Леонид Николаевич, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант 19-15-00037.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.11.2018

Maslov L.N.¹, Naryzhnaya N.V.¹, Tsibulnikov S.Yu.¹, Voronkov N.S.¹, Bushov Yu.V.²

Angiotensin ii and its role in regulation of heart tolerance to ischemia/reperfusion impact. ace inhibitors and angiotensin ii at₁-receptor antagonists

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Kievskaya Str. 111A, Tomsk 634012, Russia;

² Tomsk State University, Prospekt Lenina 36, Tomsk 634050, Russia

The review analyzes reports on the role of angiotensin II in regulation of heart tolerance to ischemia/reperfusion and cardioprotective properties of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and angiotensin II AT₁-receptor antagonists. Angiotensin II is known to have an infarct-limiting effect, which according to some reports is associated with activation of the AT₁ receptor and according to other reports results from stimulation of the AT₂ receptor. In addition, angiotensin improves heart contractility during reperfusion, which is associated with activation of the AT₁ receptor. Angiotensin II and AT₁ receptor are also involved in the infarct-reducing effect of ischemic preconditioning. Experimental data on the ability of AT₁ receptor antagonists to influence the infarct size are inconsistent; one study showed that these antagonists can exert an infarct-limiting effect whereas there is some

evidence against such effect. Experimental studies have suggested that ACE inhibitors can restrict the infarct size, which is associated with increased bradykinin level and NO production. There is no convincing evidence that ACE inhibitors and AT₁ receptor antagonists can restrict the infarct size in patients with acute myocardial infarction. However, ACE inhibitors and AT₁ receptor antagonists prevent post-infarction heart remodeling.

Keywords: heart, ischemia, reperfusion, angiotensin II, AT₁ receptor.

For citation: Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Tsibulnikov S.Yu., Voronkov N.S., Bushov Yu.V. Angiotensin II and its role in the regulation of heart tolerance to ischemia/reperfusion impact. ACE inhibitors and angiotensin II AT₁ receptor antagonists. *Pathological Physiology and Experimental Therapy. Russian Journal.* 2019; 63(3): 118-126.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.118-126

For correspondence: Leonid N. Maslov, Professor, Head of Laboratory Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

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

Acknowledgement: The work was supported by the Russian Science Foundation. Grant 19-15-00037.

Information about authors:

Maslov L.N., <http://orcid.org/0000-0002-6020-1598>

Naryzhnaya N.V., <http://orcid.org/0000-0003-2264-1928>

Tsibulnikov S.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-1534-2516>

Voronkov N.S., <http://orcid.org/0000-0001-5261-8062>

Bushov Yu.V., <https://orcid.org/0000-0002-4627-6593>

Received 30.11.2018

Введение

Ангиотензин II является октапептидом, который образуется из декапептида ангиотензина I под действием ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) [1]. Ангиотензин I образуется из ангиотензиногена – белка из класса глобулинов, который состоит из 453 аминокислотных остатков. Ренин катализирует эту реакцию [1]. Ангиотензин II является сильным вазоконстриктором прямого действия. Он сужает как артерии, так и вены, что приводит к повышению артериального давления. Гипертензивный эффект ангиотензина II связан с активацией AT₁-рецептора [1]. Продукты энзиматической деградации ангиотензина II – ангиотензин III и ангиотензин IV обладают менее выраженной активностью по сравнению с исходным пептидом [1].

В настоящее время идентифицировано 2 рецептора ангиотензина II: Angiotensin II Type 1 (AT₁) рецептор и Angiotensin II Type 2 (AT₂) рецептор [1, 2]. Эти рецепторы экспрессируются в сердце, сосудах, почках, головном мозге и репродуктивных органах [1]. Рецепторы ангиотензина II имеют 7 трансмембранных доменов и относятся к G-белоксопряженным рецепторам. Рецептор AT₁ состоит из 359 аминокислотных остатков, он сопряжен со следующими G-белками: G_{q/11}, G_i, G₁₂, G₁₃ [1, 2]. Соответственно, стимуляция AT₁-рецептора приводит к активации фосфолипазы А, фосфолипазы С, фосфолипазы D, протеинкиназы С (ПКС) [1, 2]. Кроме того, для AT₁-рецептора характерен β-аррестин-опосредованный сигнальный путь, который не зависит от G-белков и приводит к активации

киназы ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) [1, 2]. Стимуляция AT₁-рецептора приводит к активации связанной с мембраной клетки НАДФН-оксидазы и, соответственно, к синтезу супероксидного радикала и H₂O₂ [1, 2], которые функционируют как внутриклеточные мессенджеры [3]. Установлено, что стимуляция AT₁-рецептора сопровождается активацией JAK2 (Janus kinase) и PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). Следует отметить, что указанные киназы (ПКС, ERK1/2, JAK2) обеспечивают толерантность сердца к действию ишемии/реперфузии [4, 5]. Для AT₁-рецептора характерна гомодимеризация и гетеродимеризация с B₂-рецептором брадикинина, с α_{2c}-β₁-β₂-адренорецепторами и дофаминовым D1-, D3-, D4-, D5-рецепторами, которая ведет к изменению свойств AT₁-рецептора [1, 6]. Для AT₁-рецептора характерна трансактивация рецептора EGFR (epidermal growth factor receptor) [2, 7, 8]. Трансактивация EGFR требует образования активных форм кислорода [1] и сопровождается гипертензией и гипертрофией миокарда [9].

Рецептор AT₂ состоит из 363 аминокислотных остатков и на 34% идентичен AT₁-рецептору [1]. Многие эффекты, связанные с активацией AT₂-рецептора прямо противоположны эффектам активации AT₁-рецептора, например, стимуляция AT₂-рецептора приводит к снижению артериального давления [10]. Нокаут гена, кодирующего AT₂-рецептор, ведёт к гипертензии и усилению эффектов ангиотензина II, которые наблюдаются у обычных животных [11]. AT₂-рецептор сопряжен с G_{i/o}-белками, стимуляция которых вызывает активацию фосфолипазы С и ПКС [1]. Следует

сказать, что с указанными белками сопряжены аденозиновые, каннабиноидные, опиоидные рецепторы, активация этих рецепторов способствует повышению толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии [12-15]. Установлено, что активация AT_2 -рецептора приводит к активации киназ PI3, JAK, ERK1/2, Akt [1, 16], которые обеспечивают устойчивость сердца к действию ишемии/реперфузии [4, 5]. Кроме того, после активации AT_2 -рецептора усиливается продукция NO, который также обеспечивает толерантность сердца к ишемии/реперфузии [4, 5].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что активация как AT_1 -рецептора, так и AT_2 -рецептора может способствовать повышению устойчивости сердца к действию ишемии/реперфузии.

Влияние ангиотензина II на устойчивость сердца к ишемии/реперфузии. Изолированное сердце кролика подвергали региональной ишемии (30 мин) и реперфузии (2 ч) [17]. Сердце перфузировали в течение 5 мин перед ишемией раствором, содержащим ангиотензин II (100 нМ). Пептид способствовал уменьшению соотношения зона инфаркта/область риска (ЗИ/ОР) на 77%, где область риска – зона ишемии/реперфузии. Блокатор AT_1 -рецептора лозартан (10 мкМ) устранял инфаркт-лимитирующий эффект ангиотензина II. Блокатор AT_2 -рецептора PD 123319 (10 мкМ) не влиял на кардиопротекторный эффект ангиотензина II [17]. Следовательно, ангиотензин II повышает толерантность сердца к действию ишемии/реперфузии за счёт активации AT_1 рецептора. В другом исследовании изолированное перфузируемое сердце крысы подвергали глобальной ишемии (30 мин) и реперфузии (90 мин) [18]. Перед ишемией сердце перфузировали раствором, содержащим ангиотензин II. Установлено, что ангиотензин II во время реперфузии способствовал восстановлению давления, развиваемого левым желудочком (ДРЛЖ), скорости сокращения и расслабления левого желудочка, а также способствовал увеличению двойного произведения (ДРЛЖ x ЧСС) [18]. Кроме того, ангиотензин II способствовал уменьшению соотношения ЗИ/ОР приблизительно на 60% [19]. Лозартан, антагонист AT_1 -рецептора, устранял инотропный эффект ангиотензина II. Ингибитор протеинкиназы С хелеритрин устранял инфаркт-лимитирующий эффект ангиотензина II, но не влиял на инотропный эффект пептида [19]. Следовательно, инфаркт-лимитирующий эффект ангиотензина II зависит от активации ПКС, а инотропный эффект пептида реализуется при участии другого сигнального пути.

Изолированное перфузируемое сердце крысы подвергали глобальной ишемии (30 мин) и реперфузии (90 мин) [20]. Перед ишемией сердце перфузировали рас-

твором, содержащим ангиотензин II (10 нМ). Установлено, что ангиотензин-индуцированное увеличение двойного произведения во время реперфузии зависит от активации AT_1 -рецептора. Блокада AT_2 -рецептора приводила к усилению инотропного эффекта ангиотензина II. Лозартан (10 мкМ), антагонист AT_1 -рецептора, и PD 123,319 (1 мкМ), антагонист AT_2 -рецептора, сами не влияли на соотношение ЗИ/ОР. Ангиотензин II способствовал уменьшению соотношения ЗИ/ОР приблизительно на 60%. После совместного применения лозартана и ангиотензина II наблюдалась тенденция к дальнейшему уменьшению соотношения ЗИ/ОР. PD 123,319 устранял инфаркт-лимитирующий эффект ангиотензина II [20]. Следовательно, улучшение восстановления сократимости сердца во время реперфузии под действием ангиотензина II связано с активацией AT_1 -рецептора, а уменьшение размера инфаркта зависит от стимуляции AT_2 -рецептора. Эти данные противоречат выше приведенным результатам исследования Y. Liu и соавт. [17], в котором было показано, что инфаркт-лимитирующий эффект ангиотензина II является следствием стимуляции AT_1 -рецептора. Причина противоречия остаётся неясной.

Установлено, что ангиотензин II участвует в адаптивном феномене ишемического preconditionирования [21, 22]. Ишемическим preconditionированием (ИП) сердца принято называть повышение толерантности сердца к длительной ишемии после нескольких сеансов кратковременной ишемии/реперфузии [23]. Изолированное перфузируемое сердце кролика подвергали региональной ишемии (40 мин) и реперфузии (60 мин) [21]. ИП индуцировали с помощью трёх циклов ишемии (5 мин) и реперфузии (10 мин). Preconditionирование способствовало уменьшению размера инфаркта на 80%. Антагонист рецепторов ангиотензина II саралазин устранял инфаркт-лимитирующий эффект ИП. Также действовал антагонист AT_1 -рецептора лозартан, в то время как PD-123,319, антагонист AT_2 -рецептора, не влиял на кардиопротекторный эффект ИП [21]. Следовательно, ангиотензин II и AT_1 -рецептор участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте ИП. Лозартан и саралазин не влияли на размер инфаркта, если исследование проводилось на preconditionированных сердцах. Антагонист AT_1 -рецептора CV-11,974 (кандесартан) не влиял на размер инфаркта, но устранял инфаркт-лимитирующий эффект ИП у кроликов [22]. ИП не влияло на уровень ангиотензина II в плазме крови, поэтому авторы заключили, что ИП стимулирует локальное образование в миокарде [22].

Таким образом, установлено, что ангиотензин II оказывает инфаркт-лимитирующий эффект, который, по одним данным, связан с активацией AT_1 -рецептора

[17], а по другим – является следствием стимуляции AT_2 -рецептора [20]. Кроме того, ангиотензин способствовал улучшению сократимости сердца в реперфузионном периоде, эффект был связан с активацией AT_1 -рецептора. Следует отметить, что ангиотензин II оказывает инфаркт-лимитирующий эффект в исследованиях *in vitro*. Вместе с тем, установлено, что внутривенная инфузия (15 мин) ангиотензина II (2.5 нг/кг) не влияет на соотношение ЗИ/ОР у кроликов с коронароокклюзией (30 мин) и реперфузией (2 ч) [24]. Представленные данные позволяют утверждать, что ангиотензин II и AT_1 -рецептора участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте ишемического preconditionирования. Причина противоречия данных исследований *in vitro* и результатов исследований *in vivo* остаётся неясной.

Экспериментальные данные о влиянии антагонистов AT_1 -рецептора на устойчивость сердца к действию ишемии/реперфузии. Представленные данные свидетельствуют [17–22], что антагонисты AT_1 - и AT_2 -рецепторов не влияют на устойчивость сердца к действию ишемии/реперфузии. Однако есть данные свидетельствующие о том, что антагонисты AT_1 -рецептора могут оказывать кардиопротекторный эффект при экспериментальной коронароокклюзии и реперфузии [25–32]. У собак воспроизводили коронароокклюзию (90 мин) и реперфузию (270 мин). Было продемонстрировано, что внутривенное или интракоронарное введение антагониста AT_1 -рецепторов кандесартана (CV-11974) способствует уменьшению соотношения ЗИ/ОР [25]. У крыс воспроизводили коронароокклюзию (60 мин) и реперфузию (90 мин) [26]. Валсартан (10 мг/кг) и ирбесартан (10 мг/кг) вводили внутривенно за 30 мин до реперфузии. Оба антагониста AT_1 -рецепторов способствовали уменьшению размера инфаркта, увеличивали фракцию выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ), улучшали диастолическую функцию сердца [26]. В исследовании, выполненном на собаках с коронароокклюзией (90 мин) и реперфузией (120 мин), валсартан (10 мг/кг) и ирбесартан (10 мг/кг) вводили внутривенно за 30 мин до реперфузии [27]. Оба антагониста AT_1 -рецептора способствовали уменьшению соотношения ЗИ/ОР почти на 50%, увеличивали ФВ ЛЖ, улучшали диастолическую функцию сердца. В исследовании, выполненном на мышах, воспроизводили коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (3 ч) [28]. Было продемонстрировано, что внутривенное введение лозартана (8 мг/кг) за 5 мин до реперфузии уменьшает размер инфаркта приблизительно на 40%. В исследовании, выполненном на мини-свиньях, воспроизводили коронароокклюзию (3 ч) и реперфузию (2 ч). Валсартан (2 мг/кг/сут) вводили в течение 3 сут до коронароокклюзии.

Валсартан способствовал уменьшению области невосстановленного кровотока на 69% по сравнению с контролем [29]. Следовательно, курсовое введение валсартана в дозе 2 мг/кг/сут способствует повышению толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии у мини-свиней. Такой же эффект оказывает лозартан (10 мг/кг) при введении в течение 4 нед [30]. У собак воспроизводили коронароокклюзию (90 мин) и реперфузию (2 ч) [31]. Блокатор AT_1 -рецептора кандесартан (1 мг/кг) вводили в начале реперфузии. Кандесартан уменьшал соотношение ЗИ/ОР и уменьшал количество апоптотических клеток в зоне риска. Кардиопротекторный эффект был наиболее выражен у молодых животных. Мышам Db/Db с сахарным диабетом 2 типа в течение 15 сут вводили валсартан (8 мг/кг/сут или 16 мг/кг/сут), затем воспроизводили коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (24 ч) [33]. Валсартан в дозе 16 мг/кг/сут ограничивал размер инфаркта на 56%, а в дозе 8 мг/кг/сут не влиял на размер инфаркта. Следовательно, курсовое введение валсартан в дозе 16 мг/кг/сут способствует повышению толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии у мышей Db/Db. В исследовании, выполненном на мышах, было показано, что наночастицы, содержащие ирбесартан (3 мг/кг) оказывают инфаркт-лимитирующий эффект, а ирбесартан (3 мг/кг) не влияет на размер инфаркта [23]. Авторы связывают инфаркт-лимитирующий эффект наночастиц с ограничением моноцит-опосредованного воспаления. По их данным, наночастицы связываются с циркулирующими нейтрофилами и моноцитами, к которым они имеют повышенное сродство. Это, по их мнению, объясняет тот факт, что наночастицы ограничивают размер инфаркта, а ирбесартан не ограничивает размер инфаркта.

Впрочем, не все исследователи смогли подтвердить кардиопротекторный эффект антагонистов AT_1 -рецептора. Установлено, что лозартан (10 мг/кг) не влияет на соотношение ЗИ/ОР у кроликов с коронароокклюзией (30 мин) и реперфузией (2 ч) [34]. В исследовании, выполненном на собаках, было показано, что ирбесартан (10 мг/кг), антагонист AT_1 -рецептора, не влияет на соотношение ЗИ/ОР, но увеличивает на 60% коллатеральный кровоток в зоне ишемии [35]. В исследовании, выполненном на крысах, для оценки антиаритмического эффекта лозартана (2 мг/кг) выполняли коронароокклюзию продолжительностью 7 мин и реперфузию – 7 мин [36]. Для оценки инфаркт-лимитирующего эффекта препаратов выполняли коронароокклюзию продолжительностью 30 мин и реперфузию – 120 мин. Лозартан снижал частоту возникновения желудочковых экстрасистол и желудочковой тахикардии, но не влиял на размер инфаркта [36].

Впрочем, некоторым исследователям не удалось обнаружить антиаритмический эффект лозартана [37]. У свиней воспроизводили коронароокклюзию (50 мин) и последующую реперфузию [38]. Валсартан (40 мг) и фимасартан (30 мг) вводили ежедневно в течение 1 нед и 4 нед после реперфузии. Размер инфаркта оценивали с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОЭКТ) с ^{99m}Tc -sestamibi. Авторы не смогли обнаружить инфаркт-лимитирующий эффект валсартана и фимасартана.

Таким образом, в 9 исследованиях был показан инфаркт-лимитирующий эффект антагонистов AT_1 -рецептора. В 3 из этих исследований валсартан вводили в течение 3 или 15 сут перед коронароокклюзией, а лозартан – в течение 4 нед [29, 30, 33]. Следовательно, в этом случае повышение толерантности сердца к ишемии/реперфузии может быть следствием изменения экспрессии генов. В некоторых из этих исследований использовались высокие дозы валсартана (10 мг/кг) и ирбесартана (10 мг/кг) [26, 27], поэтому нельзя исключить наличие неспецифического эффекта, не связанного с ингибированием AT_1 -рецептора. В ряде работ не удалось обнаружить инфаркт-лимитирующий эффект антагонистов AT_1 -рецептора [34–36, 38].

Экспериментальные данные о влиянии ингибиторов АПФ на устойчивость сердца к действию ишемии/реперфузии. Каптоприл (0,5 мг/кг) и рамиприл (0,05 мг/кг) вводили кроликам с коронароокклюзией (30 мин) и реперфузией (72 ч). Оба препарата не влияли на соотношение ЗИ/ОР [39]. У крыс воспроизводили коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (120 мин). Было продемонстрировано, что каптоприл (3 мг/кг) уменьшает соотношение ЗИ/ОР приблизительно на 45%, а также оказывает антиаритмический эффект [37]. Следует обратить внимание, что в этом исследовании каптоприл был использован в дозе 3 мг/кг, а в предыдущим исследовании его применяли в дозе 0,5 мг/кг. Изолированное перфузируемое сердце крыс подвергали коронароокклюзии (35 мин) и реперфузии (120 мин) [40]. Исследовали кардиопротекторный эффект ингибиторов АПФ каптоприла (200 мкМ/л) и омапатрилата (10 мкМ/л). Омапатрилат способствовал уменьшению соотношения ЗИ/ОР на 35% по сравнению с контролем. Каптоприл не влиял на размер инфаркта. Селективный антагонист B_2 -рецепторов брадикинина Ноел 140 устранял инфаркт-лимитирующий эффект каптоприла. Этот результат демонстрирует участие брадикинина в инфаркт-лимитирующем эффекте омапатрилата. В исследовании, выполненном на свиньях, воспроизводили коронароокклюзию (60 мин) и реперфузию (2 ч). Эналаприл вводили внутривенно (0,03 мг/кг) перед ишемией [41]. Указанный ингибитор АПФ способствовал уменьшению соотношения ЗИ/ОР на 44%

по сравнению с контролем. В другом исследовании, крыс подвергали коронароокклюзии (8 ч) и реперфузии. Эналаприл (0,1 мг/кг) вводили внутривенно через 1 ч после коронароокклюзии, а затем в течение 13 сут давали в питьевой воде. Авторам не удалось обнаружить инфаркт-лимитирующий эффект эналаприла [42]. Следовательно, эналаприл не оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при длительной 8-часовой ишемии. В исследовании, выполненном на свиньях с коронароокклюзией (90 мин) и реперфузией (180 мин), было показано, что эналаприл (0,05 мг/кг) способствует уменьшению соотношения ЗИ/ОР на 40% [43]. Исследование было выполнено на кроликах с коронароокклюзией (30 мин) и реперфузией (2 ч). Продемонстрировано, что рамиприл (0,05 мг/кг) способствует уменьшению соотношения ЗИ/ОР на 51% [24]. Селективный антагонист брадикининовых B_2 -рецепторов Ноел 140 устранял инфаркт-лимитирующий эффект рамиприла [34]. Ингибирование NO -синтазы способствовало устранению инфаркт-лимитирующего эффекта рамиприла [44]. Продемонстрировано, что Ноел 140 устраняет кардиопротекторный эффект ингибиторов АПФ рамиприла, EP24.11 и EP24.15 [45]. АПФ не является единственным ферментом, обеспечивающим энзиматическую деградацию брадикинина, такой же эффект оказывает аминопептидаза P [46]. У крыс воспроизводили коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (3 ч). Оказалось, что рамиприл и апстатин, ингибитор аминопептидазы P, способствуют уменьшению соотношения ЗИ/ОР на 55%. Антагонист B_2 -рецепторов Ноел 140 устранял инфаркт-лимитирующий эффект апстатина, что говорит об участии брадикинина в формировании проекторного эффекта апстатина. Предварительное введение зофеноприла (10 мг/кг per os) за 8 ч до коронароокклюзии (45 мин) и реперфузии (24 ч) способствовало уменьшению размера инфаркта у мышей [47]. Авторы связывают инфаркт-лимитирующий эффект зофеноприла с увеличением уровня H_2S и NO в плазме крови и в миокарде. Увеличение продукции H_2S и NO , по мнению авторов, является следствием зофеноприл-индуцированного увеличения уровня эндогенного брадикинина [47].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что ингибиторы АПФ оказывают инфаркт-лимитирующий эффект, который связан с увеличением уровня брадикинина и усилением продукции NO . В тех случаях, когда ингибиторы АПФ не оказывали эффекта на размер инфаркта, доза препарата оказалась недостаточной [39] или продолжительность ишемии составляла 8 ч [42].

Клинические данные об эффективности антагонистов AT_1 -рецепторов при ишемии/реперфузии сердца. Клинические данные об инфаркт-лимитирующем эффекте антагонистов AT_1 -рецептора у пациентов с

острым инфарктом миокарда (ОИМ) отсутствуют. Сообщают о способности ирбесартана предупреждать фибрилляцию предсердий у пациентов с коронарным шунтированием (КШ) [48]. В исследовании, выполненном на пациентах с КШ, показано, что кандесартан не влияет на частоту возникновения неблагоприятных последствий [49].

Таким образом, нет данных о том, что антагонисты AT_1 -рецептора изменяют толерантность сердца к действию ишемии/реперфузии. Однако есть данные о том, что антагонисты AT_1 -рецептора предупреждают постинфарктное ремоделирование сердца [50-52].

Клинические данные об эффективности ингибиторов АПФ при ишемии/реперфузии сердца. В плацебо-контролируемом исследовании было показано, что зофеноприл не оказывает статистически значимого эффекта на смертность пациентов с ОИМ по сравнению с плацебо [53]. Зофеноприл способствовал снижению частоты возникновения сердечной недостаточности и желудочковых аритмий у пациентов с ОИМ. Зофеноприл способствовал увеличению ФВ ЛЖ у пациентов с ОИМ. Авторы не оценивали эффект зофеноприла на размер инфаркта. Установлено, что инфузия каптоприла способствует снижению частоты возникновения желудочковых аритмий у пациентов с ОИМ [54]. Размер инфаркта оценивали с помощью серийного определения КФК. Каптоприл способствовал снижению уровня КФК-МВ, но эффект был статистически не значимым. По другим данным каптоприл не оказывал антиаритмического эффекта у пациентов с ОИМ [55]. В плацебо-контролируемом исследовании были включены пациенты, получавшие после ОИМ каптоприл [56]. Эхокардиографическое исследование показало, что через 1 год после ОИМ конечный диастолический объём ЛЖ был меньше у пациентов, получавших каптоприл. Каптоприл способствовал снижению частоты неблагоприятных последствий (кардиоваскулярная смерть, сердечная недостаточность, потребовавшая госпитализации, повторный инфаркт миокарда) после ОИМ. В плацебо-контролируемом исследовании было показано, что у пациентов с ОИМ и тромбозом каптоприл способствовал снижению пика маркера некроза α -гидроксибутират дегидрогеназы (α -hydroxybutyrate dehydrogenase), но не влиял на пик креатинфосфокиназы (КФК), что ставит под сомнение способность каптоприла ограничивать размер инфаркта [57]. Каптоприл способствовал снижению частоты возникновения желудочковых аритмий. В плацебо-контролируемом исследовании были включены пациенты с передним инфарктом миокарда и тромбозом ($n = 298$) [58]. Каптоприл назначали в первые 6 ч после появления симптомов инфаркта миокарда.

Выяснилось, что каптоприл предупреждает появление дилатации ЛЖ, которую верифицировали через 12 мес после перенесённого инфаркта миокарда, то есть каптоприл препятствовал постинфарктному ремоделированию сердца. В плацебо-контролируемом исследовании было включено 512 пациентов с ОИМ, через 2 года у 54,5% из них развивалась дилатация ЛЖ или наступала кардиоваскулярная смерть [59]. Статистически значимым предиктором дилатации ЛЖ был размер инфаркта. Каптоприл статистически значимо уменьшал диастолическую дилатацию ЛЖ через 2 года по сравнению с плацебо. Следовательно, каптоприл препятствует постинфарктному ремоделированию сердца. В плацебо-контролируемом исследовании были включены пациенты, получавшие эналаприл в течение 6 мес после инфаркта [60]. Эналаприл способствовал уменьшению систолического и диастолического объёма сердца и увеличивал ФВ ЛЖ по сравнению с плацебо. Все пациенты, включая группу плацебо, получали β -блокаторы. Эти данные подтверждают способность ингибиторов АПФ препятствовать постинфарктному ремоделированию сердца [50-52]. Установлено, что интракоронарное введение эналаприла пациентам с ОИМ и чрескожным коронарным вмешательством препятствует появлению желудочковых аритмий [61]. В плацебо-контролируемом исследовании было продемонстрировано, что периндоприл (8 мг/сут, 12 мес) предупреждал постинфарктное ремоделирование сердца [62, 63]. Ежедневный приём периндоприла (8 мг) снижал риск неблагоприятных исходов (кардиоваскулярная смерть, инфаркт миокарда, остановка сердца) у пациентов, которым выполнялось коронарное шунтирование [64].

В плацебо-контролируемом исследовании были включены кардиохирургические пациенты с кардиоплегической остановкой сердца, которая, по сути, является тотальной ишемией сердца [65]. О размере некроза кардиомиоцитов судили по уровню в плазме крови КФК-МВ, тропонина Т, гликогенфосфоорилазы ВВ. У пациентов, получавших эналаприл (0,6 мкг/кг/мин), пик КФК-МВ, тропонина Т и гликогенфосфоорилазы ВВ был ниже, чем в группе плацебо. Следовательно, эналаприл предупреждает некроз кардиомиоцитов у кардиохирургических пациентов. Однако участникам другого исследования, выполненного на кардиохирургических пациентах с кардиоплегической остановкой сердца, не удалось обнаружить кардиопротекторный эффект эналаприла [66].

Представленные данные свидетельствуют, что ингибиторы АПФ оказывают антиаритмический эффект у пациентов с ОИМ, предупреждают развитие постинфарктного ремоделирования сердца. Однако нет убе-

дательных данных о том, ингибиторы АПФ оказывают инфаркт-лимитирующий эффект у пациентов с ОИМ. Данные об эффективности ингибиторов АПФ у кардиохирургических пациентов противоречивы: сообщают и о кардиопротекторном эффекте [65], и об его отсутствии [66].

Литература/References

- Karnik S.S., Unal H., Kemp J.R., Tirupula K.C., et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin receptors: interpreters of pathophysiological angiotensinergic stimuli [corrected]. *Pharmacol Rev.* 2015; 67(4): 754-819.
- Kawai T., Forrester S.J., O'Brien S., Baggett A., et al. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol Res.* 2017; 125(Pt A): 4-13.
- Krylatov A.V., Maslov L.N., Voronkov N.S., Boshchenko A.A., et al. Reactive oxygen species as intracellular signaling molecules in the cardiovascular system. *Curr Cardiol Rev.* 2018; 14(4): 290-300.
- Cohen M.V., Downey J.M. Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: historical perspective and lessons for the future. *Br J Pharmacol.* 2015; 172(8): 1913-32.
- Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res.* 2015; 116(4): 674-99.
- Takezako T., Unal H., Karnik S.S., Node K. Current topics in angiotensin II type 1 receptor research: Focus on inverse agonism, receptor dimerization and biased agonism. *Pharmacol Res.* 2017; 123: 40-50.
- Kim S., Zhan Y., Izumi Y., Yasumoto H., et al. In vivo activation of rat aortic platelet-derived growth factor and epidermal growth factor receptors by angiotensin II and hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(12): 2539-45.
- Zhang G.Y., Li X., Yi C.G., Pan H., et al. Angiotensin II activates connective tissue growth factor and induces extracellular matrix changes involving Smad/activation and p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathways in human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol.* 2009; 18(11): 947-53.
- Ahmad S., Cesana F., Lamperti E., Gavras H., Yu J. Attenuation of angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing a type 1 receptor mutant. *Am J Hypertens.* 2009; 22(12): 1320-5.
- Carey R.M., Howell N.L., Jin X.H., Siragy H.M. Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor-blocked rats. *Hypertension.* 2001; 38(6): 1272-7.
- Ichiki T., Labosky P.A., Shiota C., Okuyama S., et al. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature.* 1995; 377(6551): 748-50.
- Headrick J.P., Ashton K.J., Rose'meyer R.B., Peart J.N. Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacol Ther.* 2013; 140(1): 92-111.
- Headrick J.P., See Hoe L.E., Du Toit E.F., Peart J.N. Opioid receptors and cardioprotection - 'opioidergic conditioning' of the heart. *Br J Pharmacol.* 2015; 172(8): 2026-50.
- Maslov L.N., Khaliulin I., Oeltgen P.R., Naryzhnaya N.V., et al. Prospects of creation of cardioprotective and antiarrhythmic drugs based on opioid receptor agonists. *Med Res Rev.* 2016a; 36(5): 871-923.
- Maslov L.N., Khaliulin I., Zhang Y., Krylatov A.V., et al. Prospects for creation of cardioprotective drugs based on cannabinoid receptor agonists. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2016b; 21(3): 262-72.
- Kaschina E., Namsolleck P., Unger T. AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Res.* 2017; 125(Pt A): 39-47.
- Liu Y., Tsuchida A., Cohen M.V., Downey J.M. Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27(3): 883-92.
- Nunez R.E., Castro M., Javadov S., Escobales N. Angiotensin II and ischemic preconditioning synergize to improve mitochondrial function while showing additive effects on ventricular postischemic recovery. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014; 64(2): 172-9.
- Nunez R.E., Javadov S., Escobales N. Angiotensin II-preconditioning is associated with increased PKC ϵ /PKC δ ratio and prosurvival kinases in mitochondria. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017; 44(12): 1201-12.
- Nunez R.E., Javadov S., Escobales N. Critical role of angiotensin II type 2 receptors in the control of mitochondrial and cardiac function in angiotensin II-preconditioned rat hearts. *Pflugers Arch.* 2018; 470(9): 1391-403.
- Diaz R.J., Wilson G.J. Selective blockade of AT1 angiotensin II receptors abolishes ischemic preconditioning in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29(1): 129-39.
- Nakano A., Miura T., Ura N., Suzuki K., Shimamoto K. Role of the angiotensin II type 1 receptor in preconditioning against infarction. *Coron Artery Dis.* 1997; 8(6): 343-50.
- Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003; 83(4): 1113-51.
- Hartman J.C., Hullinger T.G., Wall T.M., Shebuski R.J. Reduction of myocardial infarct size by ramiprilat is independent of angiotensin II synthesis inhibition. *Eur J Pharmacol.* 1993a; 234(2-3): 229-36.
- So T., Nakashima Y., Imamura M., Arakawa K. Effects of local inhibition of the cardiac renin-angiotensin system with CV-11974 in a canine ischaemia-reperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998; 25(7-8): 503-9.
- Jugdutt B.I., Menon V. Upregulation of angiotensin II type 2 receptor and limitation of myocardial stunning by angiotensin II type 1 receptor blockers during reperfused myocardial infarction in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2003; 8(3): 217-26.
- Jugdutt B.I., Menon V. AT1 receptor blockade limits myocardial injury and upregulates AT2 receptors during reperfused myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2004; 260(1-2): 111-8.
- Messadi-Laribi E., Griol-Charhbil V., Pizard A., Vincent M.P., et al. Tissue kallikrein is involved in the cardioprotective effect of AT1-receptor blockade in acute myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 323(1): 210-6.
- Zhao J.L., Yang Y.J., You S.J., Jing Z.C., et al. Pretreatment with fosinopril or valsartan reduces myocardial no-reflow after acute myocardial infarction and reperfusion. *Coron Artery Dis.* 2006; 17(5): 463-9.
- Safari F., Hajizadeh S., Shekarforoush S., Bayat G., et al. Influence of ramiprilat and losartan on ischemia reperfusion injury in rat hearts. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2012; 13(1): 29-35.
- Jugdutt B.I., Jelani A., Palaniyappan A., Idikio H., et al. Aging-related early changes in markers of ventricular and matrix remodeling after reperfused ST-segment elevation myocardial infarction in the canine model: effect of early therapy with an angiotensin II type 1 receptor blocker. *Circulation.* 2010; 122(4): 341-51.18.

32. Nakano Y., Matoba T., Tokutome M., Funamoto D., et al. Nanoparticle-mediated delivery of irbesartan induces cardioprotection from myocardial ischemia-reperfusion injury by antagonizing monocyte-mediated inflammation. *Sci Rep.* 2016; 6: 29601.
33. Ye Y., Qian J., Castillo A.C., Perez-Polo J.R., Birnbaum Y. Aliskiren and valsartan reduce myocardial AT1 receptor expression and limit myocardial infarct size in diabetic mice. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011; 25(6): 505-15.
34. Hartman J.C., Wall T.M., Hullinger T.G., Shebuski R.J. Reduction of myocardial infarct size in rabbits by ramiprilat: reversal by the bradykinin antagonist HOE 140. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993b; 21(6): 996-1003.
35. Preckel B., Schlack W., González M., Obal D., et al. Influence of the angiotensin II AT₁ receptor antagonist irbesartan on ischemia/reperfusion injury in the dog heart. *Basic Res Cardiol.* 2000; 95(5): 404-12.
36. Ozer M.K., Sahna E., Birincioglu M., Acet A. Effects of captopril and losartan on myocardial ischemia-reperfusion induced arrhythmias and necrosis in rats. *Pharmacol Res.* 2002; 45(4): 257-63.
37. Lynch J.J., Stump G.L., Wallace A.A., Painter C.A., et al. EXP3174, the AT₁ antagonist human metabolite of losartan, but not losartan nor the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril, prevents the development of lethal ischemic ventricular arrhythmias in a canine model of recent myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34(3): 876-84.
38. Sim D.S., Jeong M.H., Song H.C., Kim J., et al. Cardioprotective effect of fimasartan, a new angiotensin receptor blocker, in a porcine model of acute myocardial infarction. *J Korean Med Sci.* 2015; 30(1): 34-43.
39. Miki T., Miura T., Shimamoto K., Urabe K., et al. Do angiotensin converting enzyme inhibitors limit myocardial infarct size? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1993; 20(6): 429-34.
40. Ebrahim Z., Baxter G.F., Yellon D.M. Omapatrilat limits infarct size and lowers the threshold for induction of myocardial preconditioning through a bradykinin receptor-mediated mechanism. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2004; 18(2): 127-34.
41. Schwarz E.R., Montino H., Fleischhauer J., Klues H.G., et al. Angiotensin II receptor antagonist EXP 3174 reduces infarct size comparable with enalaprilat and augments preconditioning in the pig heart. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997; 11(5): 687-95.
42. Alhaddad I.A., Sahgal P., Mir R., Brown E.J. Early angiotensin converting enzyme inhibitor therapy enhances the benefits of late coronary artery reperfusion on infarct expansion. *Coron Artery Dis.* 2000; 11(2): 183-9.
43. Lazar H.L., Bao Y., Rivers S., Colton T., Bernard S.A. High tissue affinity angiotensin-converting enzyme inhibitors improve endothelial function and reduce infarct size. *Ann Thorac Surg.* 2001; 72(2): 548-53.
44. Hartman J.C., Kurc G.M., Hullinger T.G., Wall T.M., et al. Inhibition of nitric oxide synthase prevents myocardial protection by ramiprilat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 270(3): 1071-6.
45. Schrieffer J.A., Broudy E.P., Hassen A.H. Inhibitors of bradykinin-inactivating enzymes decrease myocardial ischemia/reperfusion injury following 3 and 7 days of reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298(3): 970-5.
46. Wolfrum S., Richardt G., Dominiak P., Katus H.A., Dendorfer A. Apstatin, a selective inhibitor of aminopeptidase P, reduces myocardial infarct size by a kinin-dependent pathway. *Br J Pharmacol.* 2001; 134(2): 370-4.
47. Donnarumma E., Ali M.J., Rushing A.M., Scarborough A.L., et al. Zofenopril protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by increasing nitric oxide and hydrogen sulfide bioavailability. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5(7). pii: e003531.
48. El-Haddad M.A., Zalawadiya S.K., Awdallah H., Sabet S., et al. Role of irbesartan in prevention of post-coronary artery bypass graft atrial fibrillation. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2011; 11(4): 277-84.
49. Flesch M., Knipp S., Kessler G., Geissler H.J., et al. ARTA: AT1-receptor blocker therapy in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Clin Res Cardiol.* 2009; 98(1): 33-43.
50. Onodera H., Matsunaga T., Tamura Y., Maeda N., et al. Enalapril suppresses ventricular remodeling more effectively than losartan in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 2005; 150(4): 689.
51. Moller J.E., Dahlström U., Göttsche O., Lahiri A., et al.; OPTIMAAL Study Group. Effects of losartan and captopril on left ventricular systolic and diastolic function after acute myocardial infarction: results of the Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan (OPTIMAAL) echocardiographic substudy. *Am Heart J.* 2004; 147(3): 494-501.
52. Gong X., Zhou R., Li Q. Effects of captopril and valsartan on ventricular remodeling and inflammatory cytokines after interventional therapy for AMI. *Exp Ther Med.* 2018; 16(4): 3579-83.
53. Ambrosioni E., Borghi C., Magnani B. Early treatment of acute myocardial infarction with angiotensin-converting enzyme inhibition: safety considerations. SMILE pilot study working party. *Am J Cardiol.* 1991; 68(14): 101-10.
54. Bussmann W.D., Micke G., Hildenbrand R., Klepzig H. Captopril in acute myocardial infarct: its effect on infarct size and arrhythmias. *Dtsch Med Wochenschr.* 1992; 117(17): 651-7.
55. Ray S.G., Pye M., Oldroyd K.G., Christie J., et al. Early treatment with captopril after acute myocardial infarction. *Br Heart J.* 1993; 69(3): 215-22.
56. St John Sutton M., Pfeffer M.A., Plappert T., Rouleau J.L. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril. *Circulation.* 1994; 89(1): 68-75.
57. Kingma J.H., van Gilst W.H., Peels K.H., Dambrink J.H., Verheugt F.W., Wielenga R.P. Acute intervention with captopril during thrombolysis in patients with first anterior myocardial infarction. Results from the Captopril and Thrombolysis Study (CATS). *Eur Heart J.* 1994; 15(7): 898-907.
58. van Gilst W.H., Kingma J.H., Peels K.H., Dambrink J.H., St John Sutton M. Which patient benefits from early angiotensin-converting enzyme inhibition after myocardial infarction? Results of one-year serial echocardiographic follow-up from the Captopril and Thrombolysis Study (CATS). *J Am Coll Cardiol.* 1996; 28(1): 114-21.
59. St John Sutton M., Pfeffer M.A., Moye L., Plappert T., et al. Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of long-term use of captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial. *Circulation.* 1997; 96(10): 3294-9.
60. Edner M., Bonarjee V.V., Nilsen D.W., Berning J., et al. Effect of enalapril initiated early after acute myocardial infarction on heart failure parameters, with reference to clinical class and echocardiographic determinants. CONSENSUS II Multi-Echo Study Group. *Clin Cardiol.* 1996; 19(7): 543-8.
61. Bonnemeier H., Schäfer U., Ortak J., Kurz T., et al. Low doses of intracoronary enalaprilat suppress reperfusion-associated ventricular arrhythmias after primary percutaneous coronary interventions for acute myocardial infarction. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2007; 30 Suppl 1: S160-S5.

62. Ferrari R. Perindopril and Remodeling in Elderly with Acute Myocardial Infarction Investigators. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition with perindopril on left ventricular remodeling and clinical outcome: results of the randomized Perindopril and Remodeling in Elderly with Acute Myocardial Infarction (PREAMI) Study. *Arch Intern Med.* 2006; 166(6): 659-66.
63. Nicolosi G.L., Golcea S., Ceconi C., Parrinello G., et al.; PREAMI Investigators. Effects of perindopril on cardiac remodelling and prognostic value of pre-discharge quantitative echocardiographic parameters in elderly patients after acute myocardial infarction: the PRE-AMI echo sub-study. *Eur Heart J.* 2009; 30(13): 1656-65.
64. Fox K.M., Bertrand M.E., Remme W.J., Ferrari R., et al. Efficacy of perindopril in reducing risk of cardiac events in patients with revascularized coronary artery disease. *Am Heart J.* 2007; 153(4): 629-35.
65. Boldt J., Rothe G., Schindler E., Döll C., et al. Can clonidine, enoximone, and enalaprilat help to protect the myocardium against ischaemia in cardiac surgery? *Heart.* 1996; 76(3): 207-13.
66. Walter T., Helber U., Bail D., Heller W., Hoffmeister H.M. Influence of ACE inhibition on myocardial damage, the Kallikrein-Kinin system and hemostasis during cardiopulmonary bypass surgery. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2002; 50(3): 150-4.

Сведения об авторах:

Маслов Леонид Николаевич, доктор мед. наук, проф., зав. лаб., НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru;

Нарыжная Наталья Владимировна доктор мед. наук, вед. науч. сотр. НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр, e-mail: natalynar@yandex.ru;

Цибульников Сергей Юрьевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр, e-mail: tsibulnikov1986@mail.ru;

Воронков Никита Сергеевич, лаборант-исследователь, НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр, e-mail: shaman-49@mail.ru;

Бушов Юрий Валентинович, доктор биол. наук, проф., Томский государственный университет, e-mail: bushov@bio.tsu.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Шкурлатовская К.М.¹, Орлова А.С.¹, Силина Е.В.¹, Синельникова Т.Г.¹, Олисова О.Ю.¹, Теплюк Н.П.¹, Борзова Е.Ю.², Дадаева В.А.³, Пятилова П.М.¹

Молекулярно-генетические механизмы мастоцитоза

¹ ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»

Минздрава России (Сеченовский Университет),

119992, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России,

125993, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2, стр. 1;

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России,

101990, г. Москва, Россия, Петроверигский пер., 10, стр. 3

Мастоцитоз – группа редких клональных расстройств, характеризующихся аномальной пролиферацией и накоплением неопластических тучных клеток в коже и/или различных внутренних органах. Несмотря на гетерогенность клинической картины и прогноза подтипов заболевания, ведущее звено в патогенезе мастоцитоза занимают молекулярно-генетические дефекты. Практически у всех пациентов с мастоцитозом обнаруживаются мутации в нуклеотидной последовательности гена *KIT*, чаще всего в виде замены аспарагиновой кислоты на валин в кодоне 816. Данные дефекты наблюдаются как при формах, характеризующихся благоприятным прогнозом, так и при злокачественных подтипах заболевания. Наличие других мутаций, например, в генах *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, и молекулярно-генетических изменений, вызванных ими, вносят вклад в клинко-патологическое разнообразие мастоцитоза и ассоциировано с более агрессивным течением заболевания. Понимание сложности молекулярно-генетических изменений при мастоцитозе необходимо для выбора наиболее эффективного метода лечения и разработки новых препаратов, способных улучшить прогноз у пациентов с мастоцитозом. В статье представлены основные патогенетические механизмы мастоцитоза. Рассмотрена роль мутаций в гене *KIT*, а также индуцированные мутациями изменения в рецепторе c-Kit и внутриклеточных сигнальных путях, ответственных за пролиферацию тучных клеток.

Ключевые слова: тучные клетки; мастоцитоз; SCF; рецептор c-Kit; мутации *KIT*; *KIT* D816V; PI₃K-АКТ; JAK-STAT; STAT5; MAPK.

Для цитирования: Шкурлатовская К.М., Орлова А.С., Силина Е.В., Синельникова Т.Г., Олисова О.Ю., Теплюк Н.П., Борзова Е.Ю., Дадаева В.А., Пятилова П.М. Молекулярно-генетические механизмы мастоцитоза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(3): 127-133.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.127-133

Для корреспонденции: Орлова Александра Сергеевна, канд. мед. наук, доцент, каф. патологии человека ЛФ ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: orlovaas@yandex.ru

Финансирование. Работа не имеет финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.02.2019

Shkurlatovskaia K.M.¹, Orlova A.S.¹, Silina E.V.¹, Sinelnikova T.G.¹, Olisova O.Y.¹, Teplyuk N.P.¹, Borzova E.Y.², Dadaeva V.A.³, Pyatilova P.M.¹

Molecular and genetic mechanisms of mastocytosis

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,

8-2, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119992, Russian Federation;

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education

Barrikadnaya Str. 2, Bld. 1, Moscow 125993, Russian Federation;

³ National Research Center for Preventive Medicine,

Petroverigsky Pereulok 10, Bld. 3, Moscow 101990, Russian Federation

Mastocytosis is a group of rare clonal disorders characterized by abnormal proliferation and accumulation of neoplastic mast cells in the skin and/or various internal organs. Molecular genetic defects play the leading role in the pathogenesis of mastocytosis despite a significant clinical and prognostic heterogeneity of different forms of this disease. In almost all forms of mastocytosis, patients carry *KIT* gene mutations, mostly D816V. However, these defects are observed both in forms with good prognosis and in advanced variants of the disease. Mutations in other genes, such as *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, and the resulting molecular changes contribute to the clinical and pathological heterogeneity of mastocytosis and are associated with a more aggressive disease. Insight into the complexity of molecular and genetic changes in mastocytosis is essential for choosing an optimum treatment and for developing new drugs to improve the outcome of the treatment. The article described major pathogenetic mech-

anisms of mastocytosis and focused on the role of *KIT* mutations, conformation of the c-Kit receptor, and intracellular signaling pathways responsible for the proliferation of mast cells.

Keywords: mast cells; mastocytosis; SCF; c-Kit receptor; *KIT* mutations; *KIT* D816V; PI₃K-AKT; JAK-STAT; STAT5; MAPK.

For citation: Shkurlatovskaia K.M., Orlova A.S., Silina E.V., Sinelnikova T.G., Olisova O.Y., Teplyuk N.P., Borzova E.Y., Dadaeva V.A., Pyatilova P.M. Molecular and genetic mechanisms mastocytosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2019; 63 (3):127-133. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.127-133

For correspondence: Orlova Aleksandra Sergeevna — MD, PhD, associate professor (10 bld. 4 Rossolimo street, Moscow, 121467 Russia); ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9725-7491>; eLibrary SPIN-код: 6468-5100; email: orlovaas@yandex.ru; тел. 89262759985

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

Information about authors:

Shkurlatovskaia K.M., <https://orcid.org/0000-0001-8291-804X>

Orlova A.S., <http://orcid.org/0000-0001-9725-7491>

Silina E.V., <http://orcid.org/0000-0002-0246-5149>

Borzova E.Y., <https://orcid.org/0000-0003-1587-9137>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 22.02.2019

Sinelnikova T.G., <http://orcid.org/0000-0003-2803-5531>

Olisova O.Y., <https://orcid.org/0000-0003-2482-1754>

Teplyuk N.P., <https://orcid.org/0000-0002-5800-4800>

Pyatilova P.M., <https://orcid.org/0000-0001-5520-2900>

Введение

Мастоцитоз — термин, используемый для объединения группы редких гетерогенных заболеваний, характеризующихся аномальной пролиферацией и накоплением неопластических тучных клеток (ТК) в коже и/или различных внутренних органах [1-5]. Распространенность мастоцитоза составляет примерно 1 случай на 10 000 человек, при этом более чем в половине случаев заболевание возникает в первые 2 года жизни [6, 7]. В соответствии с последним пересмотром классификации опухолей гемопоэтических и лимфоидных тканей ВОЗ 2016 г. мастоцитоз исключен из группы миелопролиферативных заболеваний и выделен в отдельную клинико-патологическую группу. В зависимости от пораженной системы органов и систем выделяют кожный мастоцитоз (КМ), системный мастоцитоз (СМ) и саркому тучных клеток (СТК) [2, 8].

Патоморфологические особенности тучных клеток при мастоцитозе. ТК — мультифункциональные клетки иммунной системы, присутствующие во всех органах и тканях. Их количество особенно велико в регионах взаимодействующих с внешней средой, таких как кожа, слизистая оболочка дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта [9, 10]. ТК реагируют на различные раздражители посредством высвобождения биологически активных веществ, которые уже содержатся в гранулах, или же синтезируются их *de novo* при стимуляции клеток [10, 11]. В настоящее время среди тучных клеток можно выделить 2 субпопуляции [10]:

(1) ТК, экспрессирующие триптазу и химазу; обнаруживаются преимущественно в дерме и лимфатических узлах;

(2) ТК, экспрессирующие только триптазу; преобладают в слизистой оболочке кишечника и лёгких [10—2].

ТК мигрируют в кровоток в виде незрелых клеток-предшественников (CD13⁺, CD34⁺, CD117⁺FcεR1⁻), откуда они попадают в периферические ткани, где завершают созревание (FcεR1⁺, CD117/c-Kit⁺) под воздействием тканеспецифических факторов, таких как белки внеклеточного матрикса, молекулы адгезии, цитокины и хемокины, в отличие от других клеток гемопоэтического происхождения, которые дифференцируются и созревают в костном мозге [10-13].

Одним из факторов, вызывающих пролиферацию зрелых ТК и их клеток-предшественников, является фактор стволовых клеток (ФСК) — цитокин, продуцируемый в организме в основном фибробластами и эндотелиальными клетками. ФСК существует в двух изоформах - мембраносвязанной и растворимой [10]. Обе формы способны связываться и активировать рецептор c-Kit [11, 14-16], способствуя пролиферации, дифференцировке и увеличению выживаемости ТК и их предшественников. ФСК способствует дегрануляции зрелых ТК, продукции цитокинов и миграции ТК, опосредованной различными хемоаттрактантами [17].

Рецептор c-Kit. Трансмембранный рецептор c-Kit относится к III типу цитокиновых рецепторов и обладает собственной тирозинкиназной активностью. Отличительной чертой III типа рецепторов является наличие 5 Ig-подобных доменов в экстрацеллюлярном домене и киназной вставки в середине тирозинкиназного домена (рис. 1) [11, 14, 18]. Данный рецептор обнаруживается на различных клетках, включая гемопоэтические клетки-предшественники, стволовые клетки, меланоциты и интерстициальные клетки Кахаля.

В норме во всей гемопоэтической системе экспрессия рецептора c-Kit прекращается на всех зрелых клетках крови, кроме ТК [9-11, 14].

Белковая структура рецептора представлена 5 доменами: внеклеточным, трансмембранным, околосмембранным и двумя доменами тирозинкиназы (ДТК1 и ДТК2), отделенных киназной вставкой [10]. В свою очередь внеклеточный домен состоит из 5 Ig-подобных доменов (рис. 1). Первые 3 Ig-подобных домена обладают способностью связывать ФСК, а 4-й и 5-й участвуют в процессе димеризации рецептора. Околосмембранный домен регулирует активность тирозинкиназы [3]. ДТК1 – NH₂-терминальная часть, отвечающая за связывание аденозинтрифосфата (АТФ), ДТК2 – COOH-терминальная часть или домен фосфотрансферазы (ДФТ) (рис. 2) [3, 14, 18-20]. Рецептор кодируется геном *KIT*, содержащим 21 экзон (рис. 1) [3] и расположенном на хромосоме 4q12 [10, 14, 21].

Роль мутаций в патогенезе мастоцитоза. Ведущим звеном в патогенезе мастоцитоза является наличие активирующих мутаций в различных экзонах гена *KIT*,

ведущих к повышенной пролиферации, дифференцировке, увеличению продолжительности жизни, накоплению неопластических ТК и их предшественников (рис. 1) [3, 16]. При СМ чаще всего мутации обнаруживаются в 17-18 экзонах кодирующих ДФТ, при КМ мутации обычно локализируются вне этих сайтов, а именно в экзонах кодирующих внеклеточный домен (ВКД) [5].

Наиболее распространенной мутацией (в 80-90% случаев СМ, а также 10-30% случаев КМ) является замена аспарагиновой кислоты на валин в кодоне 816 гена *KIT* (D816V) [2, 3, 14, 21–25] (рис. 1). Учитывая наличие данной мутации при всех подтипах СМ, включая индолентный, отличающийся более благоприятным прогнозом, целесообразно предположить, что существуют другие патогенетические механизмы, ответственные за развитие агрессивных подтипов заболевания. Действительно, был выявлен ряд дополнительных соматических мутаций: чаще затрагиваются гены *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *TET2*, *JAK2*, *N / K RAS*, *CBL*; реже *EZH2*, *IDH2*, *ETV6*, *U2AF*, *SF3B1* [2, 3, 25-30]. Предполагается, что изменения, вызванные сочетанием данных мутаций с мутациями в гене *KIT*, способствуют увеличению продолжительности жизни и пролиферации ТК [2]. Кроме того, важную роль имеет время возникновения мутации *KIT* D816V в процессе дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток в ТК [14]. В ходе проведенных исследований в экспериментальных моделях на лабораторных мышах показано, что возникновение мутации на более раннем этапе развития приводит к злокачественному течению заболевания, в отличие от генетической аномалии в уже дифференцированных ТК [31, 32]. Данная теория может объяснять наличие мутации в ТК кожи [33] и отсутствие данного протоонкогена в образцах костного мозга и крови у больных КМ [4, 34]. Однако необходимо дальнейшее изучение и проведение клинических исследований для уточнения момента возникновения мутации *KIT* D816V и ее влияния на течение заболевания. Следует отметить, что в ходе исследования, выполненного Garcia-Montero А.С. и соавторами, у 83 больных индолентным СМ была выявлена связь между наличием *KIT* D816V⁺-мезенхимальных стволовых клеток, дающих начало мезодермальным клеткам и органам, и риском развития гепато- и спленомегалий, патологии костной системы, а также прогрессированием заболевания [35].

В норме, как уже было сказано, для активации рецептора необходимо наличие ФСК, который способствует взаимодействию 2 мономерных молекул рецептора c-Kit. Наличие мутаций в гене *KIT* ведет к изменениям в структуре рецептора, в результате которых

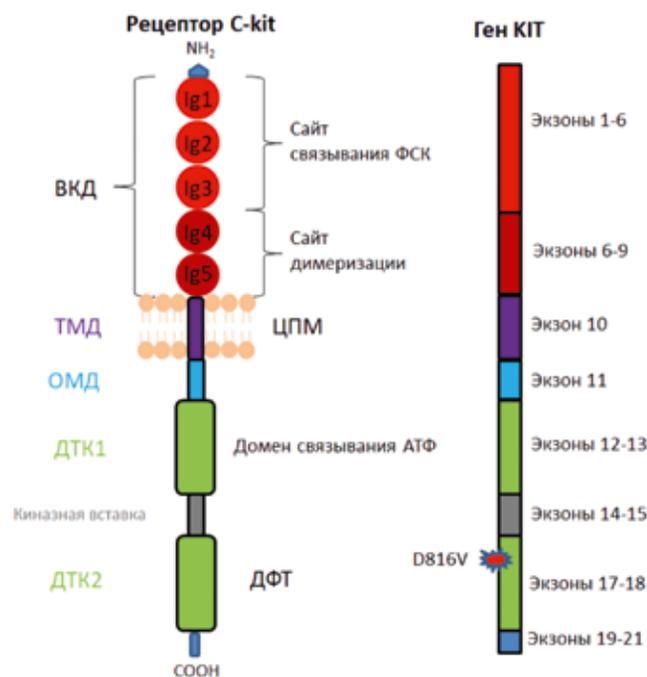


Рис. 1. Схематическое изображение белковой структуры мономерной формы рецептора c-Kit и гена *KIT*. Внеклеточный домен (ВКД), трансмембранный домен (ТМД), околосмембранный домен (ОМД), домены тирозинкиназы (ДТК1 и ДТК2), домен фосфотрансферазы (ДФТ), аденозинтрифосфат (АТФ), цитоплазматическая мембрана (ЦПМ). «Звездочкой» указана локализация наиболее часто встречающейся мутации при мастоцитозе - D816V.

он может активироваться вне зависимости от своего лиганда [25]. Точный механизм данных изменений до конца не выяснен. Предполагается, что рецептор приобретает способность спонтанно димеризоваться с другим рецептором или вступать во взаимодействие с рецептором с-Kit дикого типа, или активироваться в мономерной форме [3].

Димеризация и аутофосфорилирование рецептора вызывает взаимодействие рецепторных тирозинкиназ с многими сигнальными белками, содержащими SH2-домены (англ. — SRC homology 2) и связывающими фосфотирозин. К таким молекулам относятся фосфатидилинозитол-3-киназа (PI₃K), адаптерный белок Grb2 (англ. — growth-factor-receptor-bound protein 2), передающий сигнал к белкам Ras (англ. — rat sarcoma) и латентные формы транскрипционных факторов STAT - трансдуктор сигнала и активатор транскрипции (англ. — signal transducer and activator of transcription). Связывание данных белков с фосфотирозинами рецептора вызывает запуск пересекающихся внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за активацию в ядре набора транскрипционных факторов и экспрессию специфических генов [36, 37]. Конечным результатом является увеличение продолжительности жизни ТК, их пролиферация и дифференцировка [3, 5, 9, 10, 12, 38] (рис. 3).

Кроме того, в исследованиях *in vitro* установлено, что активация с-Kit рецептора потенцирует IgE-опосредованную активацию ТК [39]. Согласно исследованиям *in vitro*, потенцирующие эффекты сигнальных механизмов, опосредованных рецепторами FcεR1 и с-Kit, обусловлены участием адаптерных белков NTAL (англ. — non-T-cell activation linker) [10, 40]. Однако клиническое значение данных механизмов активации ТК в развитии анафилаксии у пациентов с мастоцитозом требует дальнейшего изучения [41].

Ниже рассмотрены наиболее изученные с-Kit-индуцированные сигнальные пути в неопластических ТК.

PI₃K – АКТ (фосфатидилинозитольный) путь. Фосфатидилинозитольный путь обладает антиапоптотическим действием [9, 14, 36, 38]. PI₃K своей P85-субъединицей взаимодействует с фосфорилированным тирозиновым остатком рецептора с-Kit, что приводит к аллостерической активации каталитической p110-субъединицы PI₃K, способствующей превращению PIP2 (фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат) в PIP3 (фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат). PIP3 связывается с ключевой молекулой пути – АКТ/ПКВ (член семейства протеинкиназ В), в результате данного взаимодействия возможно фосфорилирование АКТ/ПКВ в двух сайтах (T308 и S473) с помощью PDK1 и PDK2

(фосфоинозитид-зависимые киназы 1 и 2), которые также активируются PIP3 [5].

АКТ/ПКВ способна блокировать апоптоз несколькими путями [36]. АКТ/ПКВ фосфорилирует и тем самым инактивирует FoxO (член семейства транскрипционных факторов Forkhead, англ. — Forkhead box protein O), что приводит к снижению аффинности FoxO к ДНК, экспорту их из клеточного ядра и удержанию в цитоплазме с последующим разрушением в протеосомах [42]. АКТ/ПКВ также инактивирует проапоптотический белок семейства Bcl2 (BAD, Bcl-2-associated death promoter /), который способствует выходу из митохондрий в цитоплазму цитохрома С и/или протеазы АИФ (апоптоз индуцирующий фактор -apoptosis inducing factor) [5, 36, 43]. Кроме этого, АКТ/ПКВ инактивирует белковый комплекс TSC-2 (комплекс туберозного склероза 2 - tuberous sclerosis complex 2), который в норме подавляет mTOR (mammalian target of rapamycin -- мишень рапамицина). В результате активации mTOR запускаются функции транскрипционных факторов семейства NF-κB (nuclear factor-κB -- ядерный фактор-κB) и циклина D [5].

MAPK путь. Сигнальный путь MAPK контролирует экспрессию генов, регулирующих пролиферацию ТК, их дифференцировку и продолжительность жизни [10, 44]. Фосфотирозин рецептора с-Kit связывается с мо-

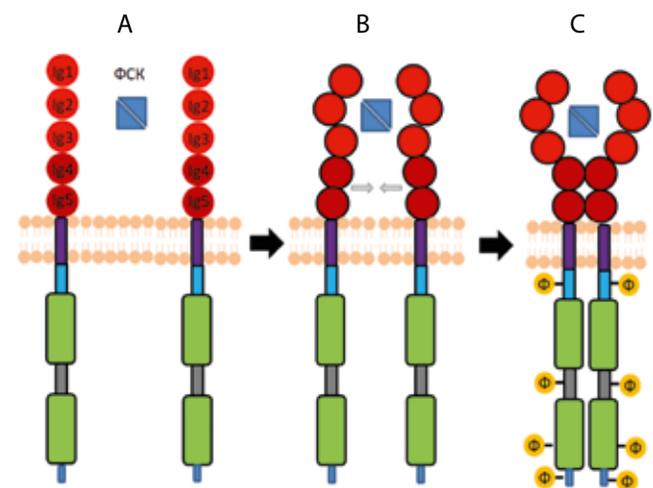


Рис. 2. Схематическое изображение ФСК-индуцированной активации рецептора с-Kit (адаптировано). А, В. ФСК взаимодействует с первыми тремя Ig-подобными доменами двух соседних мономерных белковых молекул с-Kit, что индуцирует образование гомодимерной структуры, которая дополнительно стабилизируется за счет взаимодействия между 4-м и 5-м Ig-подобными доменами двух соседних молекул. С. Данные структурные изменения обеспечивают аутофосфорилирование тирозиновых остатков в околочелюстном домене, области киназной вставки, домене фосфотрансферазы и COOH-конце [11, 14, 18].

лекулой GRB2, ассоциированной с SOS (англ. - son of sevenless) — фактором замещения гуаниннуклеотидов в малых G-белках [10, 14, 44]. Под влиянием SOS происходит субстратное фосфорилирование белка RAS с образованием активной гуанизинтрифосфат-связанной формы (RAS-GTP) [44]. В дальнейшем серин-треониновая киназа RAF связывается с N-концевым доменом RAS-GTP и активирует ERK / MAPK (англ. - extracellular signal-regulated kinases / mitogen-activated protein kinases или *митоген-активируемые протеинкиназы* / киназы, регулируемые внеклеточным сигналом) [5, 44]. Данные молекулы в свою очередь транслоцируются из цитоплазмы в ядро, где они активируют различные факторы транскрипции. Стоит отметить, что RAS-GTP также способен воздействовать на молекулу BAD, функции которой описаны выше [36].

STAT5 / JAK-STAT путь. Сигнальный JAK-STAT путь отвечает за развитие, продолжительность жизни и пролиферацию ТК [9, 14, 38] посредством активации факторов транскрипции STAT 1/3/5. JAK2 (англ. — Janus Kinase 2) фосфорилируется после активации рецептора с-Kit и далее способствует димеризации 2 мономерных молекул STAT, благодаря соединению фосфотирозинового остатка и SH2 домена STAT. В активной форме STAT проникает в ядро, где связывается с генами-промоторами, вызывая активацию или подавление транскрипции генов. Мутация *KIT* D816V

способствует прямой активации STAT, вне зависимости от JAK2 путем прямого фосфорилирования тирозина через киназный домен рецептора [5, 9, 38].

Таким образом, генетические дефекты при мастоцитозе можно условно разделить на *KIT*-зависимые и *KIT*-независимые. Первые (*KIT*-зависимые) ассоциированы с развитием патологического процесса и встречаются при всех подтипах системного мастоцитоза, вторые же (*KIT*-независимые) характеризуют степень агрессивности и диагностируются преимущественно при злокачественных формах СМ. В частности мутация D816V в гене *KIT* опосредует изменение в передаче сигнала, приводя к ускорению транскрипции и клеточного цикла ТК, а также снижению их апоптоза. Результатом данных изменений является гиперпролиферация ТК и их накопление в различных органах.

Перспективы анализа внутриклеточных сигнальных путей с учетом молекулярно-генетических особенностей мастоцитоза. План лечения пациентов с мастоцитозом зависит от подтипа заболевания и его клинических проявлений. При необходимости проводится симптоматическая терапия [3, 45], а также лечение заболеваний, опосредованных мастоцитозом (остеопения и остеопороз, язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, гематологические и др. расстройства) [46]. При злокачественных формах мастоцитоза применяется аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых

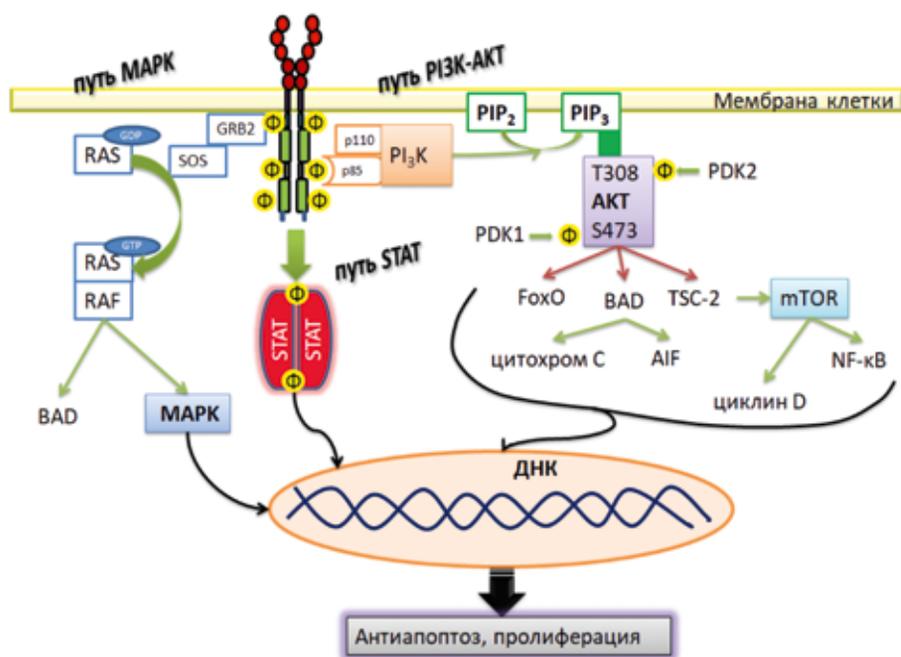


Рис. 3. с-Kit-индуцированные внутриклеточные сигнальные пути в неопластических тучных клетках. Зелеными стрелками указан процесс активации молекул, красными — их инактивация, черными — процессы активации транскрипции в ядре клетки.

клеток и циторедуктивная терапия интерфероном-альфа и кладрибином [2, 47].

Кроме того, на сегодняшний день активно используется таргетная терапия, направленная на ингибирование тирозинкиназ. Мутация D816V в гене *KIT*, приводя к конформационным изменениям рецептора c-Kit, затрудняет связывание ряда ингибиторов тирозинкиназ, таких как иматиниб, мазитиниб и бозутиниб [2, 3, 38]. Таким образом, лечение ингибиторами тирозинкиназ пациентов с мастоцитозом, имеющих мутацию D816V в гене *KIT*, может оказаться неэффективным. На сегодняшний день мидостаурин является препаратом выбора для таких больных, в связи с его способностью связываться с рецептором c-Kit вне зависимости от наличия или отсутствия мутации в гене *KIT* [2, 3]. Данный препарат также блокирует IgE-зависимое высвобождение гистамина ТК, тем самым воздействуя на симптомы, опосредованные медиаторами ТК [2, 47].

В настоящее время ведутся разработки новых таргетных препаратов с учетом различных терапевтических мишеней, идентифицированных в неопластических ТК, а также в стволовых клетках и клетках-предшественниках. Перспективным направлением является блокирование внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за пролиферацию клеток в результате воздействия на ключевые молекулы путей: PI3K, AKT, mTOR, STAT, MAPK (рис.3) [2], что создает предпосылки для персонализированной терапии данного заболевания.

Заключение

Мастоцитоз является редким клональным заболеванием. Ключевым механизмом развития данного расстройства являются молекулярные дефекты – мутации в последовательности гена *KIT*, чаще всего D816V, которые обнаруживаются почти при всех подтипах болезни. Однако наличие дополнительных соматических мутаций в генах отличных от *KIT*, таких как *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1* и других, вносят вклад в клинико-патологическое разнообразие мастоцитоза, а также обуславливают более агрессивное течение отдельных его форм. Изучение генетических нарушений при мастоцитозе и опосредованных ими изменений во внутриклеточных сигнальных механизмах необходимо для персонализированного подхода в лечении больных мастоцитозом и разработки новых таргетных препаратов.

Литература (п.п. 1-35; 38-40; 45-47 см. References)

36. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. *Биохимия*. 2000; 65(1): 2-27.

37. Малышев И. Ю. Феномены и сигнальные механизмы репрограммирования макрофагов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 59(2): 99-111.

41. Гушин И. С. Эволюционное предупреждение: аллергия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; (1): 57-67.

42. Донецкова А. Д., Митин А.Н. Роль транскрипционных факторов FOXO в поддержании гомеостаза Т-лимфоцитов. *Иммунология*. 2017; 38(3): 160-7. DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-3-160-167.

43. Полякова В.С., Николаева Т.В., Сетко Н.П., Воронина Л.Г. Роль апоптоза, индуцируемого тяжелыми металлами, в развитии аутоиммунных заболеваний. *Современные проблемы науки и образования*. 2016. 6. Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26018>

44. Петров Р.В., Хаитов Р.М. *Иммуногены и вакцины нового поколения*. М.; ГЭОТАР Медиа. 2011. 608 с.: ил. (Серия «Библиотека врача специалиста»).

References

1. Valent P.,... M.D., Langenfeld F., Jeanningros S., Cerny-Reiterer S., Hadzijusufovic E., et al. Co-operating STAT5 and AKT signaling pathways in chronic myeloid leukemia and mastocytosis: possible new targets of therapy. *Haematologica*. 2014;99(3):417-29.

6. Brockow K. Epidemiology, prognosis, and risk factors in mastocytosis. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2014;34(2):283-95.

7. Kettelhut BV, Metcalfe DD. Pediatric mastocytosis. *The Journal of investigative dermatology*. 1991;96(3):15S-8S.

8. Swerdlow S.H. C.E., Harris N., et al. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th edition. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer (IARC) 2017.

9. Bibi S., Langenfeld F., Jeanningros S., Brenet F., Soucie E., Hermine O., et al. Molecular defects in mastocytosis: KIT and beyond KIT. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2014;34(2):239-62.

10. Metcalfe D.D. Mast cells and mastocytosis. *Blood*. 2008; 112(4):946-56.

11. Komi D.EA., Rambasek T., Wohlrl S. Mastocytosis: from a Molecular Point of View. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2018;54(3):397-411.

12. da Silva E.Z., Jamur M.C., Oliver C.. Mast cell function: a new vision of an old cell. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2014;62(10):698-738.

13. Siebenhaar F., Redegeld F.A., Bischoff S.C., Gibbs B.F., Maurer M. Mast Cells as Drivers of Disease and Therapeutic Targets. *Trends in immunology*. 2018;39(2):151-62.

14. Falchi L., Verstovsek S. Kit Mutations: New Insights and Diagnostic Value. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2018;38(3):411-28.

15. Bai C.G., Hou X.W., Wang F., Qiu C., Zhu Y., Huang L., et al. Stem cell factor-mediated wild-type KIT receptor activation is critical for gastrointestinal stromal tumor cell growth. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(23):2929-37.

16. Cruse G., Metcalfe D.D., Olivera A. Functional deregulation of KIT: link to mast cell proliferative diseases and other neoplasms. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2014;34(2):219-37.

17. Gilfillan A.M., Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):218-30.

18. Lennartsson J., Ronnstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiological reviews*. 2012;92(4):1619-49.

19. Giebel L.B., Strunk K.M., Holmes S.A., Spritz R.A. Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene*. 1992;7(11):2207-17.

20. Chabot B., Stephenson D.A., Chapman V.M., Besmer P., Bernstein A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature*. 1988;335(6185):88-9.
21. Arock M., Sotlar K., Akin C., Broesby-Olsen S., Hoermann G., Escribano L., et al. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015;29(6):1223-32.
22. Nagata H., Worobec A.S., Oh C.K., Chowdhury B.A., Tannenbaum S., Suzuki Y., et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(23):10560-4.
23. Longley B.J., Tyrrell L., Lu S.Z., Ma Y.S., Langley K., Ding T.G., et al. Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nature genetics*. 1996;12(3):312-4.
24. Fritsche-Polanz R., Jordan J.H., Feix A., Sperr W.R., Sunder-Plassmann G., Valent P., et al. Mutation analysis of C-KIT in patients with myelodysplastic syndromes without mastocytosis and cases of systemic mastocytosis. *British journal of haematology*. 2001;113(2):357-64.
25. Valent P. Mastocytosis: a paradigmatic example of a rare disease with complex biology and pathology. *American journal of cancer research*. 2013;3(2):159-72.
26. Hanssens K., Brenet F., Agopian J., Georgin-Lavialle S., Damaj G., Cabaret L., et al. SRSF2-p95 hotspot mutation is highly associated with advanced forms of mastocytosis and mutations in epigenetic regulator genes. *Haematologica*. 2014;99(5):830-5.
27. Jawhar M., Schwaab J., Schnitter S., Megendorfer M., Pfirrmann M., Sotlar K., et al. Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30(1):136-43.
28. Traina F., Visconte V., Jankowska A.M., Makishima H., O'Keefe C.L., Elson P., et al. Single nucleotide polymorphism array lesions, TET2, DNMT3A, ASXL1 and CBL mutations are present in systemic mastocytosis. *PLoS one*. 2012;7(8):e43090.
29. Soucie E., Hanssens K., Mercher T., Georgin-Lavialle S., Damaj G., Livideanu C., et al. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood*. 2012;120(24):4846-9.
30. Damaj G., Joris M., Chandesris O., Hanssens K., Soucie E., Canioni D., et al. ASXL1 but not TET2 mutations adversely impact overall survival of patients suffering systemic mastocytosis with associated clonal hematologic non-mast-cell diseases. *PLoS one*. 2014;9(1):e85362.
31. Gerbault A., Wickenhauser C., Scholten J., Peschke K., Drube S., Horny H.P., et al. Mast cell hyperplasia, B-cell malignancy, and intestinal inflammation in mice with conditional expression of a constitutively active kit. *Blood*. 2011;117(6):2012-21.
32. Zappulla J.P., Dubreuil P., Desbois S., Letard S., Hamouda N.B., Daeron M., et al. Mastocytosis in mice expressing human Kit receptor with the activating Asp816Val mutation. *J Exp Med*. 2005;202(12):1635-41.
33. Chan I.J., Tharp M.D. Comparison of lesional skin c-KIT mutations with clinical phenotype in patients with mastocytosis. *Clinical and experimental dermatology*. 2018;43(4):416-22.
34. Georgin-Lavialle S., Stojanovic K.S., Buob D., Grateau G. Amyloidosis. *La Revue du praticien*. 2014;64(8):1050-3.
35. Garcia-Montero A.C., Jara-Acevedo M., Alvarez-Twose I., Teodosio C., Sanchez-Munoz L., Muniz C., et al. KIT D816V-mutated bone marrow mesenchymal stem cells in indolent systemic mastocytosis are associated with disease progression. *Blood*. 2016;127(6):761-8.
36. Kopnin B.P. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biokhimiia*. 2000;65(1):2-27. (in Russian)
37. Malyshev I.Y. Phenomena and signaling mechanisms of macrophage reprogramming. *Patologicheskaja fiziologija i eksperimental'naja terapija*. 2015;59(2):99-111. (in Russian)
38. Morales J.K., Falanga Y.T., Depczynski A., Fernando J., Ryan J.J. Mast cell homeostasis and the JAK-STAT pathway. *Genes and immunity*. 2010;11(8):599-608.
39. Lin T.J., Enciso A., Bissonnette E.Y., Szczepek A., Befus A.D. Cytokine and drug modulation of TNF alpha in mast cells. *Advances in experimental medicine and biology*. 1996;409:279-85.
40. Tkaczyk C., Horejsi V., Iwaki S., Draber P., Samelson L.E., Satterthwaite A.B., et al. NTAL phosphorylation is a pivotal link between the signaling cascades leading to human mast cell degranulation following Kit activation and Fc epsilon RI aggregation. *Blood*. 2004;104(1):207-14.
41. Gushchin I.S. Evolutionary admonition: allergy. *Patologicheskaja fiziologija i eksperimental'naja terapija*. 2014(1):57-67. (in Russian)
42. Donetskova A. D., Mitin A.N. The role of transcription factors FOXO in t-lymphocyte homeostasis. *Immunologiya*. 2017; 38(3): 160-167. (in Russian)
43. Polyakova V.S., Nikolaeva T.V., Setko N.P., Voronina L.G. The role of apoptosis induced by the heavy metals in the development of autoimmune diseases. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; 6. Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26018> (in Russian)
44. Petrov R.V., Haitov R.M. Immunogeny i vakciny novogo pokoleniya. Moscow; GEHOTAR Media. 2011. (Seriya «Biblioteka vracha specialista»). (in Russian)
45. Worobec A.S. Treatment of systemic mast cell disorders. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2000;14(3):659-87.
46. Cardet J.C., Akin C., Lee M.J. Mastocytosis: update on pharmacotherapy and future directions. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2013;14(15):2033-45.
47. Valent P., Akin C., Hartmann K., Nilsson G., Reiter A., Hermine O., et al. Advances in the Classification and Treatment of Mastocytosis: Current Status and Outlook toward the Future. *Cancer research*. 2017;77(6):1261-70.

Сведения об авторах:

Шкурлатовская Карина Максимовна, студентка 5 курса ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.И. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: shkyrlak@gmail.com;
Орлова Александра Сергеевна, канд. мед. наук, доцент, e-mail: orlovaas@yandex.ru;
Силина Е.В., доктор мед. наук, проф., e-mail: silinaekaterina@mail.ru;
Синельникова Т.Г., канд. мед. наук, доцент, e-mail: sintatiana@rambler.ru;
Олисова Ольга Юрьевна, доктор мед. наук, проф. email: olisovaolga@mail.ru;
Теплюк Наталия Павловна, доктор мед. наук, проф., e-mail: teplyukn@gmail.com;
Борзова Елена Юрьевна, доктор мед. наук, проф., e-mail: eborzova@gmail.com;
Дадаева Валида Арсланадиевна, канд. мед. наук, науч. сотр., e-mail: dr.dadaeva@mail.ru;
Пятилова Полина Михайловна, асс., e-mail: polinapyatilova@gmail.com

**Чернядьев С.А.¹, Аретинский В.Б.², Сивкова Н.И.³, Жилияков А.В.⁴,
Коробова Н.Ю.¹, Горбатов В.И.⁵, Медведева С.Ю.⁶**

Моделирование *ex vivo* процесса термотерапии кисты Бейкера

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620000, г. Екатеринбург, Россия, ул. Репина, д. 3;

² ГАУЗ СО «Областной специализированный центр медицинской реабилитации «Озеро Чусовское», 620043, г. Екатеринбург, Россия, п. Чусовское Озеро, ул. Мира, д. 1;

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620002, г. Екатеринбург, Россия, ул. Мира, д. 19;

⁴ ООО «Новые технологии для амбулаторной медицины», 620057, Россия, г. Екатеринбург, ул. Краснофлотцев, д. 47-44;

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный горный университет», 620144, г. Екатеринбург, Россия, ул. Куйбышева, д.30;

⁶ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, 620049, г. Екатеринбург, Россия, ул. Первомайская, д. 106

Цель работы – определение *ex vivo* глубины и степени коагуляционных изменений в тканях кисты Бейкера, возникающих при равномерном изотермическом воздействии при различной длительности воздействия. **Методика.** Для проведения исследования был сконструирован экспериментальный термостол с возможностью контроля поддержания изотермического режима работы. Иссеченная во время операции капсула кисты Бейкера незамедлительно была разделена на несколько фрагментов. Один из образцов служил контролем, остальные фрагменты выдерживали на поверхности экспериментального термостолика (65—70 °С), в течение различных промежутков времени до 60 с. Все фрагменты, включая интактный, исследовали гистологически. **Результаты.** В интактном фрагменте кисты Бейкера обнаруживались признаки хронического воспаления, такие как полнокровие сосудов, мукоидное набухание и очаговая периваскулярная инфильтрация лимфоидными элементами. В образцах стенки, подвергнутых термическому воздействию продолжительностью до 30 с, обнаруживались структурные изменения на уровне синовиальной оболочки, в виде пикноза и лизиса ядер синовиоцитов. В фрагментах стенки кисты при нагревании в течение 60 с отмечался некроз синовиального слоя, а в подлежащих слоях – признаки отека, разрыхление и фрагментация коллагеновых волокон. Выраженность и глубина деструктивных изменений в стенке кисты Бейкера находились в прямой зависимости от периода непрерывного нагрева. **Заключение.** Определены закономерности изменений гистологического образца в зависимости от тепловой экспозиции. В период до 30 с теплового воздействия на ткани кисты Бейкера ведущими гистоморфологическими трансформациями являются признаки деструкции синовиального слоя. При увеличении периода нагрева до 60 с имеет место лишь частичное нарушение структуры коллагена в стенке кисты.

Ключевые слова: моделирование теплового воздействия; киста Бейкера; термодеструкция; гистоморфологические изменения.

Для цитирования: Чернядьев С.А., Аретинский В.Б., Сивкова Н.И., Жилияков А.В., Коробова Н.Ю., Горбатов В.И., Медведева С.Ю. Моделирование *ex vivo* процесса термотерапии кисты Бейкера. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 134-140.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.134-140

Для корреспонденции: Жилияков Андрей Викторович, к.м.н., генеральный директор ООО «Новые технологии для амбулаторной медицины», г. Екатеринбург, e-mail: doctor-zhilyakov@rambler.ru

Финансирование. Результаты являются частью НИОКР профинансированной из средств гранта по программе «Старт», выданного Федеральным государственным бюджетным учреждением «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям).

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что данная работа, ее тема, предмет и содержание не затрагивают конкурирующих интересов.

Благодарность. Авторы выражают особую благодарность лаборанту Института иммунологии и физиологии УрО РАН Бриллиант С.А. за помощь в выполнении гистологической части исследования.

Поступила 13.08.2018

Chernyadev S.A.¹, Aretinsky V.B.², Sivkova N.I.³, Zhilyakov A.V.⁴, Korobova N.Yu.¹, Gorbатов V.I.⁵, Medvedeva S.Yu.⁶

Ex vivo modeling of thermotherapy in baker's cyst

¹Ural State Medical University,

Repina Str. 3, Ekaterinburg 620000;

²Regional Specialized Center for Medical Rehabilitation «Lake Chusovskoye»,

Mira Str. 1, Poselok Chusovskoye Ozero, Ekaterinburg 620043;

³The First President of Russia B.N. Yeltsin Ural Federal University,

Mira Str. 19, Ekaterinburg 620002;

⁴OOO New Technologies for Outpatient Medicine,

Krasnoflotsev Str. 47-44, Ekaterinburg 620057;

⁵Ural State Mining University,

Kuibysheva Str. 30, Ekaterinburg 620144;

⁶Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,

Pervomayskaya Str. 106, Ekaterinburg 620049

Aim. To determine *ex vivo* the depth and degree of coagulation changes in tissues of Baker's cyst induced by a uniform isothermal exposure of different duration. **Methods.** An experimental thermo table was constructed for the study with an option to maintain the isothermal mode of operation. The capsule of Baker's cyst excised during the surgery was immediately divided into several fragments. One of the samples was used as control, the remaining samples were kept on the surface of the thermo table heated to 65-70°C for different time up to 60 seconds. All fragments were examined histologically. **Results.** The intact fragment of Baker's cyst showed signs of chronic inflammation, such as plethoric blood vessels, mucoid swelling, and focal perivascular infiltration with lymphoid elements. In samples of the wall exposed to heat for up to 30 seconds, similar structural changes were found at the level of synovial shell in the form of pyknosis and lysis of synovial nuclei. Fragments of the cyst wall heated for 60 seconds showed necrosis of the synovial layer and underlying levels showed swelling, loosening and fragmentation of collagen fibers. Severity and depth of destructive changes in the Baker's cyst wall directly depended on duration of continuous heating. **Conclusion.** The study determined some regularities of changes in histological samples related to the thermal exposure. In thermal exposures of Baker's cyst tissue lasting for up to 30 seconds, the major histological transformation included signs of destruction in the synovial layer. When the heating duration was increased to 60 seconds, only a partial disorder of collagen structure was observed in the cyst wall.

Keywords: modeling, thermal impact, Baker's cyst; thermal destruction, histomorphological changes.

For citation: Chernyadev S.A., Aretinsky V.B., Sivkova N.I., Zhilyakov A.V., Korobova N.Yu., Gorbатов V.I., Medvedeva S.Yu. *Ex vivo* modeling of thermotherapy of Baker's cysts. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 134-140. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.134-140

For correspondence: Zhilyakov Andrey Viktorovich, kandidat medicinsky nauk, CEO LLC «New Technologies for Out-patient Medicine», Ekaterinburg, e-mail: doctor-zhilyakov@rambler.ru

Funding information. The results are part of the R & D financed from the «Start» program grant, issued by the Federal State Budget Institution «The Foundation for Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Sphere» (the Innovation Promotion Foundation).

Conflict of interest. The authors declare that this work, its theme, subject and content do not affect competing interests. The materials of the article have not been published anywhere before.

Acknowledgments. The authors are especially grateful to the laboratory assistant of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences Brilliant S.A. for assistance in performing the histological part of the study.

Information about authors:

Chernyadev S.A., <https://orcid.org/0000-0003-4207-1862>

Aretinsky V.B., <https://orcid.org/0000-0002-6063-5206>.

Sivkova N.I., <http://orcid.org/0000-0002-6331-0124>

Zhilyakov A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1261-3712>

Korobova N.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8523-912X>

Gorbатов V.I., <http://orcid.org/0000-0001-8066-0217>

Medvedeva S.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-1410-0139>

Received 13.08.2018

Методика разрушения патологических тканей за счет локального нагрева до температуры коагуляции белка была предложена более 50 лет назад, однако малоинвазивные устройства, пригодные для этих целей,

появились относительно недавно. Высокоинтенсивное лазерное излучение, передаваемое по тонкому световоду, изначально использовалось для деструкции злокачественных новообразований и метастазов без

внутреннего жидкостного содержимого. Высокая температура, создаваемая в области введения торца оптоволоконного носителя, инициировала процесс коагуляции и абляции ткани новообразования. Закономерности распределения зоны абляции и некроза неоднократно доказаны на основе математического моделирования и гистоморфологических экспериментов.

В тоже время, для полостных доброкачественных новообразований лазерная интервенционная термотерапия начала применяться относительно недавно. Основной проблемой для распространения этого метода лечения является тот факт, что биологические ткани кисты представляют собой многокомпонентные материалы, в состав которых в основном входят не только коллаген и вода, но также жир, гемоглобин, иногда включения минералов. Эти составляющие обладают собственными коэффициентами поглощения, теплопроводности и теплоемкости, от соотношения и размеров материала которых зависят процессы поглощения излучения и нагрева [1]. Второй проблемой является значительная площадь внутренней поверхности кисты, а также различная толщина ее стенки. Это затрудняет точность расчета концентрации световой энергии на единицу площади и длительность воздействия лазера для достижения желаемого клинического эффекта. Также рядом авторов было установлено, что при воздействии в течение 5 с лазерным излучением длиной волны 1,47 мкм при 5 Вт ширина кратера составляет не более 1,5 мм, а ширина боковой зоны коагуляции не более 0,5 мм [2]. Принимая во внимание, что при математическом моделировании киста Бейкера ближе к эллипсоиду, в среднем площадь его внутренней поверхности у наиболее клинически часто встречающихся образцов [3], равна приблизительно 29 см². Простое соотношение данных результатов приводит к выводу о чрезвычайной длительности процедуры дискретного лазерного облучения всей внутренней поверхности кисты для достижения полноценной коагуляции всей толщины стенки.

Ряд авторов решили эту проблему одномоментной теплоотдачи на все части стенки, нагревая частично сохраненное содержимое кисты, обладающего высокой теплоемкостью и равномерностью распределения тепла за счет конвекции [3, 4]. Эффект, опосредованный термовоздействием жидкости, нагретой поглощенным потоком фотонов, имеет важное преимущество в связи с отсутствием непосредственного воздействия излучения на ткань. Поскольку воздействие лазером приводит к изменению биологических свойств ткани, увеличивается резистивность к лизосомальным гидролазам, уменьшается количество тромбоцитарных факторов роста, что в свою очередь затягивает процесс

заживления раны [5]. Поскольку доказано, что ИК лазерный нагрев соединительных тканей, содержащих коллаген, аналогичен обычному термическому воздействию [6], мы предположили, что нагревание излучением «водопоглощающего» спектра теплоносителя внутри кисты приведет к схожему клинико-морфологическому эффекту.

Однако несмотря на достигнутые успехи, метода термокоагуляции при лечении ряда новообразований и патологически измененных тканей данная манипуляция не может гарантировать их полную деструкцию. В связи с этим постоянно предпринимаются попытки усилить разрушающее действие физического агента, при параллельном повышении управляемости процессом. В доступной литературе мы не обнаружили сведений о морфологических изменениях, послойно возникающих в тканях кисты Бейкера, в зависимости от времени экспозиции теплового воздействия при их равномерном прогревании.

Цель работы – *ex vivo* определить глубину и степень коагуляционных изменений в тканях кисты Бейкера, возникающих при равномерном изотермическом воздействии при различной длительности воздействия.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов.

Для моделирования процесса равномерного нагревания стенки кисты внутриполостной жидкостью был создан экспериментальный термостенд. Тепловыделяющий элемент состоит из двух алюминиевых пластин толщиной 4 мм, соединенных винтами. На нижнюю пластину наклеен нагреватель из константановой проволоки (толщина 0,3 мм) в шелковой изоляции. На нагреватель подается напряжение в 30 В от источника питания мощностью 15 Вт через широтно-импульсную модуляцию регулятора мощности, с помощью которого устанавливается температура тепловыделяющей поверхности.

В верхней пластине сделаны две выемки для измерительной и контрольной термопары. Измерительная медь–константановая (тип Т) термопара для увеличения чувствительности включает 3 последовательно соединенных термопары. Холодный спай термопары помещен в сосуд Дьюара, заполненного смесью льда и воды. Измерения электродвижущей силы (ЭДС) проводятся с помощью мультиметра. Образцовая термопара типа К подключается к прецизионному измерителю температуры Escort 20. С помощью этого изме-

рителя производится калибровка измерительной термопары. Для этого с помощью регулятора мощности устанавливается определенная температура и измеряется ЭДС термопары. Таким образом, устанавливается соответствие между ЭДС и температурой. Результат калибровки представлен в виде таблицы соответствия (табл. 1). Дальнейшие измерения производятся с помощью мультиметра.

Для целей эксперимента температура тепловыделяющего элемента задана в пределах 70 °С, поскольку с данного уровня начинается заметное обезвоживание биологических тканей и практически мгновенная необратимая коагуляция коллагена. Для эксперимента был выбран изотермический режим, для обеспечения которого выполнялась коррекция напряжения тока регулятором мощности по показаниям мультиметра (рис. 1). В целях безопасности поверхность термостолика перед экспериментом смазывалась силиконовым маслом, поскольку оно представляет собой отличный электрический изолятор и не является легко воспламеняющимся веществом. А такие его характеристики, как температура стабильности и хорошая теплопередача (теплопроводность приблизительно в 3,8 раза ниже, чем у воды), делают незаменимыми для эффекта «тёплой бани» за счет пленки, образовавшейся на рабочей плите установки. Это обеспечивало равномерный тепловой поток по всей площади гистологического образца и отсутствие эффекта «пригорания» (рис. 2).

Фрагмент для гистологического изучения был взят непосредственно после операции иссечения кисты. Общая масса удаленной кисты составила 5 г (рис. 3). На миллиметровой бумаге, путем обводки, фиксировали общую площадь кисты, после чего материал был разделен на 6 равных по размеру и массе фрагментов

толщиной, примерно 1,5 мм. Также путем обводки на миллиметровой бумаге определена площадь каждого фрагмента.

Один фрагмент (№ 1) был сразу помещен с 10%-ным раствором формалина для последующего гистологического исследования. Остальные 5 фрагментов кисты поочередно размещались на экспериментальном термостолике. При этом образец ориентировали синовиальным (внутренним) слоем вниз и для полного контакта с поверхностью столика с помощью пинцета выравнивали участки соприкосновения по плоскости. После заданного времени фрагмент незамедлительно удаляли с теплонесущей поверхности и помещали в предварительно маркированный флакон с 10%-ным раствором формалина.

Фрагменты стенки кисты Бейкера под номерами 2, 3, 4, 5 и 6 подвергали термическому воздействию 10, 20, 30, 40 и 60 с соответственно. При помощи пирометра Condrol IR-T1 (Китай) измеряли поверхностную температуру наружной поверхности образцов до нача-

Таблица 1
Соответствие показаний вольтметра (V) температуре в градусах Цельсия (T°C).

E (V)	T°C	E (V)	T°C
2	18	6,4	51
2,4	21	7	55
3	25	7,4	58
3,4	28	7,6	60
4	33	8	63
4,4	36	8,4	66
5	40	9	70
5,4	43	9,4	73
6	48	10	77

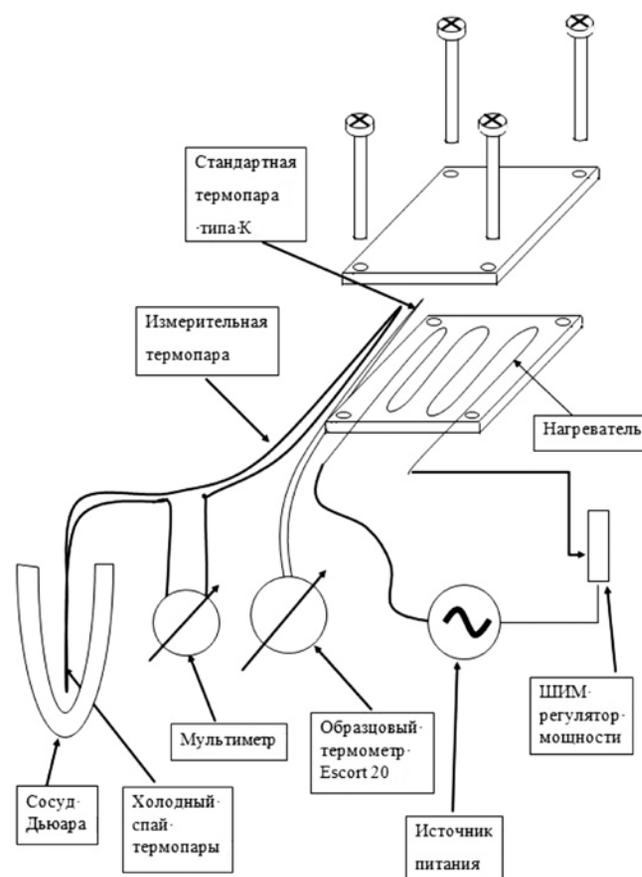


Рис. 1. Принципиальная схема сборки термостолика для эксперимента.

ла эксперимента и перед удалением ткани с нагревательного прибора после запланированного времени воздействия. Результаты метрических и физических измерений приведены в **табл. 2**.

По данным **табл. 2**, можно сделать заключение, что процесс термокоагуляции белковых молекул в определенный период идет с поглощением (при температуре 59 °С) скрытой теплоты, связанной с перестройкой коллагена. Это в дальнейшем было подтверждено гистологически.

Из каждого биоптата готовили по 3–4 среза толщиной 5–7 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином [7]. Для гистологической идентификации соединительной ткани использовали окраску препаратов по Ван Гизону [8]. После окрашивания микропрепараты исследовали в микроскопе LeicaDM 2500 с возможностью вывода изображения на монитор компьютера.

Результаты и обсуждение

При увеличении 1×100 в интактном фрагменте (№ 1) стенки кисты в синовиальной оболочке сохранялись признаки очаговой пролиферации. В подлежащей рыхлой соединительной ткани интактного фрагмента кисты Бейкера обнаруживалось полнокровие микроциркуляторного русла и очаговая периваскулярная инфильтрация лимфоидными элементами. В плотном слое зрелых коллагеновых волокон отмечались фокусы фрагментации волокнистых структур и участки мукоидного набухания.

В образцах стенки, подвергнутых термическому воздействию в течение 10 и 20 с, обнаруживались похожие структурные изменения (на уровне синовиальной оболочки) в виде пикноза и лизиса ядер синовиоцитов с развитием интерстициального отека в подлежащих структурах. В фрагментах стенки кисты с

Таблица 2

Результаты экспериментальных измерений фрагментов стенки кисты Бейкера.

Номер образца	Масса (г)	Площадь (см ²)	Толщина (мм)	t °С до начала эксперимента	t нагрева (с)	t °С поверхности образца после нагрева
1 контроль	0,7	2,9	1,5	24	-	-
2	0,9	4,6	1,5	24	10	54
3	1	6,57	1,5	24	20	58
4	0,9	4,21	1,5	24	30	59
5	0,8	3,93	1,5	24	40	59
6	0,7	3,17	1,5	24	60	59



Рис. 2. Экспериментальная установка в собранном виде.



Рис. 3. Макропрепарат иссеченной кисты Бейкера.

экспозицией термического воздействия 30, 40 и 60 с структурные трансформации были более выражены.

Отмечался очаговый некроз синовиального слоя в виде диффузной деструкции синовиоцитов. В подлежащих слоях развивался отек и разрыхление с фрагментацией коллагеновых волокон. Выраженность и глубина деструктивных изменений стенки кисты Бейкера находились в прямой зависимости от времени непрерывного нагрева. Но и в этих случаях деструктивные изменения не распространялись глубже поверхностных слоев кисты.

Термическая модификация патологически измененных соединительных тканей для стимуляции процессов лизиса и фиброза давно используется в медицине [9]. Однако, внедрение подобных процедур в клиническую практику зачастую опережает ее научное обоснование, и выбранные режимы и способы локального нагрева тканей оказываются подобными эмпирически. Это значительно снижает эффективность процедуры и увеличивает риски нежелательных явлений или даже ятрогений. Параметры гипертермии должны не только обеспечивать достижение целевого эффекта — денатурации основного структурного белка соединительной ткани — коллагена [10], но и минимизировать побочные эффекты, связанные с перегревом интактных перифокальных тканей.

На сегодняшний день наиболее изученным и динамически развивающимся направлением в амбулаторном хирургическом лечении с применением лазерного нагрева тканей является эндовенозная термооблитерация [4]. Конечной целью воздействия является гибель эндотелиального слоя и денатурация белковых компонентов стенки сосуда, нарушением структуры с последующим рубцеванием. Принимая во внимание, что внутренняя поверхность кисты Бейкера выстлана синовиоцитами и тоже имеет стенку из коллагеновой соединительной ткани [11] вполне законно предположить, что при эндокистозном воздействии лазера будет отмечаться такой же эффект, как и при лечении варикозно измененных вен нижних конечностей. Анализ доступной литературы продемонстрировал, что большинство работ, посвященных лазер-индуцированной внутритканевой термотерапии, исследуют лишь прямое воздействие лазерного излучения на ткани [5, 12, 13]. Общеизвестно, что необратимая денатурация коллагена начинается при его нагреве до 70 °С, что запускает каскад изменений [7], в виде лизиса соединительнотканых структур, в дальнейшем приводящих к фиброзу ткани.

Учитывая значительный размер кисты и толщину ее стенки, а также то, что в длительно существующем новообразовании имеется расширенная сосудистая сеть [14], контактное лазерное воздействие представляется малоэффективным. За прототип исследования

мы приняли труды авторов, в которых термическое воздействие на ткань образования реализовывалось, опосредовано, через теплоотдачу внутренней жидкостью, поглощающей световую энергию лазерного излучения. Рядом авторов этот механизм признается основным [4], в этом случае тепло распределяется равномерно и нагрев ткани происходит изнутри образования.

Безусловно, наш эксперимент обладает некоторой условностью. В частности, при выборе продолжительности процедуры не учитывается теплоотдача ткани кисты Бейкера в естественных условиях, вызванная региональным кровотоком. Но, на этом этапе нашей целью не являлся расчет необходимого времени воздействия для практических рекомендаций. Мы хотели получить первые эмпирические данные о зависимости гистоморфологических изменений от длительности теплового воздействия.

Таким образом, степень повреждения синовиальной оболочки, находится в прямой зависимости от длительности нагрева ткани. Предложенный нами термостенд позволяет проводить эксперименты с разными видами тканей и последующим изучением гистоморфологических изменений, вызванных действием повышенных температур.

Информация о вкладе каждого автора:

Чернядьев С.А., Аретинский А.В. — концепция и дизайн исследования;

Жиликов А.В., Коробова Н.Ю. — сбор и обработка материалов;

Сивкова Н.И. — анализ полученных данных, написание текста,

Горбатов В.И. — термодинамическое моделирование процессов коагуляции, консультирование.

Медведева С.Ю. — гистоморфологический анализ.

Литература

1. Тучин В.В. Основы взаимодействия низкоинтенсивного лазерного излучения с биотканями: дозиметрический и диагностический аспекты. *Известия Академии наук, серия физическая*. 1995; 59(6): 120-43.
2. Шумилова Н.А., Федотова Ю.С., Рябова М.А. Сравнение биологических эффектов контактного действия полупроводниковых лазеров с длиной волны 1470 и 810 нм в эксперименте. *Современные технологии в медицине*. 2014; 6(4): 62-7.
3. Чернядьев С. А., Жиликов А. В., Коробова Н. Ю. *Внутриполостная УЗИ-контролируемая лазерная облитерация кисты Бейкера*. Екатеринбург; УГМУ: 2016.
4. Чудновский В.М., Юсупов В.И., Дыдыкин А.В., Невожай В.И., Кисилёв А.Ю., Жуков С.А., Баграташвили В.Н. Лазероиндуцированное кипение биологических жидкостей в медицинских технологиях. *Квантовая электроника*. 2017; 47(4): 361-70.
5. Неворотин А.И. *Введение в лазерную хирургию: Учебное пособие*. СПб; СпецЛит: 2000.

6. Баграташвили В.Н., Баграташвили Н.В., Игнатьева Н.Ю., Лунин В.В., Гроховская Т.Е., Аверкиев С.В., Шах, Г.Ш. Структурные изменения в соединительных тканях при умеренном лазерном нагреве. *Квантовая электроника*. 2002; 32(10): 913-6.
7. Автандилов Г.Г. *Медицинская морфометрия: Руководство для врачей*. М.; 1990.
8. Ромейс Б. *Микроскопическая техника*. М.; Издательство иностранной литературы, 1954.
9. Баграташвили В.Н., Соболя Э.Н., Шехтер А.Б. *Лазерная инженерия хрящей*. М.; ФИЗМАТЛИТ, 2006.
10. Игнатьева Н.Ю. Захаркина О.Л., Лунин В.В., Сергеева Е.А., Мазайшвили К.В., Максимов С.В. Влияние иммобилизации венозной стенки на термическую деградацию коллагена. *Журнал физической химии*. 2013; 87(11): 1969.
11. Trăistaru R., Popescu R., Gruia C., Rogoveanu O. A complex assessment of patients with knee osteoarthritis and Baker's cyst: observational study. *Rom J Morphol Embryol*. 2013; 54(3): 593-601.
12. Arnoczky S.P., Aksan A. Thermal modification of connective tissues: basic science considerations and clinical implications. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2000; 8(5): 305-13.
13. Colin P., Nevoux P., Marqa M., Auger F. Focal laser interstitial thermotherapy (LITT) at 980 nm for prostate cancer: treatment feasibility in Dunning R3327-AT2 rat prostate tumour. *BJU international*. 2012; 109(3): 452-8.
14. Schoellnast H., Monette S., Ezell P.C., Keene A. Interstitial laser-induced thermotherapy of the lung: evaluation of the influence of ablation continuity on ablation size in a swine model. *Cancer Imaging*. 2013; 13(1): 8.
3. Chernyad'ev S.A., Zhilyakov A.V., Korobova N.Yu. *Intracavitary ultrasound-controlled laser obliteration of Baker's cyst [Vnutripolostnaja UZI-kontroliruemaja lazernaja obliteracija kisty Bejkera]*. Ekaterinburg; UGMU: 2016. (in Russian)
4. Chudnovskij V.M., Jusupov V.I., Dydykin A.V., Nevozhaj V.I., Kisil'ov A.Ju., Zhukov S.A., Bagratashvili V.N. Laser-induced boiling of biological fluids in medical technology. *Kvantovaya jelektronika*. 2017; 47(4): 361-370. (in Russian)
5. Nevorotin A.I. *Introduction to laser surgery: study guide. [Vvedenie v lazernuju hirurgiju: Uchebnoe posobie]*. SPb; SpecLit: 2000. (in Russian)
6. Bagratashvili V.N., Bagratashvili N.V., Ignat'eva N.Ju., Lunin V.V., Grohovskaja T.E., Averk'iev S.V., Shah, G.Sh. Structural changes in connective tissues with moderate laser heating. *Kvantovaya jelektronika*. 2002; 32(10): 913-916. (in Russian)
7. Avtandilov G.G. *Medical morphometry: a guide for physicians [Meditsinskaya morfometriya: Rukovodstvo dlya vrachej]*. Moscow; 1990. (in Russian)
8. Romeys B. *Microscopic technique. [Mikroskopicheskaya tehnika]*. Moskva; Izdatel'stvo inostrannoy literatury: 1954. (in Russian)
9. Bagratashvili V.N., Sobolya Ye.N., Shehter A.B. *Laser Engineering Cartilage. [Lazernaya inzheneriya hryashhey]*. Moscow; FIZMATLIT, 2006. (in Russian)
10. Ignat'eva N.Yu. Zaharkina O.L., Lunin V.V., Sergeeva E.A., Mazayshvili K.V., Maksimov S.V. Effect of immobilization of the venous wall on the thermal degradation of collagen. *Zhurnal fizicheskoy khimii*. 2013; 87(11): 1969. (in Russian)
11. Trăistaru R., Popescu R., Gruia C., Rogoveanu O. A complex assessment of patients with knee osteoarthritis and Baker's cyst: observational study. *Rom J Morphol Embryol*. 2013; 54(3): 593-601.
12. Arnoczky S.P., Aksan A. Thermal modification of connective tissues: basic science considerations and clinical implications. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2000; 8(5): 305-13.
13. Colin P., Nevoux P., Marqa M., Auger F. Focal laser interstitial thermotherapy (LITT) at 980 nm for prostate cancer: treatment feasibility in Dunning R3327-AT2 rat prostate tumour. *BJU international*. 2012; 109(3): 452-8.
14. Schoellnast H., Monette S., Ezell P.C., Keene A. Interstitial laser-induced thermotherapy of the lung: evaluation of the influence of ablation continuity on ablation size in a swine model. *Cancer Imaging*. 2013; 13(1): 8.

References

1. Tuchin V.V. Fundamentals of the interaction of low-intensity laser radiation with biological tissues: dosimetric and diagnostic aspects. *Izvestiya Akademii nauk, seriya fizicheskaya*. 1995; 59(6): 120-43. (in Russian)
2. Shumilova N.A., Fedotova Ju.S., Rjabova M.A. Comparison of biological effects of contact action of semiconductor lasers with a wavelength of 1470 and 810 nm in the experiment. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2014; 6(4): 62-7. (in Russian)

Сведения об авторах:

Чернядьев Сергей Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. хирургических болезней ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет»;

Аретинский Виталий Борисович, гл. врач, засл. работник здравоохранения РФ, проф. УГМА, доктор мед. наук, ГАУЗ СО «Областной специализированный центр медицинской реабилитации «Озеро Чусовское»;

Сивкова Надежда Ивановна, канд. социол. наук, доцент каф. социально-политических наук, ФГАОУ ВПО «УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина»;

Коробова Наталья Юрьевна, канд. мед. наук, хирург-флеболог, ассистент каф. хирургических болезней ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Жиляков Андрей Викторович, канд. мед. наук, хирург-артролог, Генеральный директор ООО «Новые технологии для амбулаторной медицины» (ООО «НОТАМЕД»);

Медведева Светлана Юрьевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. морфологии и биохимии ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН;

Горбатов Владимир Иванович, канд. физ.-мат. наук, доцент каф. физики, ФГБОУ ВО «Уральский государственный горный университет».

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Арзуманян В.Г.¹, Иксанова А.М.¹, Артемьева Т.А.¹, Бутовченко Л.М.¹, Мальбахова Е.Т.²

Экспериментальная модель лечения вагинальных дисбиозов с помощью фракции сывороточных антимикробных пептидов

¹ФГБНУ НИИ Вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова,
105064, г. Москва, Россия, Малый Казённый переулоч, д. 5-а;

²Клиника репродукции и генетики NGC,
107140, г. Москва, Россия, ул. Верхняя Красносельская, д. 3, стр. 3

Широкое использование антибиотиков и противогрибковых препаратов при лечении дисбиозов влагалища сопровождается появлением резистентных штаммов микроорганизмов. В этой связи актуальной является разработка новых препаратов, в частности, основанных на натуральных антимикробных пептидах (АМП), отличающихся более широким спектром действия и высокой активностью. Цель работы – изучение возможности использования сывороточных АМП в лечении вагинальных дисбиозов различной этиологии на мышинной модели. **Методика.** Активность АМП фракции сыворотки крови кролика оценивали в опытах *in vitro* и *in vivo*. В первом случае проверяли действие АМП на клетки *Candida albicans*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* спектрофотометрическим методом. Данный метод основан на поглощении красителя бромкрезолового пурпурного клетками с нарушенной цитоплазматической мембраной и, как результат, снижении оптической плотности надосадочной жидкости в опытных вариантах по сравнению с контрольными. Во втором случае оценивали лечебный эффект концентрированного препарата сывороточных АМП на мышах, зараженных интравагинально теми же культурами. После заражения мышей пролечивали введением препарата тем же путем, а результат оценивали методом высевов из влагалища на селективные среды. **Результаты.** Установлено, что наиболее выраженное действие в опытах *in vitro* сывороточные АМП оказывали на клетки *C. albicans* (активность составила 32,9 % от контроля), тогда как менее выраженный эффект имел место в отношении *E. coli* (23,3 %) и *S. aureus* (14,4 %). Аналогичная закономерность имела место и в опытах *in vivo*: высев *C. albicans* после лечения препаратом АМП составил 44,6% от исходного в сравнении с 42,2% после лечения пимафуцином и 90,2% без лечения (плацебо); высев *E. coli* — 65,6% от исходного в сравнении с 26,3% после лечения метронидазолом и 94,8% в варианте плацебо; высев *S. aureus* — 76,9% от исходного в сравнении с 11,4% после лечения клиндамицином и 73,0% в варианте плацебо. **Заключение.** Наибольшей чувствительностью к сывороточным АМП среди изученных видов обладали клетки *C. albicans*, а наименьшей — *S. aureus*, причем как в опытах *in vitro*, так и *in vivo*. Препарат на основе АМП фракции сыворотки крови можно рассматривать как альтернативу традиционным препаратам при лечении вагинальных дисбиозов, особенно вульвовагинального кандидоза.

Ключевые слова: дисбиоз влагалища, вульвовагинальный кандидоз, бактериальный вагиноз, мышинная модель, антимикробные пептиды

Для цитирования: Арзуманян В.Г., Иксанова А.М., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Мальбахова Е.Т. Экспериментальная модель лечения вагинальных дисбиозов с помощью фракции сывороточных антимикробных пептидов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(3): 141-147.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.141-147

Для корреспонденции: Арзуманян Вера Георгиевна, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. физиологии грибов и бактерий ФГБНУ «НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», E-mail: veraar@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования НИР ФГБНУ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи нигде ранее не публиковались.

Поступила 15.03.2019

Arzumanyan V.G.¹, Iksanova A.M.¹, Artemyeva T.A.¹, Butovchenko L.M.¹, Malbakhova Ye.T.²

Experimental model of vaginal dysbiosis treatment with fraction of serum antimicrobial peptides

¹Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera,
Moscow, 105064, Malyi Kazennyi per., 5-a;

²Clinic of reproductology and genetics NGC,
Moscow, 107140, Verkhniaya Krasnoselskaya ul., 3, 3

Extensive use of antibiotics and antimycotics in the treatment of vaginal dysbiosis may result in emergence of resistant microbial strains. Therefore, development of new, broad-spectrum and highly active drugs, particularly based on antimicrobial peptides

(AMP) is relevant. **The aim** of the present study was to evaluate a possibility of using serum AMP in the treatment of vaginal dysbiosis of different etiology on a murine model. **Methods.** Activity of the AMP fraction of rabbit serum was evaluated in *in vitro* and *in vivo* experiments. In the *in vitro* experiment, the effect of AMP on *Candida albicans*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* cells was measured spectrophotometrically. This method was based on uptake of the bromocresol purple stain by cytoplasmic membranes of destroyed cells, which resulted in decreased optical density of the supernatant in experimental variants compared to the control. In the *in vivo* experiments, the therapeutic effect of concentrated serum AMP was evaluated in mice intravaginally infected with the same microbial cultures. The infected mice were treated similarly with the AMP preparation, and the outcome was evaluated using the inoculation of plates with selective media by vaginal material. **Results.** The serum AMP fraction exerted the most noticeable effect in *in vitro* experiments on *C. albicans* cells (activity 32.9 % of control) vs. lower effects on *E. coli* (23.3 %) and *S. aureus* (14.4 %). Consistently in the *in vivo* experiments, the abundance of *C. albicans* colonies was 44.6% of the initial value after the AMP drug treatment compared to 42.2% after the pimafucin treatment and 90.2% in placebo. The abundance of *E. coli* colonies after the AMP drug treatment was 65.6% of the initial compared to 26.3% after the metronidazole treatment and 94.8% in placebo; for *S. aureus*, the abundance was 76.9% (AMP) compared to 11.4% (clindamycin) and 73.0% (placebo). **Conclusion.** Among the studied microorganisms, *C. albicans* had the highest susceptibility to serum AMP while *S. aureus* was the least susceptible both in *in vitro* and *in vivo* experiments. Drugs based on the serum AMP preparation may be considered as a possible alternative to traditional medications for the treatment of vaginal dysbiosis, especially for vulvovaginal candidiasis.

Keywords: vaginal dysbiosis, vulvovaginal candidiasis, bacterial vaginosis, murine model, antimicrobial peptides.

For citation: Arzumanyan V.G., Iksanova A.M., Artemyeva T.A., Butovchenko L.M., Malbakhova Y.T. Experimental model for treatment of vaginal dysbiosis with a fraction of serum antimicrobial peptides. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 141-147. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.141-147

For correspondence: Arzumanyan Vera G., Ph.D., Professor, Head of laboratory of fungal and bacterial physiology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, E-mail: veraar@mail.ru

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

Information about authors:

Arzumanyan V.G. <https://orcid.org/0000-0001-9769-1634>

Received 15.03.2019

Введение

Дисбиоз влагалища характеризуется нарушением микробиологического равновесия в данном локусе, сопровождающегося, с одной стороны, снижением численности нормобиоты (лакто- и бифидобактерий), а с другой стороны увеличением обсемененности условно-патогенными микроорганизмами. Различают дисбиоз, вызванный грибами рода *Candida* (чаще всего *C. albicans*), так называемый вульвовагинальный кандидоз (ВВК) [1], и бактериальный вагиноз (БВ), при котором этиологическими агентами часто являются бактерии *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* [2]. Доступность и бесконтрольный прием лекарственных препаратов против ВВК и БВ привели к росту заболеваемости и формированию устойчивых штаммов этиологически значимых микроорганизмов.

Естественной преградой на пути распространения условно-патогенной микробиоты влагалища являются фагоцитирующие клетки, иммуноглобулины и антимикробные пептиды/полипептиды (АМП), называемые также эндогенными антибиотиками [3]. В защите данного локуса принимают участие кальпротектин [4], лизоцим [4], лактоферрин [5], псориазин [6], дефензины [4], секреторный ингибитор лейкопротеазы [4], катели-

цидин [4], липокалин [7] и РНКаза [8], причем концентрации первых четырех здесь наиболее высоки ($10^4 - 10^5$ нг/мл). Несмотря на структурное разнообразие механизмов действия АМП в вагинальном секрете, их действие приводит к единому результату – деструкции цитоплазматической мембраны микроорганизмов [9]. На этом свойстве АМП основан разработанный нами ранее метод оценки их суммарной активности¹. С помощью данного метода было показано, что при ВВК и БВ имело место значительное снижение антимикробной активности вагинального секрета по сравнению с контрольными группами женщин [10, 11].

На основе представлений о структуре и функции АМП разрабатываются новые противомикробные препараты [12]. Синтетические и рекомбинантные аналоги АМП находятся в стадии фармацевтических исследований, включая клинические испытания I – III фазы. Недавно нами проведена оценка синтетического аналога кателицидина на модели мышинного ВВК и показана его эффективность [13]. Другим подходом к ре-

¹ Арзуманян В.Г., Мальбахова Е.Т., Фошина Е.П. и др. Способ определения совокупной активности антимикробных пептидов как маркера состояния местного иммунитета различных эпителиальных тканей. Патент 2602298, РФ; 2015.

шению этой задачи может быть получение комплекса АМП из естественных источников.

Цель исследования – оценка антимикробной активности комплекса натуральных сывороточных АМП в экспериментах *in vitro* и *in vivo* на мышинной модели дисбиозов влагалища.

Методика

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали дрожжи *Candida albicans* № 927 из коллекции НИИВС им. Мечникова, а также бактерии *Escherichia coli* М-17, *Staphylococcus aureus* Wood 46. Микроорганизмы для экспериментов *in vitro* и *in vivo* поддерживали путем периодических пересевов при температуре 28 °С, используя экспоненциально растущие культуры. Дрожжи культивировали на плотной глюкозо-пептон-дрожжевой среде (ГПД); *S. aureus* на агаре ГРМ 10, *E. coli* на агаре Питательном.

Животные. 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 ФГБНУ НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. Эксперименты проводили на самках белых беспородных мышей в возрасте 8 нед массой 18–20 г из питомника «Андреевка» Центрального питомника РАН «Светлые Горы». Животные акклиматизировались к новым условиям содержания в течение 7 сут до начала экспериментов. Группы мышей сформированы из расчета 12 животных в каждой группе. В течение эксперимента состояние мышей регистрировали 1 раз в сутки. Запланированную эвтаназию осуществляли с помощью CO₂ (вторичный способ эвтаназии согласно требованиям Этического Комитета) спустя 5 нед после начала экспериментов. Для получения сывороточной фракции АМП использовали 4 кроликов Шиншилла массой 2 кг, полученных из того же питомника.

Получение препарата сывороточных АМП. Сыворотку от 4 кроликов центрифугировали 5 мин со скоростью 10 000 g и полученный супернатант фильтровали через молекулярный фильтр «Amicon» (Merck, Германия) с диаметром пор 100 кДа на центрифуге в течение 15 мин при 16 000 g. Фильтрат лиофильно высушивали и использовали для приготовления лечебных гелей. Гели, содержащие исследуемый препарат АМП, готовили непосредственно перед введением его мышам. Навеску вещества растворяли в заранее подготовленном 0,7% водном геле агара до 15-кратной

концентрации по отношению к исходному фильтрату (далее именуем эту субстанцию «препарат»).

Модель вульвовагинального дисбиоза. Моделирование ВВК мышей проводили по методу Фиделя [14] в собственной модификации. Для этого предварительную эстрогенизацию животных проводили путем втирания эстрадиола в кожу брюшка, вместо подкожного введения. В ходе эксперимента мышей эстрогенизировали трижды (табл. 1) путем втирания 200 мг трансдермального геля «Эстрогель» (Бельгия), что соответствует примерно 0,125 мкг эстрогена. В случае моделирования вульвовагинального кандидоза мышей заражали путем однократного интравагинального введения 20 мкл суспензии клеток дрожжей *C. albicans* в физиологическом растворе в концентрации 10⁶ КОЕ/мл. Лечение животных препаратами проводили путем 5 кратного ежедневного интравагинального введения гелей, содержащих АМП, в объеме 20 мкл. Препаратом сравнения являлся 2% вагинальный крем «Пимафуцин» (Астеллас, Нидерланды), лечение которым проводили по той же схеме, объем пробы 20 мкл. В вариантах плацебо использовали только 0,7% гели агара. Моделирование БВ проводили аналогично, заражая мышей культурами *E. coli* и *S. aureus* в концентрации 10⁸ клеток/мл. Лечение БВ, вызванного стафилококком, проводили с помощью 2% вагинального крема «Клиндамицин» (Акрихин, Россия), а эшерихиями – 2% кремом «Метронидазол» (Вертекс, Россия).

Таблица 1

Схема опытов с мышами по суткам

Сутки эксперимента	Манипуляции
1	Первая эстрогенизация
5	Вторая эстрогенизация
6	Заражение
7	Третья эстрогенизация
12	I высев
13	Первый день лечения + учет результатов высева
14	Второй день лечения
15	Третий день лечения
16	Четвертый день лечения
17	Пятый день лечения
19	II высев
20	Учет результатов второго высева
27	III высев
28	Учет результатов третьего высева

Материал для посева собирали путем трехкратного интравагинального введения животным стерильной одноразовой микробиологической петли диаметром 1 мм, двукратного прокручивания её и суспендирования содержимого петли в 200 мкл стерильного физраствора в пробирке Эппендорф. Из каждой пробирки производили высевы по 10 мкл на чашки Петри с агаризованной средой. Чашки инкубировали 1 сут при 32 °С, после чего учитывали выросшие колонии. Результаты первого посева принимали за 100 процентов и по отношению к ним рассчитывали результаты последующих высевов.

Определение антимикробной активности кроличьих сывороток. Общую активность сывороток определяли, соединяя 300 мкл нативной сыворотки в пробирках типа Эппендорф с 50 мкл суспензии дрожжей *S. albicans* № 927 в концентрации 10¹⁰ КОЕ/мл либо суспензии бактерий в концентрации 10¹² КОЕ/мл. Для определения активности АМП фракции сыворотки фильтровали через молекулярный фильтр «Amicon» (Merck, Германия) с диаметром пор 100 кДа на центрифуге в течение 15 мин при 16 000 g, после чего 300 мкл фильтрата также соединяли с 50 мкл суспензии микроорганизмов. Контрольная пробирка вместо фильтрата содержала 300 мкл физраствора. Пробирки инкубировали 2 ч при 32 градусах на шейкере, затем центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин, супернатанты удаляли, а к осадкам добавляли по 300 мкл раствора бромкрезолового пурпурного в фосфатном буфере pH 4,6. После этого пробирки инкубировали еще 45 мин при 32 °С на шейкере и центрифугировали 5 мин при 10 000 g. По 50 мкл супернатантов соединяли с 2,5 мл фосфатного буфера pH 4,6; оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре «Genesys 10S UV-Vis» (США) при длине волны 440 нм; из 3 измерений для каждой пробы вычисляли среднее значение оптической плотности. Расчет активности производили по формуле:

$$A = (OP_{\text{контр.}} - OP_{\text{опыт.}}) * 100 / OP_{\text{контр.}}$$

где $OP_{\text{контр.}}$ — это оптическая плотность смеси из контрольной пробирки; $OP_{\text{опыт.}}$ — это оптическая плотность опытного образца.

Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel. Расчёт коэффициентов Манна–Уитни, свидетельствующих о наличии/отсутствии значимости различий между показателями, проводили с помощью автоматической программы [15].

Результаты и обсуждение

Эксперименты подразделялись на исследования *in vitro* и *in vivo*. Первые представляют собой оценку противомикробной активности фракций кроличьей сыворотки против основных видов условно патогенных ми-

кроорганизмов, сопутствующих вагинальному дисбиозу, *in vivo* — касаются оценки активности фракции сывороточных АМП кролика, используемой для лечения искусственно воспроизведенных дисбиозов влагалища у мышей. Противомикробная активность цельной сыворотки складывается из активности белков комплемента, иммуноглобулинов и АМП. Фильтрация через мембрану с диаметром пор 100 кДа приводит к устранению более высокомолекулярных компонентов, а именно белков комплемента (мол. масса большинства из них выше 100 кДа) и иммуноглобулинов (150—500 кДа).

Из данных табл. 2 видно, что общая активность кроличьих сывороток по отношению к разным видам микробов (I столбец) варьировала: максимальной чувствительностью к компонентам сывороток обладала культура дрожжевых грибов. Статистический анализ данных показал, что различия между активностью против *S. albicans* и *E. coli* были статистически значимы (табл. 2); тогда как между *S. albicans* и *S. aureus*, а также между *S. aureus* и *E. coli* не значимы. При сравнении активности сывороточных АМП по отношению к изученным видам микроорганизмов установлено, что наибольшая чувствительность выявлена у дрожжей *S. albicans*, наименьшая — *S. aureus*. Различия в активности сывороточных АМП по отношению к *S. aureus* и *E. coli* статистически значимы: $0,01 \leq p \leq 0,05$. На рис. 1 представлено влияние фракции сывороточных АМП кролика на клетки *Candida albicans* № 927: контрольный образец состоит в основном из живых клеток (рис. 1, А), тогда как в образце, обработанном препаратом АМП, клетки в основном погибли (рис. 1, Б).

Мышиная модель вагинального дисбиоза включала эстрогенизацию животных, однократное заражение, пятикратное интравагинальное лечение в течение 5 сут препаратом сывороточных АМП и трехкратные высевы — 1 до начала лечения и 2 через 1 и 2 нед от начала лечения (табл. 1). Результаты этих экспериментов представлены на рис. 2 и в табл. 3. Очевидно, что наиболее выраженным действием препарат АМП обладает против *S. Albicans* результаты II посева аналогичны таковым в варианте с традиционным для ВВК препаратом — пимафуцином (рис. 2, А). Менее выраженный эффект проявлял препарат АМП в отношении *E. coli* — результаты II посева были лучше, чем в варианте плацебо, но хуже, чем после лечения традиционным препаратом «Метронидазол» (рис. 2, Б). Следует отметить однако, что различия между вариантами плацебо и лечения препаратом АМП нивелируются к III высеву. Такие выводы подтверждаются данными табл. 3, в которой представлены коэффициенты Манна-Уитни, характеризующие

ющие значимость различий между вариантами. Наконец лечение препаратом АМП вагинального дисбиоза, вызванного *S. aureus* не дало никакого эффекта – II высев оказался на уровне варианта плацебо (рис. 2, В, табл. 3). Сравнение результатов *in vitro* (табл. 2, III столбец) и *in vivo* (II высев) показало наличие обратной корреляции высокой силы: коэффициент Пирсона $r = -0,984$. Другими словами, чем выше активность препарата АМП по отношению к микроорганизмам *in vitro*, тем эффективнее лечение *in vivo*.

Различия в величинах активности препарата АМП по отношению к разным видам микроорганизмов связаны, в первую очередь, с различиями в структуре их клеточной стенки и цитоплазматической мембраны [16]. Наиболее яркие различия у представленных здесь микроорганизмов заключаются именно в составе и строении клеточных стенок – это хитин, β -глюканы и маннопротеины эукариот *C. albicans*, пептидогликан грамположительных прокариот *S. aureus* и липополисахариды грамотрицательных прокариот *E. coli*. Есть данные о большем

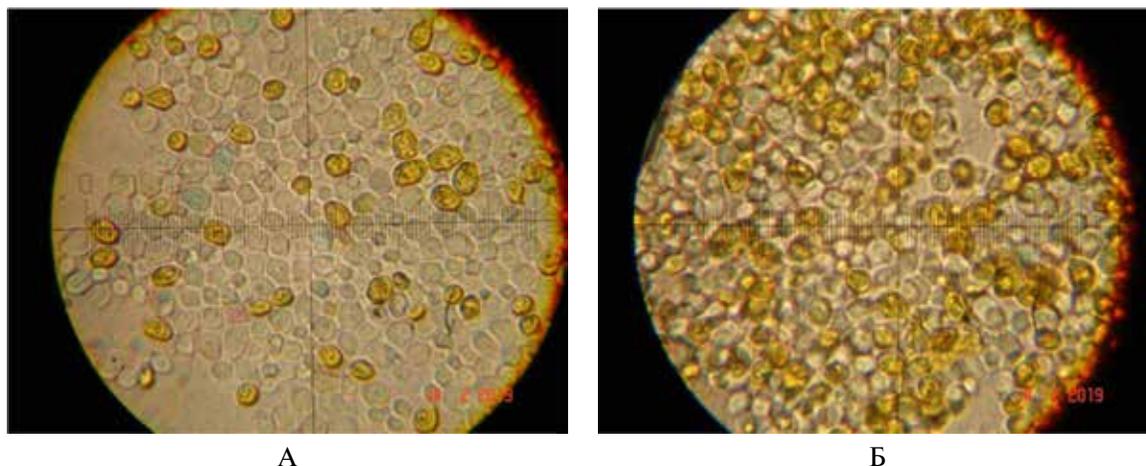


Рис. 1. Клетки *Candida albicans* до (А) и после (Б) обработки фракцией сывороточных АМП. Белые клетки – живые, желтые – мертвые. Увеличение микроскопа $\times 1750$; 1 деление на линейке = 1 мкм; окрашивание бромкрезоловым пурпурным.

Таблица 2

Оценка антимикробной активности фракций кроличьей сыворотки по отношению разным видам микроорганизмов в опытах *in vitro*.

Род, вид и номер штамма использованных микроорганизмов	Общая антимикробная активность сыворотки, % (ср. знач. \pm ср. откл.)	Активность фракции сывороточных антимикробных пептидов, % (ср. знач. \pm ср. откл.)
<i>Candida albicans</i> № 927	84,0 \pm 0,8	32,9 \pm 2,0*
<i>Escherichia coli</i> М-17	61,8 \pm 3,9	23,3 \pm 2,1*
<i>Staphylococcus aureus</i> Wood 46	68,0 \pm 7,9	14,4 \pm 3,3

Примечание. * – статистически значимые различия между *Candida albicans* и *Escherichia coli*. $p < 0,01$

Таблица 3

Оценка значимости различий данных в антимикробной активности препарата фракции антимикробных пептидов из кроличьей сыворотки по отношению разным видам микроорганизмов в опытах *in vivo* на мышинной модели вагинального дисбиоза

Этиологический инфекционный агент	Значимость различий между средним числом колоний в вагинальных высевах в различных вариантах экспериментов			
	2-й высев		3-й высев	
	Плацебо/АМП	Плацебо/традиционный препарат	Плацебо/АМП	Плацебо/традиционный препарат
<i>Candida albicans</i> № 927	0,01 < p < 0,05	0,01 < p < 0,05	p \geq 0,05	p \geq 0,05
<i>Escherichia coli</i> М-17	0,01 < p < 0,05	p \leq 0,01	p \geq 0,05	p \geq 0,05
<i>Staphylococcus aureus</i> Wood 46	p \geq 0,05	p \leq 0,01	p \geq 0,05	p \geq 0,05

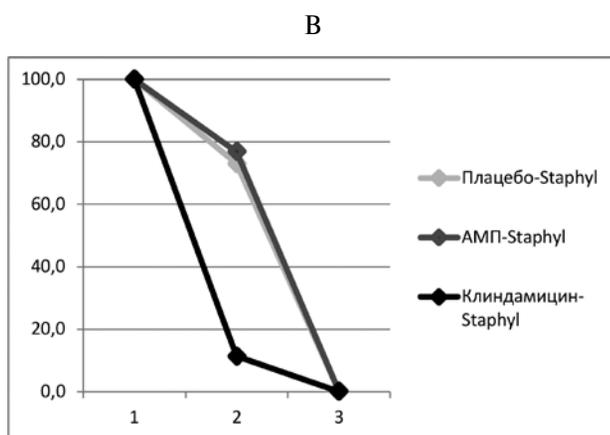
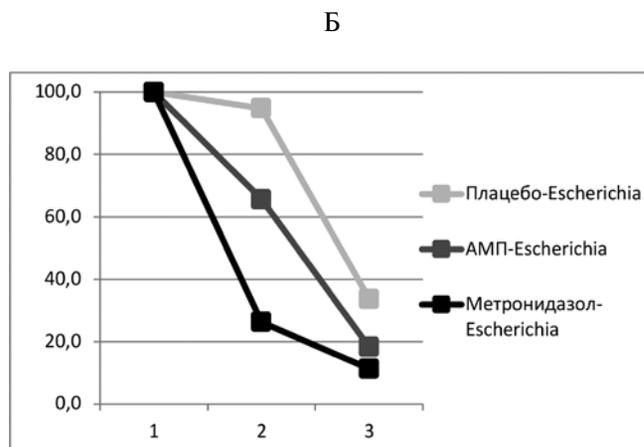
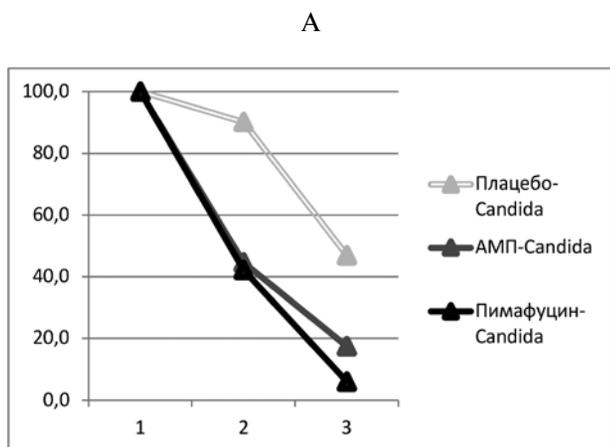


Рис. 2. Высеваемость условно-патогенных микроорганизмов из влаги мышей в процессе лечения традиционными препаратами и фракцией сывороточных АМП.

Абсцисса — 1, 2 и 3 высевы; по оси ординат – среднее число колоний в процентах от исходного (т.е. от среднего числа колоний в первом высеве); А – результаты по опытам с заражением мышей клетками *C. albicans* и лечением: светлая кривая – без заражения (плацебо); серая кривая – заражение *C. albicans* с последующим лечением сывороточными АМП; черная кривая – заражение *C. albicans* с последующим лечением пимафуцином; Б – результаты по опытам с заражением мышей клетками *E. coli* и лечением: светлая кривая – без заражения (плацебо); серая кривая – заражение *E. coli* с последующим лечением сывороточными АМП; черная кривая – заражение *E. coli* с последующим лечением метронидазолом; В – результаты по опытам с заражением мышей клетками *S. aureus* и лечением: светлая кривая – без заражения (плацебо); серая кривая – заражение *S. aureus* с последующим лечением сывороточными АМП; черная кривая – заражение *S. aureus* с последующим лечением клиндамицином.

сродстве некоторых АМП к конкретным полисахаридам и хитину, однако, они касаются пока только АМП, выделенных от насекомых или синтезированных [16]. Кроме того, разные классы микроорганизмов обладают различными механизмами устойчивости к АМП. Например, есть данные о защите клеток стафилококков с помощью адгезина, выделяемого на поверхности клеток этими микроорганизмами [17]. Адгезин как положительно заряженный полимер может формировать отталкивающий барьер против положительно заряженных АМП. Несмотря на наличие различных механизмов устойчивости микроорганизмов к АМП, они не так многообразны и эффективны, как по отношению к антибиотикам, поскольку липидный бислой микробной мембраны не обеспечивает значительной устойчивости против заряженных молекул АМП. Данные, полученные в настоящем исследовании, подтверждают наличие специфичности АМП против разных видов микроорганизмов. Какие именно АМП обеспечивают эту специфичность, покажут дальнейшие исследования, однако, количественные данные, касающиеся устойчивости разных

классов микроорганизмов к сывороточным АМП получены впервые в данном исследовании.

Заключение

Предложена и доказана впервые возможность использования комплекса сывороточных АМП в качестве лекарственного препарата в лечении дисбиозов влаги.

Литература

1. Мальбахова Е.Т., Арзуманян В.Г. Современный взгляд на проблему диагностики и лечения вульвовагинального кандидоза. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2015; 2: 111-5.
2. Ghiasi M., Fazaeli H., Kalhor N., Sheykh-Hasan M., Tabatabaei-Qomi R. Assessing the prevalence of bacterial vaginosis among infertile women of Qom city. *Iran. J. Microbiol.* 2014; 6(6): 404–8.
3. Арзуманян В.Г., Мальбахова Е.Т., Комиссарова Л.М. Антимикробные пептиды как факторы местного иммунитета при вульвовагинальном кандидозе. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2008; 4: 46-9.
4. Valore E.V., Park C., Igtre S.L., Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. *J. Obstet. Gynecol.* 2002; 187: 561-8.

5. Valore E.V., Wiley D.J., Ganz T. Reversible deficiency of antimicrobial polypeptides in bacterial vaginosis. *Infection and Immunity*. 2006; 74(10): 5693-702.
6. Mildner M., Stichenwirth M., Abtin A., Tschachler E. Psoriasis (S100A7) is a major Escherichia coli-cidal factor of the female genital tract. *Mucosal Immunology*. 2010; 3(6): 602-9.
7. Beghini J., Giraldo P.C., Linhares I.M., Ledger W.J., Witkin S.S. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Concentration in Vaginal Fluid: Relation to Bacterial Vaginosis and Vulvovaginal Candidiasis. *Reprod Sci*. 2015; 22(8): 964-8.
8. Koczera P., Martin L., Marx G., Schuerholz T. The Ribonuclease A Superfamily in Humans: Canonical RNases as the Buttress of Innate Immunity. *Int. J. Mol. Sci*. 2016; 17(8): 1278.
9. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2002; 66: 236-48.
10. Арзуманян В.Г., Мальбахова Е.Т., Комиссарова Л.М., Сердюк О.А., Касабулатов Н.М. Местный противогрибковый иммунитет при вульвовагинальном кандидозе у беременных. *Акушерство и гинекология*. 2008; 6: 23-6.
11. Карапетян Т.Э., Арзуманян В.Г., Мальбахова Е.Т., Комиссарова Л.М., Сердюк О.А., Румянцева Л.В. Бактериальный вагиноз и местная антимикробная активность у беременных. *Акушерство и гинекология*. 2010; 1: 57-9.
12. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*. 2000; 1: 141-50.
13. Тренин А.С., Арзуманян В.Г., Жмак М.Н., Шелухина И.В., Макарова Я.В., Иванов И.А. и др. Синтез и изучение антимикробной активности нового лекарственного средства на основе аналога кателицидина — полипептида SE-33. *Биоорганическая химия*. 2019; 45(2): 1-13.
14. Fidel P. L. Jr., Sobel J. D. Murine models of Candida vaginal infections. In: Zak O., Sande M., eds. *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. 2nd ed. London, United Kingdom: Academic Press Ltd.; 1999: 741-48.
15. Математические методы обработки данных (он-лайн расчёт) (источник: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html>)
16. Bahar A.A., Ren D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*. 2013; 6: 1543-75.
17. Vuong C., Voyich J.M., Fischer E.R., Braughton K.R., Whitney A.R., DeLeo F.R., et al. Polysaccharide intercellular adhesion (pia) protects Staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol*. 2004; 6: 269-75.
2. Ghiasi M., Fazaeli H., Kalhor N., Sheykh-Hasan M., Tabatabaei-Qomi R. Assessing the prevalence of bacterial vaginosis among infertile women of Qom city. *Iran. J. Microbiol*. 2014; 6(6): 404-8.
3. Arzumanyan V.G., Malbakhova Ye.T., Komissarova L.M. Antimicrobial peptides as local immunity factors in vulvovaginal candidiasis. *Epidemiologia I infeksionnye bolezni*. 2008; 4: 46-9. (in Russian)
4. Valore E.V., Park C., Igreti S.L., Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. *J. Obstet. Gynecol.* 2002; 187: 561-8.
5. Valore E.V., Wiley D.J., Ganz T. Reversible deficiency of antimicrobial polypeptides in bacterial vaginosis. *Infection and Immunity*. 2006; 74(10): 5693-702.
6. Mildner M., Stichenwirth M., Abtin A., Tschachler E. Psoriasis (S100A7) is a major Escherichia coli-cidal factor of the female genital tract. *Mucosal Immunology*. 2010; 3(6): 602-9.
7. Beghini J., Giraldo P.C., Linhares I.M., Ledger W.J., Witkin S.S. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Concentration in Vaginal Fluid: Relation to Bacterial Vaginosis and Vulvovaginal Candidiasis. *Reprod Sci*. 2015; 22(8): 964-8.
8. Koczera P., Martin L., Marx G., Schuerholz T. The Ribonuclease A Superfamily in Humans: Canonical RNases as the Buttress of Innate Immunity. *Int. J. Mol. Sci*. 2016; 17(8): 1278. doi: 10.3390/ijms17081278
9. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2002; 66: 236-48.
10. Arzumanyan V.G., Malbakhova Ye.T., Komissarova L.M., Serdyuk O.A., Kasabulatov N.M. Local antifungal immunity in pregnant women with vulvovaginal candidiasis. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2008; 6: 23-6. (in Russian)
11. Karapetyan T.E., Arzumanyan V.G., Komissarova L.M., Malbakhova Ye.T., Serdyuk O.A., Romyantseva L.V. Bacterial vaginosis and local antimicrobial activity in pregnant women. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2010; 1: 57-9 (in Russian)
12. als R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*. 2000; 1: 141-50.
13. Trenin A.S., Arzumanyan V.G., Zshmak M.N., Shelukhina I.V., Makarova Y.V., Ivanov I.A. et al. Synthesis and study of antimicrobial activity of new drug based on the analogue of cathelicidine — SE-33. *Biorganicheskaya khimiya*. 2019; 45(2): 1-13. (in Russian)
14. Fidel P. L. Jr., Sobel J. D. Murine models of Candida vaginal infections. In: Zak O., Sande M., eds. *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. 2nd ed. London, United Kingdom: Academic Press Ltd.; 1999: 741-48.
15. Mathematic methods of data processing (on-line calculation) (from: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html>)
16. Bahar A.A., Ren D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*. 2013; 6: 1543-75.
17. Vuong C., Voyich J.M., Fischer E.R., Braughton K.R., Whitney A.R., DeLeo F.R., et al. Polysaccharide intercellular adhesion (pia) protects Staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol*. 2004; 6: 269-75.

References

1. Malbakhova Ye.T., Arzumanyan V.G. Current concept of the diagnostics and treatment of vulvovaginal candidosis. *Vestnik dermatologii I venerologii*. 2015; 2: 111-5. (in Russian)

Сведения об авторах:

Арзуманян Вера Георгиевна, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. физиологии грибов и бактерий ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», e-mail: veraar@mail.ru;

Иксанова Асия Мунировна, лаборант-исследователь лаб. физиологии грибов и бактерий ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; студент магистратуры каф. микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: asya7700@mail.ru;

Артемяева Тамара Алексеевна, вед. технолог лаб. физиологии грибов и бактерий ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», e-mail: tamar1946@mail.ru;

Бутовченко Любовь Михайловна, вед. инженер лаб. физиологии грибов и бактерий ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»;

Мальбахова Екатерина Тимуровна, канд. мед. наук, врач акушер-гинеколог, репродуктолог, клиника репродукции и генетики NGC, e-mail: bakhova@mail.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Колпакова М.Э.¹, Бельдиман Л.Н.¹, Яковлева А.А.¹, Кирик О.В.², Коржевский Д.Э.², Власов Т.Д.¹

Применение иммуногистохимической реакции на нестин для определения размеров повреждения мозга при транзиторной окклюзии средней мозговой артерии

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России 197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8;

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Павлова, д. 12

Существенной проблемой при оценке развивающегося повреждения при экспериментальном исследовании ишемии мозга является отсутствие стандартизированных методических подходов для быстрого и точного определения зоны деструкции при использовании парафиновых срезов. **Цель** исследования – разработка нового подхода к оценке объема повреждения головного мозга при фокальной транзиторной ишемии в бассейне средней мозговой артерии. **Методика.** Проводили морфологическое исследование серийных фронтальных парафиновых срезов конечного мозга. В качестве обзорной окраски использовали окраску 0,1% водным раствором крезилового фиолетового по Нисслию. Для оценки популяции активированных глиальных клеток использовали иммуноцитохимическую реакцию на нестин, для оценки жизнеспособности нейронов использовали иммуноцитохимическую реакцию на NeuN. Иммуноцитохимическую реакцию проводили с использованием мышиных моноклональных антител к нестину. **Результаты.** После проведения иммуноцитохимической реакции на нестин при первичном осмотре окрашенных срезов определялся четкий линейный иммунопозитивный контур вокруг предполагаемой зоны инфаркта. Детальный анализ этого контура (демаркационной линии) показал, что он четко разделяет интактную и поврежденную ткани и состоит из астроцитов, имеющих многочисленные иммунопозитивные отростки, часть из которых участвует в образовании глиальной периваскулярной пограничной мембраны. **Заключение.** Яркая и контрастная реакция на нестин позволяет легко оценивать объем повреждения на серийных парафиновых срезах ишемизированного головного мозга. Гистохимическую реакцию на нестин можно считать удобным маркером зоны повреждения головного мозга при моделировании ишемического инсульта.

Для цитирования: Колпакова М.Э., Бельдиман Л.Н., Яковлева А.А., Кирик О.В., Коржевский Д.Э., Власов Т.Д. Применение иммуногистохимической реакции на нестин для определения размеров повреждения мозга при транзиторной окклюзии средней мозговой артерии *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 148-154.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.148-154

Для корреспонденции: Колпакова Мария Эдуардовна, зав. лаб., канд. мед. наук, доцент, лаб. патофизиологии научно-образовательного института Биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: patho@yandex.ru

Финансирование. Работа не имеет финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.09.2018

Kolpakova M.E.¹, Beldiman L.N.¹, Yakovleva A.A.¹, Kirik O.V.², Korzhevsky D.E.², Vlasov T.D.¹

The use of an immunohistochemical reaction for nestin in determining the size of brain injury after transient occlusion of the middle cerebral artery

¹ I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, L'va Tolstogo Str. 6-8, Saint Petersburg 197022;

² Institute of Experimental Medicine, Akademika Pavlova Str. 12, Saint Petersburg 197376

Evaluating the condition of astrocytes is important for assessment of brain injury. **Aim.** To develop a new approach to assessing the size of brain injury following focal transitional ischemia in the middle cerebral artery circulation using an immunocytochemistry reaction for nestin, a protein of intermediate filaments, which is considered a marker of stem cells. **Methods.** Injury of the rat brain was induced by 30-min occlusion of the left middle cerebral artery followed by 48-h reperfusion. A morphological study of endbrain serial frontal paraffin sections was performed. A 0.1% aqueous solution of Nissl cresyl violet (Dr. Grubler, Germany) was used for survey staining. The population of activated glial cells was examined using an immunocytochemical reaction for nestin with mouse monoclonal antibodies to nestin; viability of neurons was evaluated using an immunocytochemical reaction for NeuN. **Results.** The immunocytochemical reaction revealed a clear, linear immunopositive contour around the suggested infarct zone. In

two days after unilateral ischemia, the cresylic violet staining showed that the center of damage was localized in the striatum and/or basolateral area. The light microscopy study of this contour (demarcation line) showed that it divided intact and damaged tissue.

Conclusion. Therefore, nestin is a convenient marker of brain injury in experimental ischemic stroke. The immunocytochemical reaction in combination with quantitative analysis of scanned images is an optimum tool for determining the size of brain injury.

Keywords: ischemia, middle cerebral artery, nestin, striatum.

For citation: Kolpakova M.E., Beldiman L.N., Yakovleva A.A., Kirik O.V., Korzhevsky D.E., Vlasov T.D. The use of a immunohistochemical reaction for nestin in determining the size of brain injury after transient occlusion of the middle cerebral artery. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63 (2): 148-154. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.148-154

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 27.09.2018

Введение

Острая фокальная ишемия головного мозга приводит к развитию патологических процессов, затрагивающих все основные клеточные популяции нервной ткани: нейроны, астроциты, микроглиоциты, эндотелиоциты и другие клетки. Размер очага повреждения или «ядро инсульта» и последующая клеточная реакция на ишемию, определяющая зону «ишемической полутени» или пенумбры, варьируют даже при использовании хорошо отработанных общепринятых моделей ишемического инсульта [1]. К таким моделям относится монофиламентная модель [2] транзиторной фокальной ишемии в области средней мозговой артерии по J. Koizumi.

Наиболее распространенным методом оценки объема некроза головного мозга является метод окраски жизнеспособных тканей 2 %-м раствором трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). Данный способ морфологической оценки инфаркта позволяет визуализировать как некроз, так и жизнеспособную ткань головного мозга в течение первых 48 ч после восстановления кровотока [3]. Однако данный подход, несмотря на его простоту и эффективность, не позволяет проводить дальнейший морфологический и молекулярный анализ мозговых структур. Возможным решением этой проблемы может быть увеличение числа экспериментальных животных, хотя и это не решает проблемы сопоставимости результатов у отдельных животных. Более того в современных условиях проведения эксперимента необходимо учитывать этические нормы проведения экспериментов на лабораторных животных, рекомендующих ограничивать число опытов *in vivo*.

Другими возможными методами оценки области повреждения являются окраска срезов мозга толуидиновым синим или крезильным фиолетовым по Нислю [4], окраска по Массону [5], сравнение площадей сопоставимых участков ипси- и контралатерального

полушарий [6] или измерение содержания внеклеточной ДНК в плазме крови [7]. Однако, все описанные методы позволяют оценить лишь объем некротизированной ткани, не регистрируя клеточные реакции в области пенумбры. В особенности это относится к реакции астроцитов, характеристика состояний которых важна при оценке любого повреждения мозга [8].

Известно, что после ишемического повреждения в астроцитах начинается экспрессия нетипичных для них белков промежуточных филаментов, в частности, нестина, который принято считать маркером нейральных стволовых и прогениторных клеток [9,10]. Экспрессия нестина в мозге интактных взрослых животных регистрируется только в клетках, расположенных в 2 герминативных зонах: субвентрикулярной зоне боковых желудочков [11] и зубчатой извилине гиппокампа [9]. Однако при ишемическом повреждении мозга происходит увеличение числа нестин-иммунопозитивных клеток. Нестин появляется в активированных астроцитах, олигодендроцитах, нейронах и эндотелиоцитах кровеносных капилляров [12–16]. Распределение иммунореактивных астроцитов, как правило, привязано к зонам дегенерации нейральных элементов [15]. Можно полагать, что анализ распределения активированных нестин-иммунопозитивных астроцитов будет способствовать определению границ зоны ишемического повреждения и оценка состояния структур пограничной зоны.

Цель исследования – разработка нового подхода оценки объема повреждения головного мозга при фокальной транзиторной ишемии в бассейне средней мозговой артерии (СМА) с использованием иммуноцитохимической реакции на нестин.

Методика

При проведении экспериментов руководствовались «Правилами проведения работ с использованием

экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.), Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренным вариантом 2000 г. Работа одобрена этическим комитетом университета. Эксперименты выполнены на половозрелых крысах-самцах линии Wistar ($n=16$) и линии SHR ($n=11$). Фокальную транзиторную ишемию моделировали под общей анестезией (тиопентал-натрий, 60 мг/кг) при помощи монофиламентной эндovasкулярной окклюзии средней мозговой артерии по J. Koizumi [2]. Продолжительность нарушения кровообращения в бассейне левой средней мозговой артерии в каждом случае составляла 30 мин, время реперфузии 48 ч. Животных выводили из эксперимента передозировкой тиопентала натрия. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [17] и подвергали стандартным гистологическим процедурам. Проводили морфологическое исследование серийных фронтальных срезов конечного мозга, соответствующих уровню стереотаксических координат $0,48 \text{ мм} \pm 0,36 \text{ мм}$ по отношению к брегме согласно анатомического атласу Paxinos Watson [18].

Для обзора использовали окраску парафиновых срезов 0,1% водным раствором крезилового фиолетового (Dr. Grubler, Германия) по Нисслю. Для оценки популяции активированных глиальных клеток использовали иммуноцитохимическую реакцию на нестин [19], для оценки жизнеспособности нейронов — реакцию на NeuN [20]. Иммуногистохимическое окрашивание проводили с использованием мышиных моноклональных антител к нестину (клон Rat-401) в разведении 1:400 (BD Biosciences, США), к NeuN (клон A60) в разведении 1:400 (Merck Millipore, США).

Иммуноцитохимическое выявление нестина. Последовательность процедур:

1. Депарафинированные, промытые в дистиллированной воде срезы подвергали в течение 20 мин процедуре теплового демаскирования в пароварке в сосуде Хелендахеля в модифицированном цитратном буфере pH 6,1 (S1700; Dako, Дания), предварительно прогретом до 60°C .

2. Остывшие предметные стекла промывали дистиллированной водой и помещали в стаканчик с 3%-ным раствором перекиси водорода на 10 мин при комнатной температуре для блокирования эндогенной пероксидазы.

3. Срезы промывали в фосфатном буфере (ФСБ) и проводили блокировку неспецифического связывания антител раствором Protein Blok (Spring Bioscience, США) при комнатной температуре 10 мин.

4. Наносили на срезы необходимое количество мышиных моноклональных антител к нестину (клон Rat-401) в разведении 1:400 (BD Biosciences, США) и помещали стекла во влажную камеру (например, в ква-

дратные чашки Петри $100 \times 100 \text{ мм}$, SARSTEDT 82.9923.422, Австралия), затем инкубировали в термостате при 27°C в течение 20 ч. Смывали антитела с препаратов ФСБ и помещали их в свежую порцию того же буфера на 15 мин.

5. Фильтровальной бумагой удаляли буфер вокруг срезов и наносили на срезы необходимое количество вторичных антител — набор MACH 2 Mouse HRP-polymer (Bioscare medical, США). Покачивали предметное стекло для равномерного распределения антител, помещали препараты во влажные камеры. Инкубировали в термостате при температуре 27°C в течение 20 мин. Смывали антитела ФСБ и помещали стекла в сосуд со свежей порцией того же буфера на 15 мин.

6. Наносили на срезы необходимое количество рабочего раствора 3,3'-диаминобензидин тетрагидродорида (DAB+ (Dako, Дания)). В течение 1-3 мин происходило образование окрашенного продукта гистохимической реакции. Процесс контролировали под микроскопом и останавливали реакцию до появления неспецифического фона.

7. Смывали раствор хромогена и промывали препараты в 2-3 порциях дистиллированной воды (по 3-5 мин в каждой). У части препаратов подкрашивали ядра гематоксилином Джилла в течение 30 с, подсинивали в щелочной воде (1 капля 10% аммиака на 10 мл дистиллированной воды). Проводили стандартные процедуры и заключали срезы в перманентную среду.

Полученные препараты анализировали в световом микроскопе Leica DM750 (Leica, Германия) и фотографировали с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

Количественный анализ проводили на цифровых изображениях малого увеличения, полученных при помощи сканера EPSON Perfection V500 PHOTO. Измерение площади внутри границ нестин-иммунопозитивных структур выполняли с использованием программы ImageJ (NIH, США). Статистическую обработку данных проводили в программе Excel (Microsoft Office 2013).

Результаты и обсуждение

Анализ препаратов, окрашенных крезилковым фиолетовым, показал, что через 2 сут после односторонней ишемии очаги повреждения затрагивают только левое полушарие и локализуются в стриатуме и/или базолатеральной области полушария. По степени повреждения были выделены 2 варианта: умеренное локальное повреждение нейронов стриатума без очаговой деструкции нервной ткани и ишемический инфаркт, сопровождающийся очаговой некротической

деструкцией ткани и развитием воспалительной реакции. В обоих случаях четко определить границу повреждения на препаратах при окраске по Нисслю не представлялось возможным.

После проведения иммуноцитохимической реакции на нестин при первичном осмотре окрашенных срезов даже без использования микроскопа определялся четкий линейный иммунопозитивный (ИП) контур вокруг предполагаемой зоны инфаркта. Детальный анализ этого контура (демаркационной линии) показал, что он разделяет интактную и поврежденную ткань. Со стороны повреждения внутри этого контура отсутствуют жизнеспособные нейроны, в ядрах которых не определяется белок NeuN, а эндотелий сосудов проявляет интенсивную реакцию на нестин. В составе демаркационной линии клетки, содержащие нестин, имеют многочисленные отростки, часть из которых участвует в образовании глиальной периваскулярной мембраны (рис. 1, а, б). Со стороны интактной ткани в ядрах нейронов присутствует белок NeuN, эндотелий сосудов проявляет слабую реакцию на нестин.

Полученные препараты были использованы для оценки границ повреждения, проходящих по демаркационной нестин-ИП линии, с помощью сканера. После сканирования препаратов и дальнейшей обработки в программе ImageJ были вычислены площади повреждения и определены анатомические структуры, которые оно затрагивало. Было установлено, что на фронтальных срезах головного мозга на уровне $0,48 \text{ мм} \pm 0,36 \text{ мм}$ от брегмы в случае незначительного локального повреждения ($S=3,39 \pm 0,97 \text{ мм}^2$) указанное по-

ны сенсомоторная кора, бледный шар и базальное ядро Мейнерта (рис. 2, б). В случае развития ишемического инфаркта ($S=21,11 \pm 2,7 \text{ мм}^2$) у большинства животных были поражены стриатум, первичная и вторичная сенсомоторная кора, инсулярная кора, эндопириформная и пириформная кора (рис. 2, в).

Проблема оценки повреждения мозга и определение зоны ишемической полутени на гистологических препаратах представляется достаточно сложной с учетом отсутствия четких маркеров пограничной области, расположенной вокруг поврежденной части мозга. При использовании классической гистологической окраски по методу Ниссля сложно определить границу между поврежденной и интактной тканью. При окраске по Массону, которую используют при оценке объема повреждения мозга [17] нередко получаются вариabельные результаты, которые зависят от особенностей применения методики, а также от выбранного метода фиксации материала. Использование более сложного метода – метода выявления апоптотических клеток («TUNEL») [21] дает возможность видеть отдельные погибающие клетки, но не позволяет определить границу очага повреждения. Использование ранее применявшегося метода оценки жизнеспособности нейронов с помощью иммуноцитохимической реакции на белок ядер нервных клеток NeuN [22] показало, что в случае инфаркта мозга и быстрой гибели нейронов не происходит такого же быстрого разрушения NeuN, как в случае изолированного повреждения нейронов [22], и в очаге повреждения встречаются клетки-тени неправильной формы, сохраняющие иммунореактив-

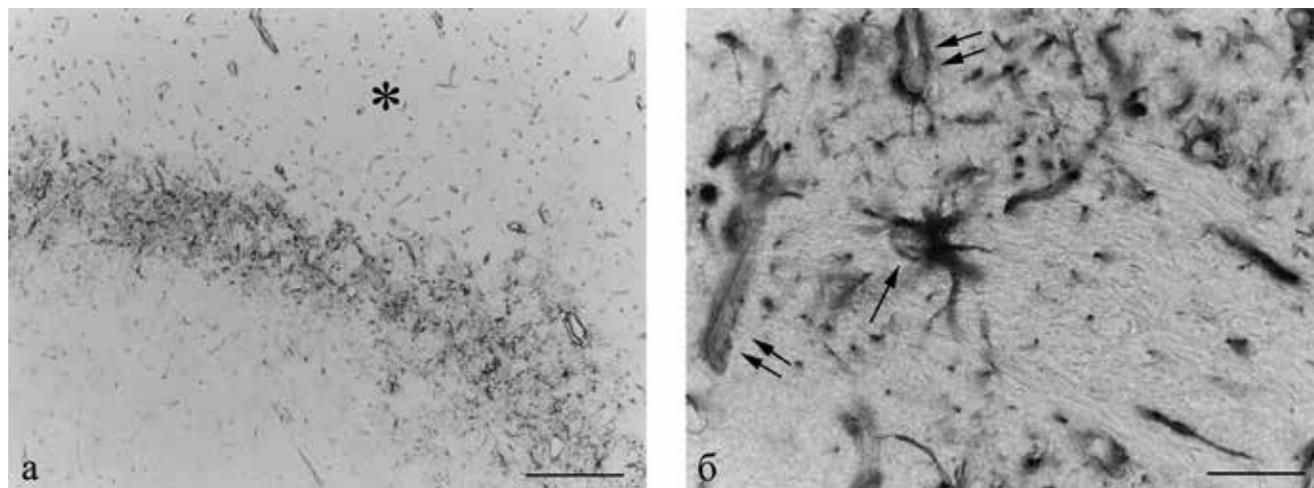


Рис. 1. Демаркационная нестин-ИП линия в стриатуме левого полушария головного мозга.

а – общий вид, звездочкой отмечена сторона повреждения, б – нестин-ИП астроцит (указан стрелкой), ИП-реакция в эндотелии сосудов (указана двойной стрелкой).

Иммуноцитохимическая реакция на нестин.

Масштаб отрезка – 20 мкм (а), 5 мкм (б).

вреждение затрагивало только стриатум (рис. 2, а). В случае значительного локального повреждения ($S=10,22\pm 3,16 \text{ мм}^2$), помимо стриатума были вовлече-

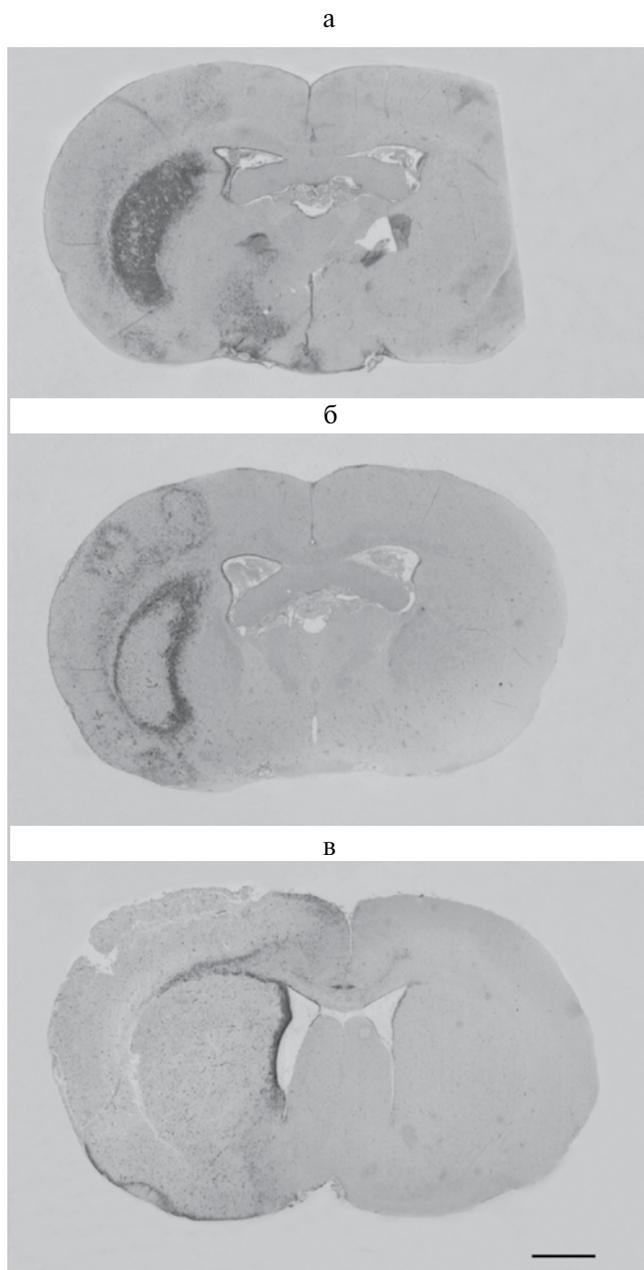


Рис. 2. Фронтальные срезы головного мозга крысы. Различная степень повреждения через 48 ч после 30 мин окклюзии СМА: а – локальное повреждение стриатума без некроза нервной ткани, б – локальное повреждение нейронов стриатума, затрагивающее кору с возможным некрозом/апоптозом в стриатуме, в – ишемический инфаркт левого полушария с сохранением поясной коры, мозолистого тела и СВЗ. Иммуноцитохимическая реакция на нестин. Масштаб отрезка равен 100 мкм.

ность по отношению к NeuN. В сравнении с перечисленными методами, использование реакции на нестин позволяет выявлять именно пограничную зону.

Использование предлагаемого подхода обосновывается тем, что нестин начинает экспрессироваться в астроцитах только при повреждении нервной ткани [23, 24], поэтому можно утверждать, что клетки, отделяющие поврежденную ткань мозга от интактной, являются активированными астроцитами. По данным литературы, экспрессия нестина в астроцитах начинается уже в первые сутки после повреждения и продолжается в течение 1 мес [5]. Именно эти астроциты участвуют в дальнейшем в формировании глиального рубца, который, в свою очередь, участвует в секвестрации очага инфаркта и способствует восстановлению гематоэнцефалического барьера в пограничной зоне.

Яркая и контрастная реакция на нестин позволяет упростить методику получения количественных данных, отказавшись от проведения классической микроскопии, и использовать сканированные изображения, которые удобно загружать в общедоступную программу обработки морфологических данных – ImageJ.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано, что нестин является надежным маркером зоны повреждения головного мозга при моделировании ишемического инсульта, а применение иммуногистохимической реакции в сочетании с количественным анализом сканированных изображений является удобным инструментом для определения объема повреждения мозга на фиксированных препаратах.

Литература

1. Мясищева 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). Выпуск 26/1: 123-6.
2. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke*. 1986; 8: 1-8.
3. Wang J., Gan Y., Han P., Yin J., Liu Q., Ghanian S., Gao F., Gong G., Tang Z. Ischemia-induced Neuronal Cell Death Is Mediated by Chemokine Receptor CX3CR1. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 1-9.
4. Григорян А.С., Гилерович Е.Г., Павличенко Н.Н., Кругляков П.В., Соколова И.Б., Полянцев Д.Г. Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на посттравматические процессы при экспериментальной травме головного мозга. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2009; 4(3): 58-67.
5. Krajewski S., Wang J., Khan T., Liu J., Sze Ch.H., Krajewska M. Image Analysis Algorithms for Immunohistochemical Assessment of Cell Death. In: Lossi L, Merighi A., eds. *Neuronal Cell Death Methods Mol Biol*. 2015; 1254: 181-96.

6. Соколова И.Б., Зинькова Н.Н., Билибина А.А., Кругляков П.В., Гилерович Е.Г., Полинцев Д.Г. и др. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2007; 11(4): 54-62.
7. Конорова И.Л., Максимова М.Ю., Смирнова И.Н., Болотова Т.А., Ершова Е.С., Вейко Н.Н. и др. Циркулирующая в плазме крови внеклеточная ДНК в патогенезе ишемического инсульта: роль транскрибируемой области рибосомного повтора. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 2: 13-23.
8. Jiang W., Yu W., Qu Y., Shi Z., Luo B., Zhang J.H. Cerebral Ischemic Reperfusion Injuries (CIRI). *Springer Series in Translational Stroke Research*. 2018: 259.
9. Fukuda S., Kato F., Tozuka Y., Yamaguchi M et al. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci*. 2003; 23(28): 9357-66.
10. Lendahl U., Zimmerman L. and McKay R. D. CNS stem Cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990; 60(4): 585-95.
11. Ernst C and Christie B. R. Nestin-expressing cells and their relationship to mitotically active cells in the subventricular zones of the adult rat. *Eur. J. Neurosci*. 2005; 22(2): 3059-66.
12. Duggal N., Schmidt-Kastner R., Hakim A.M. Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 1997; 768: 1-9.
13. Li Y. and Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res*. 1999; 838: 1-10.
14. Tonchev A.B., Yamashita T., Sawamoto K. and Okano H. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res*. 2005; 81(6): 776-88.
15. Korzhhevskii D. E., Lentsman M. V., Gilyarov A.V., Kirik O.V., Vlasov T.D. Induction of nestin synthesis in rat brain cells by ischemic damage. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2008; 38 (2): 139-43.
16. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Гиляров А.В. Реверсия эмбрионального фенотипа глиальных клеток под влиянием кратковременной общей ишемии головного мозга. *Морфология*. 2006; 129 (2): 48.
17. Korzhhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem*. 2015; 59 (3): 233-7.
18. Paxinos G., Watson Ch. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Fourth Edition.* — San Diego: Acad. Press. 1998.
19. Kirik O.V., Vlasov T.D., Korzhhevskii D.E. Neural stem cell markers nestin and musashi-1 in rat telencephalon cells after transient focal ischemia. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2013; 43(5): 587-91.
20. Korzhhevskii D.E., Kirik O.V., Sukhorukova E.G., Vlasov T.D. Structural organization of striatal microgliaocytes after transient focal ischemia. *Neuroscience and behavioral physiology*. 2013; 43(4): 457-60.
21. Yang D., Zhao B., Li W., Ouyang Z., Liu Z., Yang H et al. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Human Molecular Genetics*. 2010; 19 (20): 3983-94.
22. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Байса А.Е., Власов Т.Д. Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии. *Бюл. Экспер. Биол. Мед.* 2009; 147(2): 217-9.
23. Коломеец Н.С., Уранова Н.А. Современные представления о реактивности астроцитов при шизофрении. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2014; 114(5-1): 92-9.
24. Sofroniew M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009; 32: 638-47.

References

1. Myasishheva O.V., Pokrovskiy M.V., Gureev V.V., Anciferov O.V., Martynov M.A. Experimental models of ischemic injury of the brain. *Nauchnye ведомosti, seriya meditsina. Farmatsiya*. 2014; 11(182). 26/1: 123-6. (In Russian)
2. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke*. 1986; 8: 1-8.
3. Wang J., Gan Y., Han P., Yin J., Liu Q., Ghanian S., Gao F., Gong G., Tang Z. Ischemia-induced Neuronal Cell Death Is Mediated by Chemokine Receptor CX3CR1. *Sci Rep*. 2018; 8(1):1-9.
4. Grigorian A.S., Gilerovich E.G., Pavlichenlo N.N., Kruglyakov P.V., Sokolova I.B., D.G.Polyntesev The effects of multipotent mesenchymal stem cells transplantation on post-traumatic processes after the experimental traumatic brain injury. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2009; 4(3): 58-67. (In Russian)
5. Krajewski S., Wang J., Khan T., Liu J., Sze Ch.H., Krajewska M. Image Analysis Algorithms for Immunohistochemical Assessment of Cell Death. In: Lossi L, Merighi A., eds. *Neuronal Cell Death Methods Mol Biol*. 2015; 1254: 181-96.
6. Sokolova I.B., Zin'kova N.N., Bilibina A.A., Krugljakov P.V., Gilerovich E.G., Polyncev D.G. et al. Cellular therapy potential in the treatment of ischemic stroke in experiment. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2007; 11(4): 54-62. (In Russian)
7. Konorova I.L., Maksimova M.Yu., Smirnova I.N., Bolotova T.A., Ershova E.S., Veyko N.N. et al. Circulating in blood plasma cell-free DNA in the pathogenesis of ischemic stroke: the role of the transcribed region of ribosomal repeat. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; (2): 13-23. (In Russian)
8. Jiang W., Yu W., Qu Y., Shi Z., Luo B., Zhang J.H. (Editors) Cerebral Ischemic Reperfusion Injuries (CIRI). *Springer Series in Translational Stroke Research*. 2018: 259.
9. Fukuda S., Kato F., Tozuka Y., Yamaguchi M et al. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci*. 2003; 23(28): 9357-9366.
10. Lendahl U., Zimmerman L. and McKay R. D. CNS stem Cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990; 60(4): 585-95.
11. Ernst C. and Christie B.R. Nestin-expressing cells and their relationship to mitotically active cells in the subventricular zones of the adult rat. *Eur. J. Neurosci*. 2005; 22(2): 3059-66.
12. Duggal N., Schmidt-Kastner R., Hakim A.M. Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 1997; 768: 1-9.
13. Li Y. and Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res*. 1999; 838: 1-10.
14. Tonchev A. B., Yamashita T, Sawamoto K. and Okano H. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res*. 2005; 81(6): 776-88.
15. Korzhhevskii D. E., Lentsman M. V., Gilyarov A.V., Kirik O.V., Vlasov T.D. Induction of nestin synthesis in rat brain cells by ischemic damage. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2008; 38 (2): 139-43.

16. Korzhevskiy D.E., Kirik O.V., Gilyarov A.V. Reversion of the embryonic phenotype of glial cells under the influence of short-term global brain ischemia. *Morfologiya*. 2006; 129(2): 48. (In Russian)
17. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem*. 2015; 59 (3): 233-7.
18. Paxinos G., Watson Ch. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Fourth Edition.* — San Diego: Acad. Press. 1998.
19. Kirik O.V., Vlasov T.D., Korzhevskii D.E. Neural stem cell markers nestin and musashi-1 in rat telencephalon cells after transient focal ischemia. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2013; 43(5): 587-91.
20. Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Sukhorukova E.G., Vlasov T.D. Structural organization of striatal microgliaocytes after transient focal ischemia. *Neuroscience and behavioral physiology*. 2013; 43(4): 457-60.
21. Yang D., Zhao B., Li W., Ouyang Z., Liu Z., Yang H. et al. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Human Molecular Genetics*. 2010; 19 (20): 3983-94.
22. Korzhevskij D.E., Kirik O.V., Bajsa A.E., Vlasov T.D. Stimulation of unilateral ischemic injury to the striatal neurons inflicted by short-term occlusion of the middle cerebral artery. *Byul. eksper. Biol. Med.* 2009; 147(2): 217-9. (In Russian)
23. Kolomeets N.S., Uranova N.A. Current concepts about astrocyte reactivity in schizophrenia. *Zhurnal nevrologii i psihiatrii im. S.S. Korsakova*. 2014; 114(5-1): 92-9. (In Russian)
24. Sofroniew M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009; 32: 638-47.

Сведения об авторах:

Власов Тимур Дмитриевич, доктор мед. наук, директор НОИ Биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова;

Коржевский Дмитрий Эдуардович, доктор мед. наук, проф. РАН, зав. лаб. функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Колпакова Мария Эдуардовна, канд. мед. наук, доцент, зав. лаб. патофизиологии НОИ Биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: patho@yandex.ru;

Кирик Ольга Викторовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Яковлева Анастасия Александровна, науч. сотр. лаб. патофизиологии НОИ Биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова;

Бельдидман Людмила Никитична, ст. лаб. лаб. патофизиологии НОИ Биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.