

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

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 «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 01.11.2019
Подписано в печать 14.11.2019

ISSN 0031-2991
Пат. физиол. и экспер. тер.
2019. Том 63. № 4. 1–164

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 № 4 · 2019

Октябрь–Декабрь

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

Ю.В. Архипенко, Е.И. Асташкин, С.В. Грачев,
Н.С. Гурко (ответственный секретарь), Т.А. Гуськова,
И.С. 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. № 4. 1–164



THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

Pathological physiology and experimental therapy
Quarterly reviewed science and practical journal
Published since 1957

Vol. 63 № 4 · 2019

October–December

Editor in chief B.B. Moroz

Assistant editors in chief:

I.S. Gushchin, [V.K. Reshetnyak](#)

Executive editor, scientific editor: N.S. Gourko

Members of editorial board:

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

Staff

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Ветрилэ Л.А., Неvidимова Т.И., Давыдова Т.В., Захарова И.А., Савочкина Д.Н., Галкин С.А., Бохан Н.А.** Аутоантитела к нейромедиаторам дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК при коморбидном течении депрессии и алкогольной зависимости. 5
- Авдеев Д.Б., Степанов С.С., Акулинин В.А., Степанов А.С., Шоронов А.Ю., Самсонов А.А.** Реорганизация астроцитов гиппокампа белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. 13
- Кожевникова Л.М., Цорин И.Б., Ионова Е.О., Барчуков В.В., Никифорова Т.Д., Шигабудинова Л.К., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Колик Л.Г., Дурнев А.Д., Крыжановский С.А.** Половые особенности изменений состояния сердечно-сосудистой системы при алкогольной кардиомиопатии. Экспериментальное исследование 23
- Шерстнев В.В., Грудень М.А., Сенько О.В., Кузнецова А.В., Карлина В.П., Рыжов В.М.** Гендерные особенности содержания в сыворотке крови молекулярных маркеров артериальной гипертензии при развитии предгипертензии. . . 32
- Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н., Давыдов С.О., Гусева Е.С., Максимова М.В.** Взаимосвязи между форменными элементами крови, половыми гормонами и системой ПОЛ у женщин с эссенциальной гипертензией. 39
- Момот А.П., Вдовин В.М., Орехов Д.А., Лычѳва Н.А., Толстокоров И.Г., Шевченко В.О., Красюкова В.О., Шахматов И.И.** Профилактика массивных интраоперационных кровотечений, ассоциированных с гепарином, при системном применении фибрин-мономера в эксперименте 48
- Байбурина Г.А., Нургалева Е.А., Самигуллина А.Ф., Аглетдинов Э.Ф.** Особенности свободнорадикального окисления и динамики содержания кортикостероидных рецепторов в легких у животных с разной чувствительностью к гипоксии в постреанимационном периоде 56
- Дроздова Г.А., Линецкая О.И., Нургалева Е.А., Эткина Э.И., Аглетдинов Э.Ф.** Влияние синбиотика на биохимические параметры сыворотки крови, содержание лептина, грелина и их рецепторов в условиях избыточного потребления жиров в рационе крыс препубертатного возраста 64
- Маркелова Е.В., Овчинникова О.В., Хохлова А.С., Догадова Л.П., Костишко А.В., Пнюхтина М.С.** Роль матриксной металлопротеиназы-9 и ее ингибиторов в процессах рубцевания у большой с первичной открытоугольной глаукомой после оперативного лечения. 72
- Дерюгина А.В., Жемарина Н.В., Иващенко М.Н., Самоделькин А.Г., Игнатъев П.С., Воронина Л.А., Шабалин М.А., Грачева Е.А.** Коррекция состояния организма низкоинтенсивным лазерным излучением при моделировании адреналовой токсемии у крыс 81
- Айзман Р.И., Козлова А.П., Гордеева Е.И., Головин М.С., Корощенко Г.А., Недовесова С.А., Ломовский И.О.** Влияние куркумы длинной и галеги восточной на функцию почек крыс при экспериментальном сахарном диабете и острой почечной недостаточности. 88

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Гонтарь И.П., Емельянова О.И., Русанова О.А., Маслакова Л.А., Зборовская И.А., Шилова Л.Н.** Антитела к ферментам антиоксидантной системы как патогенетический фактор развития анемии при ревматоидном артрите 96

CONTENTS

ORIGINAL INVESTIGATIONS

- Vetrite L.A., Nevidimova T.I., Davydova T.V., Zakharova I.A., Savochkina D.N., Galkin S.A., Bokhan N.A.** Autoantibodies to neurotransmitters dopamine, norepinephrine, serotonin, glutamate and GABA for chronic alcohol dependence 5
- Avdeev D.B., Stepanov S.S., Akulinin V.A., Stepanov A.S., Shoronov A.Yu., Samsonov A.A.** Astrocytes reorganization in the rat hippocampus following a 20-min occlusion of common carotid arteries 13
- Kozhevnikova L.M., Tsorin I.B., Ionova E.O., Barchukov V.V., Nikiforova T.D., Shigabudinova L.K., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Kolik L.G., Durnev A.D., Kryzhanovskii S.A.** Sex-related changes in the cardiovascular system in alcoholic cardiomyopathy (An experimental study) 23
- Sherstnev V.V., Gruden M.A., Senko O.V., Kuznetsova A.V., Karlina V.P., Ryzhov V.M.** Gender related features of serum levels of molecular markers for arterial hypertension during development of prehypertention 32
- Kuznik B.I., Smolyakov Y.N., Davydov S.O., Guseva E.S., Maximena M.V.** Relationships between the blood cells, sexual hormones and lipid peroxidation in women with essential hypertension 39
- Momot A.P., Vdovin V.M., Orekhov D.A., Lycheva N.A., Tolstokorov I.G., Shevchenko V.O., Krasnyukova V.O., Shakhmatov I.I.** Prevention of massive intraoperative bleedings associated with heparin with the systemic use of fibrin monomer in the experiment 48
- Bayburina G.A., Nurgaleeva E.A., Samigullina A.F., Agletdinov E.F.** Effect of free radical oxidation on content of corticosteroid receptors in the lungs of animals with different sensitivity to hypoxia in the postresuscitation period 56
- Drozдова G.A., Linetskaya O.I., Nurgaleeva E.A., Etkina E.I., Agletdinov E.F.** The effect of a synbiotic on blood biochemistry and concentrations of leptin, ghrelin and their receptors in prepubertal rats consuming a diet containing excessive fat 64
- Markelova E.V., Ovchinnikova O.V., Khokhlova A.S., Dogadova L.P., Kostiushko A.V., Pnyukhtina M.S.** The role of matrix metalloproteinase 9 and its inhibitors in scarring processes following surgery for primary open-angle glaucoma 72
- Deryugina A.V., Zhemarina N.V., Ivashchenko M.N., Samodelkin A.G., Ignatyev P.S., Voronina L.A., Shabalin M.A., Gracheva E.A.** Correction of the body state with low-intensity laser irradiation in modeling adrenal toxemia in rats 81
- Aizman R.I., Kozlova A.P., Gordeeva E.I., Golovin M.S., Koroshchenko G.A., Nedovesova S.A., Lomovsky I.O.** Effect of *Curcuma longa* and *Galega orientalis* on renal function in rats with experimental diabetes mellitus and acute renal failure 88

BRIEF MESSAGE

- Gontar I.P., Emelianova O.I., Rusanova O.A., Maslakova L.A., Zborovskaya I.A., Shilova L.N.** Antibodies to enzymes of antioxidant system as a pathogenetic component of anemia in rheumatoid arthritis 96

СОДЕРЖАНИЕ

- Мороз А.С., Семенникова С.В., Копылова С.В., Строганов А.Б.** Активность окислительных процессов при эндометрите у крыс 101
- Брюхин Г.В., Антонов С.Д.** Характеристика клеток Лейдига у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа в ранний неонатальный период 105
- Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Хамнагдаева Н.В., Обрубов С.А., Семенова Л.Ю., Порядин Г.В.** Нарушение метаболизма ретинола – важное патогенетическое звено формирования осевой близорукости 110

ОБЗОРЫ

- Трегуб П.П., Куликов В.П., Малиновская Н.А., Кузовков Д.А., Ковзелев П.Д.** Hif-1 – альтернативные сигнальные механизмы активации и формирования толерантности к гипоксии/ишемии 115
- Пальцын А.А.** Запоминание и забывание 123
- Овсянников В.Г., Бойченко А.Е., Алексеев В.В., Каплиев А.В., Шумарин А.Е., Котиева И.М., Алексеева Н.С., Вартанян Э.Э., Кутузова А.А., Гулян М.В.** Антиноцицептивная система. Эндогенные механизмы обезболивания 130
- Бурденный А.М., Лукина С.С., Заварыкина Т.М., Пронина И.В., Бреннер П.К., Капралова М.А., Аткарская М.В., Филиппова Е.А., Иванова Н.А., Круглова М.П., Белова М.В., Бахрушина Е.О., Брага Э.А., Логинов В.И.** Фармакогенетика лекарственных веществ при раке молочной железы и новые возможности улучшения их биодоступности .. 137
- Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Аюшинова Н.И.** Воздействие на митогенактивируемые протеинкиназы как новое направление регуляции роста соединительной ткани 151

МЕТОДИКА

- Семенов Д.Г., Беляков А.В.** Модификация ПКЛ-теста для оценки поведенческой активности и памяти крыс 158

CONTENTS

- Moroz A.S., Semennikova S.V., Kopylova S.V., Stroganov A.B.** Activity of oxidative processes in rat endometritis 101
- Bryukhin G.V., Antonov S.D.** Characteristic of Leydig cells from newborn offspring of female rats with experimental type 1 diabetes 105
- Kazimirsky A.N., Salmasi J.M., Khamnagdayeva N.V., Obrubov S.A., Semenova L.Yu., Poryadin G.V.** Disorders in retinol metabolism as an important part in the pathogenesis of myopia 110

REVIEWS

- Tregub P.P., Kulikov V.P., Malinovskaya N.A., Kuzovkov D.A., Kovzelev P.D.** HIF-1 – Alternative signals pathways of activation and formation of tolerance to hypoxia/ischemia 115
- Paltsyn A.A.** Memorizing and forgetting 123
- Ovsyannikov V.G., Boychenko A.E., Alekseev V.V., Kapliiev A.V., Shumarin A.E., Kotieva I.M., Alekseeva N.S., Vartanyan E.E., Kutuzova A.A., Gulyan M.V.** The antinociceptive system. Endogenous mechanisms of pain control 130
- Burdennyi A.M., Lukina S.S., Zavarykina T.M., Pronina I.V., Brenner P.K., Kapralova M.A., Atkarskaya M.V., Filippova E.A., Ivanova N.A., Kruglova M.P., Belova M.V., Bahrushina E.O., Braga E.A., Loginov V.I.** Pharmacogenetics of drugs in breast cancer and new approaches for improvement of their bioavailability 137
- Shurygina I.A., Shurygin M.G.** Mitogen-activated protein kinases as a target for regulating of the connective tissue growth 151
- Semenov D.G., Belyakov A.V.** A modification of EPM test for evaluation of behavioral activity and memory of rats 158

METHODS

- Semenov D.G., Belyakov A.V.** A modification of EPM test for evaluation of behavioral activity and memory of rats 158

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Ветрилэ Л.А.¹, Невидимова Т.И.², Давыдова Т.В.¹, Захарова И.А.¹, Савочкина Д.Н.²,
Галкин С.А.², Бохан Н.А.²

Аутоантитела к нейромедиаторам дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК при коморбидном течении депрессии и алкогольной зависимости

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

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

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Томского НИМЦ РАН,

634014, г. Томск, Россия, ул. Алеутская, д. 4

Цель исследования – определение содержания аутоантител к нейромедиаторам и оценка их роли у пациентов с алкогольной зависимостью, коморбидными аффективными и аддиктивными расстройствами, депрессивным синдромом.

Методика. Исследована сыворотка крови пациентов в возрасте 40-55 лет. В первую группу вошли 56 пациентов, у которых в соответствии с Международной классификацией МКБ-10 был диагностирован синдром зависимости от алкоголя (F10.2). Вторую группу (n=24) составили пациенты с депрессивным эпизодом или рекуррентным депрессивным расстройством (F32 и F33, соответственно). Контролем служили сыворотки 36 условно здоровых доноров соответствующего возраста и пола. Аутоантитела к нейромедиаторам дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) на полистироловых планшетах, активированных соответствующими тест-антигенами. В качестве тест-антигенов использовали конъюгаты нейромедиатора с бычьим сывороточным альбумином.

Результаты. Пациенты, страдающие алкоголизмом, отличались от группы здоровых людей более высоким содержанием аутоантител к серотонину. Средний уровень аутоантител к дофамину, норадреналину, глутамату и ГАМК практически не отличался от контрольных значений. У части пациентов с алкоголизмом основному заболеванию сопутствовали депрессивные расстройства. Исходя из этого, общая группа пациентов была разделена на 2 подгруппы: пациенты с алкоголизмом без коморбидной патологии и пациенты с алкоголизмом, осложненным депрессивными расстройствами. Группа пациентов с алкоголизмом без коморбидной патологии отличалась от здоровых лиц лишь увеличением уровня аутоантител к серотонину. В противоположность этому у пациентов, страдающих алкоголизмом с депрессивными расстройствами, наблюдали значимое снижение уровня аутоантител к дофамину, норадреналину и ГАМК по сравнению как с группой контроля, так и с пациентами без коморбидной симптоматики. При анализе содержания аутоантител к нейромедиаторам в сыворотках крови пациентов с алкоголизмом с коморбидной депрессией и пациентов с депрессивным синдромом показано отсутствие значимых различий в содержании аутоантител к дофамину, норадреналину, глутамату и ГАМК. В то же время уровень аутоантител к серотонину при коморбидной патологии был выше контрольного и приближался к таковому при алкоголизме. Установлено, что у большей части пациентов без аффективной патологии уровень аутоантител к дофамину, норадреналину и ГАМК был значимо ниже, чем у здоровых лиц, а количество аутоантител к серотонину и глутамату не отличалось от контрольных значений. Представляют интерес результаты сопоставления уровней аутоантител к нейромедиаторам: пациентов с алкоголизмом с низким уровнем антител без коморбидной патологии, пациентов с алкоголизмом, осложненным депрессивными расстройствами и пациентов с депрессивным синдромом без алкогольной зависимости. Установлено отсутствие существенных различий в содержании аутоантител к дофамину, норадреналину и ГАМК между этими 3 группами пациентов. Уровень аутоантител к серотонину и глутамату практически не отличался от значений контроля.

Заключение. Полученные данные позволяют рассматривать низкий уровень аутоантител к дофамину, норадреналину, и ГАМК как объективный диагностический признак стадии развития алкоголизма, осложненного депрессивными расстройствами. Рост уровня аутоантител к серотонину на этом фоне может указывать на переход от обострения патологического влечения к его реализации.

Ключевые слова: болезни зависимости; алкоголизм; антитела к нейромедиаторам; депрессия.

Для цитирования: Ветрилэ Л.А., Невидимова Т.И., Давыдова Т.В., Захарова И.А., Савочкина Д.Н., Галкин С.А., Бохан Н.А. Аутоантитела к нейромедиаторам дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК при коморбидном течении депрессии и алкогольной зависимости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 5-12.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.5-12

Для корреспонденции: *Давыдова Т.В.*, e-mail: dav-ta@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (отделение гуманитарных и общественных наук) Грант № 19-013-00330. **Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.06.2019

Vetrile L.A.¹, Nevidimova T.I.², Davydova T.V.¹, Zakharova I.A.¹, Savochkina D.N.², Galkin S.A.², Bokhan N.A.²

Antibodies to the neurotransmitters, dopamine, norepinephrine, serotonin, glutamate, and GABA, in chronic alcohol dependence

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation;

²Research Institute for Mental Health, Aleutskaya Str. 4, Tomsk 634014, Russian Federation

Aim. To compare levels and possible roles of serum autoantibodies (aAB) to the neurotransmitters, dopamine, noradrenaline, serotonin, glutamate, and GABA, in alcohol-dependent patients, patients with depression, and healthy individuals.

Methods Blood serum was collected from patients aged 40-55. The first group (n=56) included patients with alcohol dependence (F10.2 according to the ICD10). The second group (n=24) included patients with a depressive episode or recurrent depressive disorder (F32 and F33). Serum from 36 healthy donors of matching age and sex was used as the control. Concentrations of serum autoantibodies to dopamine (DA), norepinephrine (NE), serotonin, glutamate (GLU), and GABA were measured using solid-phase enzyme immunoassay (ELISA) on polystyrene 96-well plates sensitized with respective test antigens. Neurotransmitters conjugated with bovine serum albumin (BSA) were used as test antigens. Statistical analysis was performed using the Statistica 6 software with non-parametric Mann-Whitney U-test and Fisher's exact test. Difference was considered as significant at $p < 0.05$.

Results. Patients with alcoholism differed from the group of healthy people in a higher content of serotonin aAB whereas levels of aABs to DA, NE, GLU, and GABA practically did not differ from control values. In some patients with alcoholism, the underlying disease was associated with depressive disorders. Based on this feature, the total group of patients was divided into two subgroups, patients with alcoholism without a comorbidity and patients with alcoholism complicated by depressive disorders. The group of patients with alcoholism without a comorbidity differed from healthy individuals only in an increased level of serotonin aAB. In contrast, patients with alcoholism and depressive disorders had significantly decreased levels of aABs to DA, NE, and GABA compared to the control group and to patients without a comorbidity. Comparative analysis showed the absence of significant differences in aABs to DA, NE, GLU, and GABA between patients with alcoholism and depressive disorders and patients with depression. At the same time, the level of serotonin aAB was higher in patients with a comorbidity than in control and was close to that in alcoholism.

Patients with alcoholism without a somatic pathology were divided into two subgroups, with high and low levels of NT aAB. In the majority of patients, levels of aABs to DA, NE, and GABA were significantly lower than in healthy individuals. No significant difference in aABs to DA, NE and GABA was found between patients with alcoholism and low aAB, patients with alcoholism complicated by depression, and patients with depression. Levels of aABs to serotonin and GLU practically did not differ from the control.

Conclusion. Low levels of aABs to DA, NE, and GABA can be considered as an objective diagnostic criterion for the stage of the disease. An associated increase in serotonin aAB may indicate transition from exacerbation to implementation of the pathological drive.

Keywords: dependence diseases; alcoholism; antibodies to neurotransmitters; depression.

For citation: Vetrile L.A., Nevidimova T.I., Davydova T.V., Zakharova I.A., Savochkina D.N., Galkin S.A., Bokhan N.A. Autoantibodies to neurotransmitters dopamine, norepinephrine, serotonin, glutamate and GABA for chronic alcohol dependence. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 5-12. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.5-12

For correspondence: *Davydova T.V.*, e-mail: dav-ta@yandex.ru

Conflict of interest. The authors state that there is no conflict of interest.

Acknowledgments. The study was supported by the RFBR grant 19-013-00330.

Information about authors:

Vetrile L.A., <https://orcid.org/0000-0001-9783-4711>

Nevidimova T.I., <https://orcid.org/0000-0002-5084-920>

Davydova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-3176-1035>

Savochkina D.N., <https://orcid.org/0000-0003-1263-5516>

Bokhan N.A., <https://orcid.org/0000-0002-1052-855X>

Received 20.06.2019

Введение

Основой формирования физической зависимости от алкоголя являются изменения нейрхимических функций головного мозга, главным образом в стволовых и лимбических структурах, где располагается так называемая «система подкрепления» [1]. Центральным звеном патогенеза алкоголизма является динамика изменений катехоламиновой, и в первую очередь дофаминовой нейромедиации в мезолимбических структурах мозга. Наряду с этим многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями доказана роль серотонин-, глутамата (ГЛУ)- и ГАМК-ергических систем мозга в формировании алкогольной зависимости [2–5]. В экспериментах на животных было показано, что при однократном или хроническом введении этанола происходит существенное увеличение кругооборота серотонина в ЦНС. Повышение уровня серотонина в головном мозге сопровождалось снижением влечения к алкоголю, а снижение уровня – к увеличению его потребления [3, 5]. Показана модулирующая роль серотонина и норадреналина (НА) на развитие толерантности к алкоголю [4]. В последние годы все большее внимание уделяется роли ГЛУ – и ГАМК-ергических систем мозга в патогенезе алкоголизма [5, 6]. Хроническая алкогольная интоксикация вызывает увеличение чувствительности и плотности отдельных субъединиц ГЛУ-NMDA-рецепторов в различных областях мозга [4, 5, 7], что, по мнению авторов, может являться важной частью механизма алкогольной зависимости. На различных экспериментальных моделях установлено, что ряд поведенческих эффектов этанола обусловлено ГАМК-ергической системой мозга. Активация алкоголем дофаминергических нейронов может происходить через его взаимодействие с ГАМК-ергическими ионотропными рецепторами [4, 5, 7].

Одной из особенностей алкогольной зависимости является частое сочетание с аффективными расстройствами, в частности с депрессией. По данным различных авторов частота депрессивных состояний среди пациентов алкоголизмом составляет от 10 до 70% [1, 8–10.], а при алкогольном абстинентном синдроме превышает 90% [9]. Полагают, что часто встречаемая коморбидность алкогольной зависимости и депрессии связана со снижением активности моноаминергических нейромедиаторных систем мозга, в первую очередь серотонина, дофамина (ДА) и НА [8, 11]. Не менее важную роль играют ГЛУ- и ГАМК-ергические системы [12]. Депрессия у пациентов алкоголизмом расценивается как неблагоприятный признак, свидетельствующий о возможности возобновления потребления алкоголя [1, 9, 10, 13].

Тесная взаимосвязь центральной нервной и иммунной систем предполагает активное участие иммунной системы в механизмах развития алкогольной зависимости. Алкоголь является мощным модулятором иммунной системы и вызывает изменение экспрессии медиаторов воспаления, как на периферии, так и в ЦНС [10]. В опытах на крысах было показано, что уже в течение часа после введения этанола (5г/кг) наблюдается значительное повышение уровня провоспалительных медиаторов иммунной системы – интерлейкинов (ИЛ): ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО в гиппокампе [10]. Другим информативным показателем дисрегуляции нейроиммунных взаимодействий является усиленная продукция аутоантител (аАТ) к нейромедиаторам (НМ), их рецепторам и другим антигенам мозга. Возможность усиленной продукции аАТ к ДА, серотонину, НА, ГЛУ NMDA и AMPA рецепторам, а также к μ -дельта опиоидным рецепторам показана при алкогольной и различных формах наркотической зависимости в клинике и в условиях экспериментальной опийной наркомании [3, 6, 15, 16].

Цель исследования – определение содержания аутоантител к нейромедиаторам и оценка их роли у пациентов с алкогольной зависимостью, коморбидными аффективными и аддиктивными расстройствами, депрессивным синдромом.

Методика

Исследования выполнены в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена этической комиссией ФГБНУ НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН.

Клиническая работа проведена на базе отделения аддиктивных состояний и лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН. Клиническая верификация алкоголизма осуществлялась психиатрами и наркологами в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). В 1-ю группу вошли 56 пациентов с синдромом зависимости от алкоголя (F10.2), во 2-ю – 24 пациента с депрессивным эпизодом (F32) или рекуррентным депрессивным расстройством (F33). Группу сравнения сопоставимую по полу и возрасту составили 36 условно здоровых лиц. Критерием включения в группу являлось информированное согласие на участие в исследовании, критерием исключения – наличие неврологической патологии, соматических расстройств в стадии обострения. Кровь для исследования у пациентов и лиц группы сравнения брали

однократно. В сыворотках крови определяли содержание аАТ к НМ: ДА, НА, серотонину, ГЛУ и ГАМК. Аутоантитела к НМ определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на полистироловых планшетах, активированных соответствующими тест-антигенами. В качестве тест-антигенов использовали конъюгаты НМ с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Тест-антигены ДА-БСА и серотонин-БСА синтезировали с использованием диазотированного белка, тест-антигены НА-БСА, ГЛУ-БСА и ГАМК-БСА – с использованием бифункционального реагента глутарового альдегида [3]. В качестве вторичных диагностических антител использовали антитела к иммуноглобулину человека, меченные пероксидазой хрена (SERVA). Содержание аАТ оценивали по оптической плотности сыворотки при $\lambda=495$ нм с использованием считывающего устройства «ИФА-reader» («ImmunoChem-2100», USA) и выражали в условных единицах активности (усл. ед.) показателем «К», представляющим отношение оптической плотности сыворотки каждого пациента к среднему значению оптической плотности сывороток здоровых доноров. Рабочее разведение сывороток составляло 1:100.

Статистическую обработку данных проводили по программе «Statistica 6» с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни и точного метода Фишера. Критерий уровня значимости принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что аАТ к НМ ДА, НА, серотонину, ГЛУ и ГАМК в небольшом

количестве были выявлены в сыворотках крови всех здоровых лиц (табл.).

Пациенты с зависимостью от алкоголя характеризовались более высоким уровнем аАТ к серотонину по сравнению с группой здоровых людей (табл.), а средний уровень аАТ к ДА, НА, ГЛУ и ГАМК практически не отличался от контрольных значений. У части пациентов основному заболеванию сопутствовали депрессивные расстройства. Исходя из этого, общая группа пациентов с синдромом зависимости от алкоголя была разделена на 2 подгруппы: пациенты с алкоголизмом без аффективной патологии ($n=46$) и пациенты с алкоголизмом, осложненным депрессивными расстройствами ($n=10$). Подгруппа пациентов с алкогольной зависимостью без депрессии отличалась от здоровых лиц лишь повышенным уровнем аАТ к серотонину (табл.). У пациентов с алкогольной зависимостью с коморбидной депрессивной симптоматикой наблюдали статистическое значимое снижение содержания аАТ к ДА, НА и ГАМК по сравнению, как с группой контроля, так и с подгруппой пациентов с алкоголизмом без аффективных расстройств. Уровень аАТ к серотонину оставался выше значения в группе контроля. Представлялось интересным проведение сравнительного анализа содержания аАТ к НМ у пациентов с депрессивным синдромом и с алкоголизмом с коморбидной депрессией. Установлено, что сравниваемые группы имеют сходные профили: уровень аАТ ко всем изученным НМ ниже контрольного при депрессии, особенно осложненной алкоголизмом. Исключением являются уровень аАТ к серотонину, который выше контрольного уровня при алкоголизме без коморбидной патологии и алкоголизме, сочетанном с де-

Таблица

Содержание аутоантител к нейромедиаторам в сыворотках крови пациентов с алкоголизмом, депрессией и здоровых лиц, $M \pm SEM$.

Группа обследованных	Уровень аутоантител к нейромедиаторам, К (усл. ед.)				
	дофамину	норадреналину	серотонину	глутамату	ГАМК
Здоровые лица ($n=36$)	1,01 ± 0,05	1,01 ± 0,05	1,00 ± 0,04	1,04 ± 0,07	1,00 ± 0,058
Пациенты с алкоголизмом ($n=56$)	1,11 ± 0,06	1,06 ± 0,06	1,17 ± 0,06*	1,02 ± 0,05	0,910 ± 0,04
в том числе: без аффективной симптоматики ($n=46$)	1,15 ± 0,07	1,13 ± 0,07	1,17 ± 0,07*	1,05 ± 0,05	0,94 ± 0,05
в сочетании с депрессией ($n=10$)	** •• 0,76 ± 0,07	** •• 0,66 ± 0,06	1,15 ± 0,11	0,87 ± 0,08	** •• 0,66 ± 0,06
Пациенты с депрессивным синдромом ($n=24$)	0,93 ± 0,04	** •• 0,79 ± 0,05*	0,83 ± 0,03**	** •• 0,79 ± 0,05*	** •• 0,82 ± 0,06*

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем; •• – $p < 0,01$ по сравнению с группой пациентов с алкоголизмом без аффективной симптоматики.

прессией, по сравнению с показателем пациентов с депрессивным синдромом без алкоголизма (табл.).

Персонафицированный анализ результатов ИФА показал, что пациенты, страдающие алкоголизмом без аффективной патологии, по уровню аАТ к НМ в свою очередь можно разделить на 2 подгруппы: с высоким (статистически значимо выше показателей контроля) и низким – значимо ниже (или на уровне контроля) содержанием аАТ. Частота обнаружения и уровень аАТ к НМ представлены на рисунке 1, А, Б.

Из данных рис. 1, А видно, что у большей части пациентов с алкоголизмом определялся низкий уровень аАТ к НМ. Так, низкое содержание аАТ к ДА, НА, серотонину, ГЛУ и ГАМК определялось у 54,3%, 60,9%,

58,7%, 78,3% и 78,3% пациентов, соответственно. При этом следует отметить, что уровень аАТ к ДА, НА и ГАМК был значимо ниже, чем в контроле или общей группе пациентов. А содержание АТ к серотонину и ГЛУ практически не отличалось от значений в группе здоровых лиц (рис. 1, Б). Можно предполагать, что разделение пациентов по содержанию аАТ к НМ связано с периодом заболевания. Ранее нами была показана зависимость уровня аАТ к НМ у больных опийной наркомании от стадии развития заболевания [15, 16].

На рис. 2 представлены результаты сравнения уровня аАТ к НМ в сыворотках крови трех групп пациентов: с алкоголизмом с низким содержанием аАТ к НМ, пациентов с алкоголизмом, осложненным депрессив-

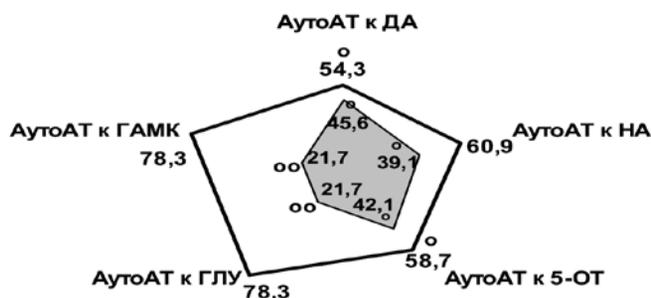


Рис. 1, А. Частота обнаружения аутоантител к нейромедиаторам у пациентов с алкоголизмом: белое поле – количество пациентов (%) с низким, серое поле – с высоким уровнем аутоантител к нейромедиаторам. Общее количество пациентов принято за 100%.

° – $p < 0,05$, °° – $p < 0,01$ по сравнению с общей группой пациентов.

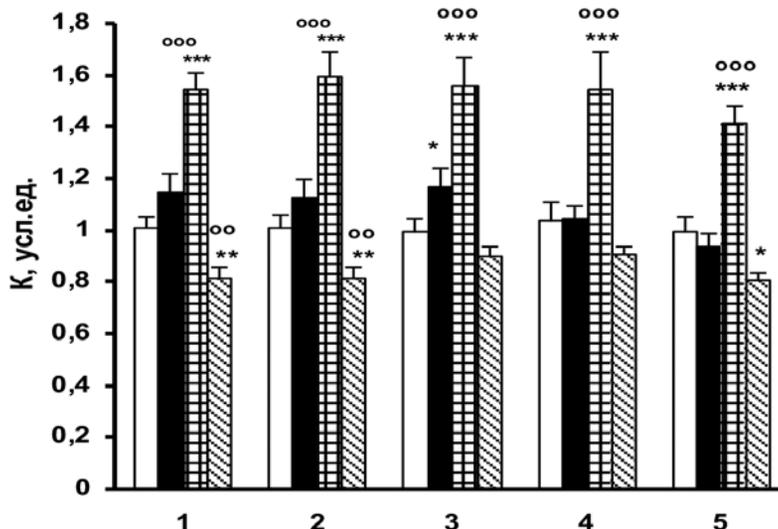


Рис. 1, Б. Уровень антител к нейромедиаторам в группах пациентов с алкоголизмом без аффективной патологии и здоровых лиц.

По оси ординат – уровень аутоантител (К, условные единицы активности). По оси абсцисс – нейромедиаторы: 1- дофамин, 2 – норадреналин, 3 – серотонин, 4 – глутамат, 5 – ГАМК. Светлые столбики – контроль, темные – пациенты с алкоголизмом, штриховка в клетку – пациенты с высоким уровнем аутоантител, косая штриховка – пациенты с низким уровнем аутоантител. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой здоровых лиц. ° – $p < 0,01$, °°° – $p < 0,001$ по сравнению с группой пациентов с алкоголизмом без аффективной патологии.

ными расстройствами и пациентов с депрессивным синдромом.

Установлено отсутствие существенных различий в содержании аАТ к ДА, НА и ГАМК между этими тремя группами пациентов. А уровень аАТ к серотонину и ГЛУ практически не отличался от контрольных значений. По-видимому низкий уровень аАТ к НМ у пациентов с алкоголизмом может быть обусловлен развитием у них депрессивной симптоматики, которая в свою очередь может быть причиной патологического влечения к алкоголю [3, 6, 10, 14].

Таким образом, установлено, что пациентов с алкогольной зависимостью без коморбидной патологии можно разделить на 2 группы: с высоким и низким уровнем аАТ к НМ. У большей части пациентов уровень аАТ к ДА, НА и ГАМК был значимо ниже, чем у здоровых лиц. Можно предполагать, что низкий уровень аАТ к НМ соответствует пониженному уровню нейромедиаторов в мезолимбических структурах мозга. Многочисленными исследованиями доказано, что хроническая алкогольная интоксикация вызывает снижение уровней ДА, НА, и ГАМК и увеличение экспрессии NMDA-рецепторов в мезолимбических структурах мозга, играющих ведущую роль в развитии зависимости от алкоголя [1, 2, 7]. Отсутствие существенной разницы в содержании аАТ к ДА, НА и ГАМК у пациентов с зависимостью от алкоголя с низким уровнем аАТ и пациентов с алкоголизмом с коморбидной депрессией, и па-

циентов с депрессивным синдромом, позволяет предполагать, что низкий уровень аАТ к НМ у пациентов с алкоголизмом может свидетельствовать о развитии депрессивной симптоматики и обострении патологического влечения к алкоголю. Выявленные особенности в содержании аАТ к НМ у пациентов с алкогольной зависимостью позволяют рассматривать низкий уровень аАТ к ДА, НА и ГАМК как объективный диагностический признак стадии развития заболевания.

В контексте профилактики формирования алкогольной зависимости и/или ее рецидива наибольший интерес представляет общность иммунонейромедиаторного профиля при коморбидной патологии. Не исключено, что рост уровня аАТ к серотонину на фоне сниженного уровня аАТ к ДА, НА и ГАМК указывает на переход от обострения патологического влечения к его реализации, то есть систематическому употреблению алкоголя, сопровождающемуся выбросом серотонина. Не исключено также, что подобная реакция характерна только для респондеров: чем большее антидепрессивное действие оказывает алкоголь, тем выше риск формирования зависимости от него. Нон-респондеры могут в течение продолжительного времени оставаться на стадии эпизодического употребления или употребления алкоголя с вредными последствиями без формирования синдрома зависимости, что не исключает поиск такими пациентами иных средств снятия эмоционального напряжения. Оба прогности-

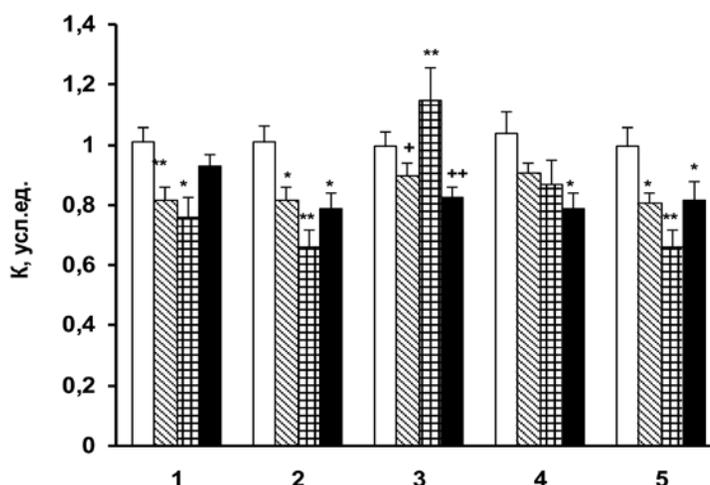


Рис. 2. Сравнение уровней антител к нейромедиаторам в группах:

светлый столбик – контроль (здоровые лица); столбик с косой штриховкой – пациенты с алкоголизмом с низким уровнем антител; столбик с штриховкой в клетку – пациенты с алкоголизмом, осложненным депрессивными расстройствами; темный столбик – пациенты с депрессивным синдромом. По оси ординат – уровень антител (К, усл. ед.), по оси абсцисс – нейромедиаторы – 1 – дофамин, 2 – норадреналин, 3 – серотонин, 4 – глутамат, 5 – ГАМК. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля; + – $p < 0,05$, ++ – $p < 0,01$ по сравнению с группой пациентов с алкоголизмом в сочетании с депрессивным синдромом.

ческих сценария указывают на необходимость своевременной коррекции антидепрессивной терапии на основании клинико-нейроиммунного анализа.

Литература

1. Анохина И.П. Этиология и патогенез алкоголизма. В кн. *Алкоголизм*. Под ред. Н.Н. Иванца и М.А. Винниковой. М.; Медицина; 2011; 65-77.
2. Лелевич С.В., Величко И.М., Лелевич В.В. Нейрохимические аспекты алкогольной интоксикации. *Журн. Гродненского государственного медицинского университета*. 2017; 15(4): 375-80.
3. Евсеев В.А. *Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии*. М.; РАМН, 2007.
4. Долго-Сабуров В.Б., Петров А.Н., Лисицкий Д.С., Беляев В.А. Центральные нейрохимические эффекты острого и хронического воздействия этанола. Механизмы толерантности. *Токсикология*. 2011; 12: 1423-36.
5. Лелевич С.В. Молекулярные механизмы алкогольной интоксикации. *Журн. Гродненского государственного медицинского университета*. 2016; 2: 64-8.
6. Востряков В.В., Павленко В.П., Шабанов П.Д. Биохимические маркеры алкогольной и опиатной зависимости. *Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии*. 2004; 3(3): 18-55.
7. Trevisan L., Fitzgerald I., Brose N., Chronic investigation of ethanol upregulates NMDAAR1 receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus. *J. Neurochem*. 1994; 62 (4): 1635-8.
8. Сиволап Ю.П. Антидепрессанты в лечении алкоголизма. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2012; 5(2): 32-5.
9. Крылов Е.Н. Депрессивные расстройства у больных алкогольной зависимостью. *Наркология*. 2004; 4: 42-9.
10. Sudan Passad Neupane Neuroimmune interface in the comorbidity between alcohol use disorder and major depression. *Frontiers in Immunology*. 2016; doi:10.3389/fimmu.2016.00655.
11. Fahlke C., Berggren U., Berglund K. Etal. Neuroendocrine assessment of serotonergic, dopaminergic, noradrenergic functions in alcohol-dependent individuals. *Alcohol Clin. Exp. Res*. 2012; 36(1): 97-103.
12. Ansel T. Hillmer, Graeme F. Mason, Lisa M. Fucito, et al. How Imaging Glutamate, GABA, and Dopamine. Can Inform the Clinical Treatment of Alcohol Dependence and Withdrawal. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 2015; 39(12): 2268–82. doi: 10.1111/acer.12893.
13. Смудевич А.Б. *Депрессии в общей медицине. Руководство для врачей*. М.; Мед. информ. агенство; 2001.
14. Fulton T. Crews, Colleen J Lawrimore, T.Jordan Walter, Leon G. Coleman Jr. The Role of Neuroimmune Signaling in Alcoholism. *Neuropharmacology*. 2017; 122: 56–73. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.01.031.
15. Ветрилэ Л.А., Невидимова Т.И., Мастерова Е.И., Бохан Н.А., Захарова И.А., Савочкина Д.Н., Фомина В.Г., Давыдова Т.В. Антитела к нейромедиаторам – нейроиммунные маркеры в персонализированной профилактике болезней зависимости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(3): 31-7.
16. Давыдова Т.В., Ветрилэ Л.А., Ветлугина Т.П., Невидимова Т.И., Бохан Н.А., Батухтина Е.И. и др. Антитела к нейромедиаторам как возможные нейроиммунные маркеры риска формирования зависимости от психоактивных веществ. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 61(3): 13-6.

References

1. Anokhina I.P. *Etiology and pathogenesis of alcoholism. In: Alcoholism. [Etiologiya i patogenez alkogolizma. Alkogolizm]*. Ed. N.N. Ivantsa i M.A. Vinnikovoy. Moscow; Meditsina; 2011; 65-7. (in Russian)
2. Lelevich S.V., Velichko I.M., Lelevich V.V. Neurochemical aspects of alcohol intoxication. *Zurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2016; 15(4): 375–80. (in Russian)
3. Evseev V.A. *Antibodies to neurotransmitters in the mechanisms of neuroimmunopathology. [Antitela k neyromediatoram v mekhanizmaxh neuroimmunopatologii]*. Moscow; RAMN; 2007. (in Russian)
4. Dolgo-Saburov V.B., Petrov A.N., Lisitskiy D.S., Belyaev V.A. 2011. Central neurochemical effects of acute and chronic effects of ethanol. Mechanisms of tolerance. *Toksikologiya*. 2011; 12: 1423-36. (in Russian)
5. Lelevich S.V. Molecular mechanisms of alcohol intoxication. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2016; 2: 64-8. (in Russian)
6. Vostryakov V.V., Pavlenko V.P., Shabanov P.D. Molecular mechanisms of alcohol intoxication. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2004; 3(3): 18-55. (in Russian)
7. Trevisan L, Fitzgerald LW, Brose N, Gasic GP, Heinemann SF, Duman RS, Nestler EJ. Chronic ingestion of ethanol upregulates NMDAR1 receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus. *J. Neurochem*. 1994; 62(4): 1635-8.
8. Syvolap Yu.P. Antidepressants in the treatment of alcoholism. *Zhurnal Nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2012; 5(2): 32-5. (in Russian)
9. Krylov E.N. Depressive disorders in patients with alcohol dependence. *Narkologiya*. 2004; 4: 42-9. (in Russian)
10. Sudan Passad Neupane Neuroimmune interface in the comorbidity between alcohol use disorder and major depression. *Frontiers in Immunology*. 2016; doi:10.3389/fimmu.2016.00655.
11. Fahlke C., Berggren U., Berglund K. Etal. Neuroendocrine assessment of serotonergic, dopaminergic, noradrenergic functions in alcohol-dependent individuals. *Alcohol Clin. Exp. Res*. 2012; 36(1): 97-103.
12. Ansel T. Hillmer, Graeme F. Mason, Lisa M. Fucito, Stephanie S. O'Malley, and Kelly P. Cosgrove How Imaging Glutamate, GABA, and Dopamine. Can Inform the Clinical Treatment of Alcohol Dependence and Withdrawal. *Alcohol. Clin. Exp Res*. 2015; 39(12): 2268–82. doi: 10.1111/acer.12893
13. Smulevich A.B. *Depression in General Medicine. Guide for doctors. [Depressii v obshchey meditsine. Rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow; Med. inform. agentstvo; 2001. (in Russian)
14. Fulton T. Crews, Colleen J Lawrimore, T. Jordan Walter, Leon G. Coleman Jr. The Role of Neuroimmune Signaling in Alcoholism. *Neuropharmacology*. 2017; 122: 56–73. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.01.031.
15. Vetrile L.A., Nevidimova T.I., Masterova E.I., Bokhan N.A., Zakharova I.A., Savochkina D.N., Fomina V.G., Davydova T.V. Antibodies to neurotransmitters are neuroimmune markers in personalized prevention of addiction diseases. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(3): 31-7. (in Russian)
16. Davydova T.V., Vetrile L.A., Vetlugina T.P., Nevidimova T.I., Bokhan N.A., Batukhtina E.I. et al. Antibodies to neurotransmitters as possible neuroimmune markers of the risk of the formation of dependence on psychoactive substances. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2013; 61(3): 13-6. (in Russian)

Сведения об авторах:

Ветрилэ Лучия Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Невидимова Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии «НИИ психического здоровья» Томского НИМЦ РАН;

Давыдова Татьяна Викторовна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Захарова Ирина Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Савочкина Дарья Николаевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии «НИИ психического здоровья» Томского НИМЦ РАН;

Галкин С.А., аспирант лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии «НИИ психического здоровья» Томского НИМЦ РАН;

Бохан Николай Александрович, акад. РАН, доктор мед. наук, проф., Заслуженный деятель науки РФ, директор «НИИ психического здоровья» Томского НИМЦ РАН, руководитель отд-ния аддиктивных состояний.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.831-005.4

Авдеев Д.Б., Степанов С.С., Акулинин В.А., Степанов А.С., Шоронова А.Ю., Самсонов А.А.

Реорганизация астроцитов гиппокампа белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий

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

Цель исследования – изучение астроцитов гиппокампа белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. **Методика.** Используются гистологические (окраска гематоксилином и эозином, по Нисслю), иммуногистохимические (*GFAP*, *MAP-2*, *Ki-67*) методы и морфометрия. На тонких (4 мкм) серийных фронтальных срезах гиппокампа изучены астроциты и нейроны через 6 ч, 1, 3, 7, 14 и 30 сут после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. Контролем служили ложнооперированные животные. На каждый срок было использовано по 5 крыс. Для получения дополнительной количественной информации о пространственной организации астроцитарных и нейронных сетей использован фрактальный анализ (ImageJ 1.52; плагин FracLac 2.5). Статистические гипотезы проверяли непараметрическими критериями. **Результаты.** Показано, что после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий отмечалась значительная гетерогенность и гетерохронность изменений астроцитов в разных слоях гиппокампа. Через 1 и 3 сут после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий, в результате очаговой деструкции и фрагментации тонких отростков, фрактальная размерность астроцитарной сети гиппокампа статистически значимо уменьшалась, а лакуарность увеличивалась (сравнение с контролем). Через 3 сут (локально, на фоне активации процессов пролиферации) и через 7, 14, 30 сут (во всех слоях гиппокампа) после окклюзии отмечались признаки реактивного астроглиоза – высокая относительная площадь GFAP-позитивного материала и фрактальная размерность были выше, а лакуарность ниже контроля. Происходило равномерное заполнение фрактального пространства всех слоев гиппокампа отростками астроцитов. **Заключение.** Таким образом, после острой ишемии, вызванной 20-минутной окклюзией общих сонных артерий, получены новые данные о закономерностях качественных и количественных изменений реактивных астроцитов гиппокампа. Эти изменения нами расцениваются как проявление естественной защиты нервной ткани головного мозга в реперфузионном периоде.

Ключевые слова: острая ишемия; гиппокамп; астроциты; нейроны; иммуногистохимия; *GFAP*, *MAP-2*, *Ki-67*; морфометрия; фрактальный анализ; крысы Wistar.

Для цитирования: Авдеев Д.Б., Степанов С.С., Акулинин В.А., Степанов А.С., Шоронова А.Ю., Самсонов А.А. Реорганизация астроцитов гиппокампа белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 13-22.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.13-22

Для корреспонденции: Авдеев Дмитрий Борисович, e-mail: avdeev86@inbox.ru

Финансирование. Данная работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» № 14 от 15.12.2017 г. и внутреннего гранта ФГБОУ ВО «Омского государственного медицинского университета» № 574 от 24.11.2017 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.05.2019

Avdeev D.B., Stepanov S.S., Akulinin V.A., Stepanov A.S., Shoronova A.Yu., Samsonov A.A.

Astrocytes reorganization in the rat hippocampus following a 20-min occlusion of common carotid arteries

Omsk State Medical University,
Lenina Str. 12, Omsk 644099, Russian Federation

Aim. To study hippocampal astrocytes of Wistar rats following a 20-min occlusion of common carotid arteries (OCCA).

Method. Histological (Nissl hematoxylin and eosin staining), immunohistochemistry (*GFAP*, *MAP-2*, *Ki-67*), and morphometry were used. Astrocytes and neurons were studied in thin (4 μm) serial frontal sections of the hippocampus from control rats (sham-operated animals) and at 6 h, and at one, three, 7, 14, and 30 days ($n = 5$ in each group) of OCCA. Fractal analysis was used to obtain additional quantitative information about spatial organization of astrocyte and neuronal networks (ImageJ 1.52; plugin FracLac 2.5). Statistical hypotheses were tested using nonparametric criteria.

Results and discussion. The study showed significant heterogeneity and heterochronicity of changes in the spatial organization of astrocytes in different layers of the hippocampus after OCCA. The fractal dimension (*FD*) of hippocampal astrocyte network was significantly reduced whereas the lacunarity (*L*) was increased compared to the control on days 1 and 3 following OCCA as

a result of focal destruction and fragmentation of thin processes. Signs of reactive astrogliosis evident as a large relative area of GFAP-positive material, FD greater and L lower than the control were observed on day 3, locally and on the background of activated proliferation, and on days 7, 14, and 30, in all layers of the hippocampus. The fractal space was uniformly filled with astrocyte processes in all hippocampal layers.

Conclusion. The study produced new data on qualitative and quantitative changes in hippocampal reactive astrocytes after acute ischemia induced by 20-min OCCA. We interpret these changes as a reflection of natural defense of the cerebral nervous tissue during reperfusion.

Keywords: acute ischemia; hippocampus; astrocytes; neurons; immunohistochemistry; *GFAP*, *MAP-2*, *Ki-67*; morphometry; fractal analysis; Wistar rats.

For citation: Avdeev D.B., Stepanov S.S., Akulinin V.A., Stepanov A.S., Shoronova A.Yu., Samsonov A.A. Astrocytes reorganization in the rat hippocampus following a 20-min occlusion of common carotid arteries. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 13-22. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.13-22

For correspondence: Avdeev Dmitry Borisovich, DVM, Senior Lecturer of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University, E-mail: avdeev86@inbox.ru

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

Received 16.05.2019

Введение

Изучению нейроглиальных клеток в головном мозге млекопитающих в норме и при различных патологических состояниях уделяется большое внимание. Астроциты имеют специфическую архитектуру, функции и иммунореактивность, модулируют синаптическую передачу в возбуждающих глутаматергических синапсах, контролируют процесс реорганизации межнейронных отношений [1-7].

Установлено, что при черепно-мозговой травме, ишемии, нейродегенерации изменяется функция и морфология реактивных астроцитов. В остром периоде отмечается отек тела и отростков астроцитов, затем – компенсаторная гиперплазия и гипертрофия с удлинением и утолщением отростков, смещением ядра к периферии, усилением экспрессии глиального фибриллярного белка *GFAP* и индукцией пролиферации. В зависимости от характера патологического воздействия, реакция астроглии может быть очаговой, диффузной или смешанной [7, 8]. В литературе широко обсуждаются морфофункциональные особенности реактивных и атрофических астроцитов. Реактивные изменения астроцитов влияют на состояние и выживаемость нейронов [1, 4]. Однако особенности ремоделирования астроцитов требуют дальнейшего изучения [4].

Ранее нами показано, что после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА) развивались умеренные диффузно-очаговые патологические, адаптивные и репаративные изменения нервной ткани [3, 9]. Однако определение количества, площади, периметра астроцитов, диаметра и длины их отростков не дают необходимой количественной информации об их

пространственной организации, а более сложные методы 3D-реконструкции малодоступны. Для решения проблемы предлагается использование фрактального анализа [8, 10].

Фрактальный анализ предназначен для количественного описания любых сложных фракталоподобных структур, каковыми, в частности, по данным литературы, являются нейроны и глиальные клетки нервной ткани, имеющие древовидную повторяющуюся организацию [8, 10-12]. В процессе фрактального анализа с помощью специальной программы рассчитывается фрактальная размерность (FD) – показатель (коэффициент) заполнения нервной ткани (фрактального пространства) астроцитами или нейронами (фрактальные структуры). Дополнительно рассчитывается лакуарность (L) – показатель неоднородности распределения фрактальных структур. В совокупности эти показатели позволяют оценить сложность пространственной организации фрактальных структур. Данный метод ранее применялся для изучения клеток нервной ткани в норме и после патологического воздействия [8, 11, 12]. Однако астроциты исследовались преимущественно при грубой патологии – после очаговых некротических изменений, когда отмечались выраженные проявления патологического периферического астроглиоза [8].

Цель исследования – изучение астроцитов различных слоев гиппокампа крыс линии Wistar в динамике после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий.

Методика

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» и одобре-

на этическим комитетом университета (протокол № 83 от 14 октября 2016 г.). В качестве экспериментальных животных использовали крыс Wistar массой 180–200 г. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями Международного комитета по работе с лабораторными животными, поддержанными ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей».

Острую 20-минутную ишемию мозга моделировали путем окклюзии общих сонных артерий (ООСА, двух сосудистая модель неполной глобальной ишемии без гипотонии) на фоне премедикации (сульфат атропина 0,1 мг/кг, подкожно) и общей анестезии (Zoletil 100, 10 мг/кг). Состояние животных в послеоперационном периоде оценивалось в баллах с учетом особенностей исследования физиологии и патофизиологии головного мозга [13].

После ООСА материал для исследования брали через 6ч, 1, 3, 7, 14, 30 сут. Было использовано по 5 животных на каждый срок. Контролем служили 5 ложнопереоперированных крыс. Головной мозг фиксировали перфузией 4% раствора параформа в 0,1 М фосфатном буфере (рН – 7,4) через восходящую часть дуги аорты. Блоки заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®) с помощью автомата для гистологической проводки карусельного типа «STP 120». Серийные фронтальные срезы гиппокампа толщиной 4 мкм готовили из участка мозга на уровне (-)2,40 – (-)4,36 мм от Bregma [14]. Использовали санный микротом HM 450 (Thermo) с электронным контролем толщины среза. Препараты готовили из каждого 10-го серийного среза (по 5 на каждый случай, по 25 – на срок).

Для обзорного гистологического исследования гиппокампа срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Ниссля. Астроциты выявляли с помощью иммуногистохимической реакции на глиальный фибриллярный белок (*GFAP*), а нейроны – реакцией на ассоциированный с микротрубочками белок (*MAP-2*). Срезы помещали на полилизиновые стекла. В качестве первичных антител использовали моноклональные мышинные антитела (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Для визуализации *GFAP* астроцитов, *MAP-2* нейронов и ядер пролиферирующих клеток (*Ki-67*) использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). После реакции с первичными антителами срезы последовательно инкубировали с вторичными антителами, затем хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол.

Препараты фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1,4×1,4 μm), изображение сохраняли в файлах с расширением tiff (2592×1944 пикселей). Для достижения максимальной контрастности и четкости мелких отростков астроцитов в Photoshop CC проводили коррекцию изображения с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость). Дальнейшее морфометрическое исследование астроцитов проводили на масках 8-битовых черно-белых изображений (объектив ×40) с использованием программы ImageJ 1.52. Фрактальный анализ полученных изображений осуществляли с помощью плагина FracLac 2.5 (Box Counting Sampling Methods). В основе метода лежит разделение изображений нейронов или глиальных клеток на квадратные ячейки все меньшего размера с подсчетом числа квадратов, включающих часть анализируемой структуры [12].

Определяли относительную площадь *GFAP*- и *MAP2*-позитивного материала в поле зрения (по 80 полей зрения на каждый срок), фрактальную размерность (*FD* – показатель заполнения пространства фрактальной структурой) и лакуарность (*L* – мера неоднородности заполнения пространства фрактальной структурой) для нейронов и астроцитов. Уменьшение *FD* свидетельствует об упрощении структуры клеток (например, о разрушении отростков), увеличение – об усложнении структуры (гипертрофия и разветвление отростков). Чем выше *L*, тем больше в поле зрения обнаруживалось асимметричных зон без хромогена (*GFAP* или *MAP-2* негативных структур). Повышение показателя *L* выше контроля, свидетельствовало о мелкоочаговом повреждении цитоскелета нейронов или астроцитов. Снижение показателя *L*, свидетельствовало о гипертрофии и равномерном разветвлении отростков [8].

Проверку статистических гипотез проводили с помощью непараметрических критериев Mann-Whitney U-test (парное сравнение между группами и сроками), Wilcoxon signed-rank test (парного сравнения разных отделов одной и той же группы) и Kruskal-Wallis test (сравнения нескольких сроков). Применение непараметрической статистики было связано с небольшим размером выборок, разным характером распределения в вариационных рядах и неравенством дисперсий при сравнении групп. Характер распределения определяли с помощью критерия χ^2 и Колмогорова-Смирнова. Материал представлен как медиана (*Me*) нижний (*Ql*) и верхний (*Qu*) квартили (StatSoft Statistica 8.0) [15]. В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При иммуногистохимическом светооптическом исследовании фронтальных срезов гиппокампа при малом увеличении выявлено неоднородное распределение GFAP-позитивного материала: максимальное в белом ве-

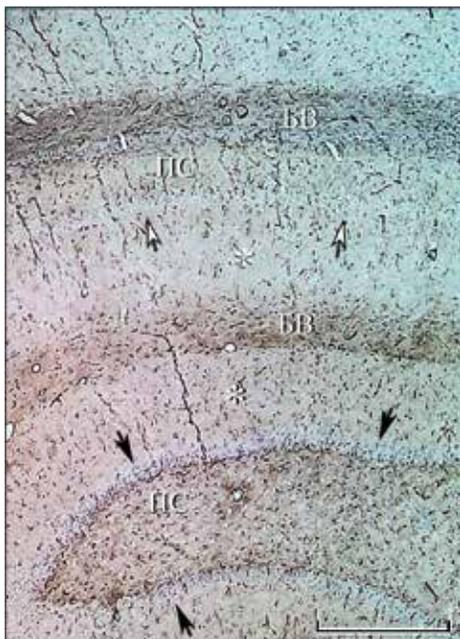


Рис. 1. Фронтальный срез головного мозга на уровне гиппокампа, контроль: послойное распределение хромогена. Белые стрелки – слой тел пирамидных нейронов поля CA1; черные стрелки – слой тел зернистых клеток зубчатой фасции; * – молекулярные слои поля CA1 и зубчатой фасции; БВ – белое вещество; ПС – полиморфный слой. Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP, докраска гематоксилином. Объектив: ×4, шкала – 500 мкм.

ществе, далее – в полиморфном и молекулярном слоях и минимальное – в слой пирамидных нейронов (рис. 1).

GFAP-позитивный материал выявлялся преимущественно в телах и отростках волокнистых (фиброзных) астроцитов, расположенных вокруг нейронов (рис. 2, а-г). Эти астроциты имели древовидную организацию: небольшое тело, длинные слабоветвистые отростки с очень высокой плотностью хромогена (рис. 2, б). В поле CA3 выявлялась светлая зона (*stratum lucidum*), которая состояла из апикальных дендритов пирамидных нейронов и гигантских синаптических терминалей, сформированных аксонами мшистых волокон (рис. 2, в). Вокруг терминалей располагались мелкие отростки астроцитов (рис. 2, г).

Слой тел пирамидных нейронов (рис. 2, б) гиппокампа почти не имел астроцитов, тогда как молекулярный и полиморфный слои содержали мало нейронов (рис. 2, а, в) и много астроцитов (рис. 2, б, г). В *stratum radiatum* CA1 волокнистые астроциты имели характерные вытянутые отростки (рис. 2, б).

В отличие от волокнистых (рис. 3, а) для протоплазматических (рис. 3, б) астроцитов было характерно относительно крупное тело, толстые короткие первичные отростки с неровными контурами, рыхлое заполнение хромогеном. Очень мелкие астроцитарные отростки выглядели как хаотический рисунок с невысокой оптической плотностью хромогена (рис. 3, б).

Плотность глиальной (GFAP) и нейронной (MAP-2) сетей в различных слоях CA1 статистически значительно различались. При этом в нервной ткани в 2–3 раза преобладали структуры нейронов (табл. 1).

По данным фрактального анализа, показатели заполнения нервной ткани астроцитами (фрактальной

Таблица 1

Относительная площадь (%) частиц хромогена при иммуногистохимическом выявлении элементов глиальной (GFAP) и нейронной (MAP-2) сетей различных слоев поля CA1 у животных контрольной группы, Me (Q1-Q3)

Слои гиппокампа	Окраска	
	GFAP (глиальная сеть)	MAP-2 (нейронная сеть)
Молекулярный слой (<i>stratum lacunorum</i>)	18,9 (12,6–21,2) <i>p</i> =0,04 ¹	41,8 (36,5–44,3) <i>p</i> =0,01 ¹ <i>p</i> =0,001 ²
Молекулярный слой (<i>stratum radiatum</i>)	21,4 (17,5–23,1) <i>p</i> =0,01 ¹	40,9 (33,6–48,9) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ²
Слой пирамидных нейронов	14,2 (12,1–18,2)	55,9 (48,6–58,1) <i>p</i> =0,001 ²
Полиморфный слой	25,2 (20,2–31,7) <i>p</i> =0,001 ¹	52,9 (49,5–56,3) <i>p</i> =0,001 ²

Примечание. ¹ – различия статистически значимы в сравнении со слоем пирамидных нейронов, ² – в сравнении с глиальной сетью (Wilcoxon signed-rank test) при *p* < 0,05.

структурой) в контроле также статистически значимо различались (табл. 2). При этом в молекулярном слое мера лакуарности сети астроцитов была минимальной. Все это свидетельствовало о том, что именно в данном слое гиппокампа локализовалась основная масса отростков астроцитов.

Во всех слоях гиппокампа *FD* для нейронной сети (*MAP-2*) была статистически значимо выше, чем для глиальной сети (*GFAP*). Нейронная сеть имела также низкие значения лакуарности. Это свидетельствовало о более высокой плотности и равномерности рас-

пределения отростков нейронов, в сравнении с астроцитами, и подтверждало данные по относительной площади *GFAP*- и *MAP-2*-позитивных структур (табл. 1, 2). Таким образом, фрактальный анализ позволил дополнительно оценить форму и распределение сложных структур (нейроны, астроциты) в нервной ткани.

После ООСА выявлялись отдельные клетки-тени и большое количество темных несморщенных и пикноморфных нейронов (рис. 4, а). Через 30 сут постишемического периода дефицит нейронов в поле СА1 составил 33,0%, СА3 – 17,4%, СА4 – 5,3%, в зубчатой фас-

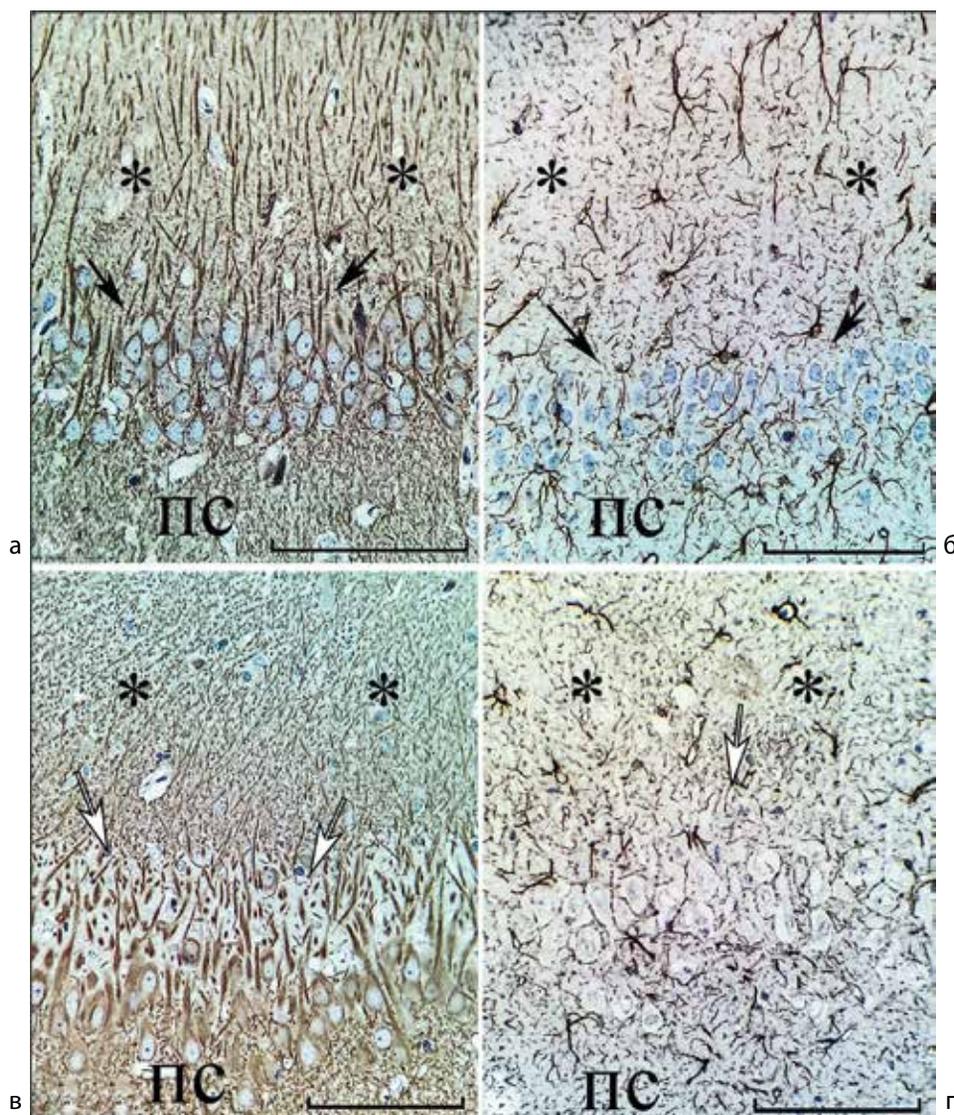


Рис. 2. Поле СА1 (а, б) и СА3 (в, г) гиппокампа в норме: а – слой тел пирамидных нейронов (черные стрелки) и апикальные дендриты *stratum radiatum* молекулярного слоя; б – *GFAP*-позитивный материал в молекулярном слое, слое тел пирамидных нейронов (черные стрелки) и полиморфном слое (ПС); в – слой тел пирамидных нейронов, *stratum lucidum* (белые стрелки) молекулярного слоя; г – *GFAP*-позитивный материал в *stratum lucidum* (белые стрелки), слое тел пирамидных нейронов и ПС. * – молекулярный слой, ПС – полиморфный слой. Окраска: иммуногистохимическая реакция на *MAP-2* (а, в) и *GFAP* (б, г), докраска гематоксилином. Объектив: $\times 40$, шкала – 100 мкм.

ции значимых изменений не выявлено. При этом нейроглиальный индекс в гиппокампе (в целом для всех слоев, окраска по Ниссляу) после ООСА статистически значимо (Kruskal-Wallis test, $p < 0,01$) увеличивался по сравнению с контролем: через 3 сут в 1,8 раза, 7 сут – 2,3 раза, 14 сут – 2,0 раза и через 30 сут – в 1,3 раза. Это происходило за счет уменьшения общей численной плотности нейронов с одной стороны и пролиферации астроцитов с другой стороны. Самая высокая пролиферативная активность астроцитов (*Ki-67*) гиппокампа отмечалась через 3 сут после ООСА. Отростки волокнистых астроцитов гипертрофировались (рис. 4, б), что свидетельствовало о реактивных изменениях [8].

В остром периоде (6 ч, 1 и 3 сут) в результате отека-набухания отмечалась деструкция и фрагментация

тонких отростков. На 7-е сут плотность астроцитарной сети восстанавливалась и даже увеличивалась в молекулярном, полиморфном слоях и внутри слоя пирамидных нейронов. Максимально подобные изменения астроцитов проявлялись через 7 и 14 сут и сохранялись через 30 сут (рис. 5, а, б). При этом отмечалась высокая плотность элементов (*MAP-2*) нейронной сети (рис. 5, в). Все это, по данным литературы, свидетельствовало о проявлениях реактивного астроглиоза на фоне высокой сохранности нейронов [7, 8].

По данным фрактального анализа, в динамике постшемического периода выявлены статистически значимые изменения всех переменных, характеризующих распределение элементов глиальной сети гиппокампа (Kruskal-Wallis test, $p < 0,05$). Через 1 и 3 сут после ОО-

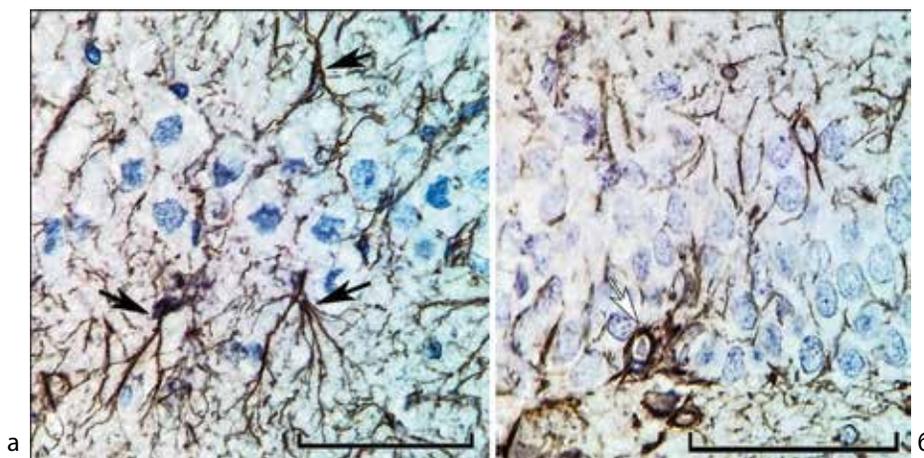


Рис. 3. Поле CA1 (а) и зубчатая фасция (б) гиппокампа в норме. Черные стрелки – волокнистые астроциты в молекулярном и полиморфном слоях поля CA1 (а); белая стрелка – протоплазматический астроцит в слое зернистых клеток зубчатой фасции (б); * – тела нейронов. Окраска: иммуногистохимическая реакция на *GFAP*, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$, шкала – 100 мкм.

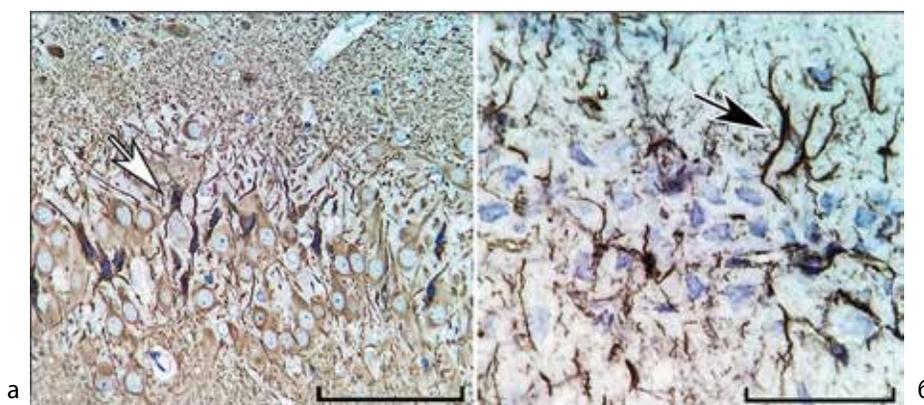


Рис. 4. Поле CA3 гиппокампа через 6 ч (а) и 3 сут. (б) после ООСА: появление большого количества пикноморфных нейронов (а – белая стрелка), гипертрофия отростков волокнистых астроцитов (б – черная стрелка). Окраска: иммуногистохимическая реакция на *MAP-2* (а) и *GFAP* (б), докраска гематоксилином. Объектив: $\times 40$, шкала – 100 мкм (а); $\times 100$, шкала – 50 мкм (б).

СА, в сравнении с контролем, *FD* уменьшалась, а лакунарность отростков астроцитов увеличивалась. Это, вероятно, свидетельствовало об очаговой деструкции и фрагментации части тонких отростков – появлении *GFAP*-негативных зон (табл. 3 и 4).

Через 7 и 14 сут после ООСА (в сравнении с контролем, 1-и и 3-и сут) фрактальная размерность для *GFAP*-позитивного материала статистически значимо увеличивалась во всех слоях гиппокампа, а лакунарность уменьшалась (табл. 3 и 4). Это свидетельствова-

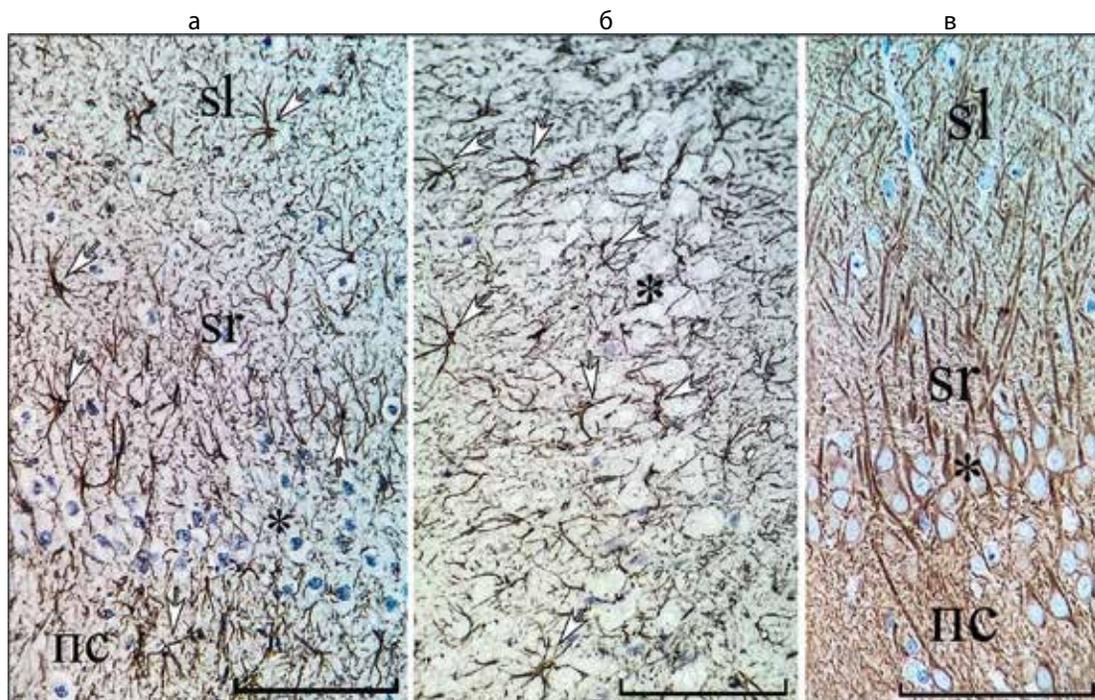


Рис. 5. Поля CA1 (а, в) и CA3 (б) гиппокампа через 14 (а, в) и 30 (б) сут после ООСА: а – высокая плотность распределения разветвленных гиперпролиферированных волокнистых астроцитов (белые стрелки) в *stratum radiatum*, *stratum lacunosum* молекулярного слоя и полиморфном слое; б – волокнистые астроциты (белые стрелки) в слое тел пирамидных нейронов; в – нейроны и их дендриты в поле CA1. * – слои тел пирамидных нейронов, ПС – полиморфный слой, sr – *stratum radiatum*, sl – *stratum lacunosum*. Окраска: иммуногистохимическая реакция на *GFAP* (а, б) и *MAP-2* (в), докраска гематоксилином. Объектив: $\times 40$, шкала – 100 мкм.

Таблица 2

Показатели фрактального анализа элементов глиальной (*GFAP*) и нейронной (*MAP-2*) сетей различных слоев поля CA1 у животных контрольной группы, *Me (Q1-Q3)*

Показатели фрактального анализа	Слои гиппокампа		
	Молекулярный слой	Слой пирамидных нейронов	Полиморфный слой
<i>GFAP</i>			
Фрактальная размерность (<i>FD</i>)	1,65 (1,63–1,72)	1,54 (1,49–1,57) $p=0,01^1$	1,62 (1,58–1,67) $p=0,04^2$
Лакунарность (<i>L</i>)	0,49 (0,42–0,51)	0,60 (0,58–0,72) $p=0,001^1$	0,70 (0,62–0,73) $p=0,01^1$
<i>MAP-2</i>			
Фрактальная размерность (<i>FD</i>)	1,79 (1,74–1,83) $p=0,001^3$	1,78 (1,73–1,81) $p=0,001^3$	1,77 (1,71–1,84) $p=0,001^3$
Лакунарность (<i>L</i>)	0,39 (0,33–0,41) $p=0,01^3$	0,31 (0,29–0,37) $p=0,03^1$ $p=0,001^3$	0,28 (0,25–0,34) $p=0,01^1$ $p=0,001^3$

Примечание. ¹ – различия статистически значимы в сравнении с молекулярным слоем, ² – в сравнении со слоем пирамидных нейронов (Wilcoxon signed-rank test), ³ – между *GFAP* и *MAP-2* (Wilcoxon signed-rank test) при $p < 0,05$.

Таблица 3

Фрактальная размерность глиальной (GFAP) сети различных слоев поля CA1 у животных в контроле и после ООСА, Ме (Q1-Q3)

Группы	Слой гиппокампа		
	<i>Stratum radiatum</i>	Пирамидных нейронов	Полиморфный
Контроль	1,65 (1,63–1,72)	1,54 (1,49–1,57) <i>p</i> =0,01 ¹	1,62 (1,58–1,67) <i>p</i> =0,04 ²
После ООСА, сутки			
1	1,68 (1,61–1,70)	1,12 (0,98–1,23) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ³	1,72 (1,45–1,73) <i>p</i> =0,001 ²
3	1,53 (1,49–1,65) <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,04 ⁴	1,37 (1,25–1,45) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	1,61 (1,52–1,65) <i>p</i> =0,001 ² <i>p</i> =0,02 ⁴
7	1,78 (1,75–1,88) <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	1,55 (1,47–1,59) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ⁴	1,72 (1,71–1,78) <i>p</i> =0,02 ³ <i>p</i> =0,001 ² <i>p</i> =0,01 ⁴
14	1,82 (1,74–1,85) <i>p</i> =0,001 ³	1,66 (1,54–1,69) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,01 ⁴	1,78 (1,72–1,82) <i>p</i> =0,001 ² <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,04 ⁴
30	1,81 (1,71–1,83) <i>p</i> =0,001 ³	1,76 (1,68–1,79) <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,01 ⁴	1,80 (1,65–1,83) <i>p</i> =0,001 ³

Примечание. ¹ – различия статистически значимы в сравнении с молекулярным слоем (*Stratum radiatum*), ² – слоем пирамидных нейронов (Wilcoxon signed-rank test), ³ – контролем, ⁴ – предыдущим сроком (Mann-Whitney U-test) при *p* < 0,05.

Таблица 4

Лакунарность глиальной (GFAP) сети различных слоев поля CA1 у животных в контроле и после ООСА, Ме (Q1-Q3)

Группы	Слой гиппокампа		
	<i>Stratum radiatum</i>	Пирамидных нейронов	Полиморфный
Контроль	0,49 (0,42–0,51)	0,60 (0,58–0,72) <i>p</i> =0,001 ¹	0,70 (0,62–0,73) <i>p</i> =0,01 ¹ ; <i>p</i> =0,001 ²
После ООСА, сутки			
1	0,69 (0,51–0,71) <i>p</i> =0,001 ³	1,32 (1,16–1,35) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ³	0,52 (0,46–0,65) <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,02 ¹ <i>p</i> =0,001 ²
3	0,54 (0,51–0,56) <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	0,87 (0,68–0,89) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	0,72 (0,58–0,75) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,01 ² <i>p</i> =0,001 ⁴
7	0,35 (0,29–0,43) <i>p</i> =0,01 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	0,50 (0,45–0,59) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,02 ³ <i>p</i> =0,001 ⁴	0,54 (0,48–0,61) <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,01 ¹ <i>p</i> =0,001 ⁴
14	0,36 (0,31–0,40) <i>p</i> =0,001 ³	0,66 (0,60–0,68) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,01 ⁴	0,52 (0,46–0,55) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,01 ² <i>p</i> =0,001 ³
30	0,32 (0,29–0,38) <i>p</i> =0,001 ³	0,53 (0,51–0,62) <i>p</i> =0,001 ¹ <i>p</i> =0,001 ⁴	0,43 (0,41–0,51) <i>p</i> =0,03 ¹ <i>p</i> =0,001 ³ <i>p</i> =0,02 ⁴

Примечание. ¹ – различия статистически значимы в сравнении с молекулярным слоем (*Stratum radiatum*), ² – слоем пирамидных нейронов (Wilcoxon signed-rank test), ³ – контролем, ⁴ – предыдущим сроком (Mann-Whitney U-test) при *p* < 0,05.

ло о равномерном увеличении степени заполнения нервной ткани отростками астроцитов. В пользу последнего свидетельствовали и данные о том, что относительная площадь *GFAP*-позитивного материала в *stratum radiatum* увеличивалась от 21,4% (17,5–23,1%) в контроле до 28,5% (23,1–32,0%) через 14 сут после ООСА ($p = 0,001$). В полиморфном слое – от 25,2% (20,2–31,7%) до 33,4% (28,5–37,9%) ($p = 0,01$; Mann-Whitney U-test).

Таким образом, в остром периоде после ООСА во всех слоях гиппокампа происходила очаговая деструкция отростков астроцитов. Через 7, 14 и 30 сут отмечалась реактивная гиперплазия астроцитарной сети (астроглиоз), которая, вероятно, обеспечивала высокую сохранность нейронной сети (*MAP-2*). Получены данные о гетерогенности и гетерохронности изменений пространственной организации астроцитов различных слоев гиппокампа. Последнее необходимо учитывать при анализе феномена селективности изменений нервной ткани гиппокампа в постишемическом периоде.

Заключение

Таким образом, наряду с определением площади *GFAP*-позитивного материала, фрактальный анализ позволил оценить степень сложности (фрактальная размерность) и равномерности (лакунарность) распределения отростков астроцитов в различных слоях гиппокампа. В остром периоде после ООСА астроцитарная сеть становилась более фрагментарной (неравномерно окрашенной на *GFAP*). Это проявлялось уменьшением фрактальной размерности и значительным увеличением лакунарности. Причиной деструкции отростков астроцитов были отек и набухание с разрушением цитоскелета. Подобные изменения показаны и в исследованиях других авторов [1, 2, 8].

С помощью фрактального анализа выявлена количественная гетерогенность и гетерохронность изменений пространственной организации астроцитарных отростков в молекулярном, полиморфном слоях и слое пирамидных нейронов. Более лабильными и реактивными оказались отростки астроцитов молекулярного слоя. В отдаленном периоде (30 сут) после ООСА выявлялись очаговые скопления волокнистых астроцитов. Это было особенно характерно для *stratum radiatum* молекулярного слоя и полиморфного слоя. В этот период мера структурной сложности глиальных сетей была выше, чем в контроле и раннем постишемическом периоде. Однако в нашем исследовании увеличение количества волокнистых астроцитов не следует рассматривать как патологический астроглиоз, свой-

ственный для ишемического и геморрагического инсульта [7, 8]. Выявленные нами реактивные изменения пространственной организации астроцитов происходили на фоне сохранения структуры нейронных сетей (*MAP-2*). Поэтому полученные данные скорее свидетельствовали об активации естественных защитных функций астроглии, направленных на сохранение и восстановление поврежденных нейронов.

Новые количественные данные об особенностях изменения степени сложности и равномерности распределения отростков астроцитов различных слоев гиппокампа в динамике после 20-минутной ООСА могут быть использованы для оценки значимости особенностей реорганизации нервной ткани гиппокампа и структурных механизмов естественной защиты нейронов за счет реактивного астроглиоза.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Степанов С.С., Авдеев Д.Б.

Сбор и обработка материала – Степанов А.С., Авдеев Д.Б.

Статистическая обработка – Степанов С.С., Акулинин В.А.

Написание текста – Акулинин В.А., Степанов С.С.,

Редактирование – Шоронова А.Ю., Самсонов А.А.

Литература

1. Becerra-Calixto A., Cardona-Gómez G.P. The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: Potential in Cell Therapy. *Front Mol Neurosci.* 2017 Apr 3; 10(159): 88.
2. Mohn T.C., Koob A.O. Adult astrogenesis and the etiology of cortical neurodegeneration. *J. Exp. Neurosci.* 2015; 9: 25–34.
3. Степанов А.С., Акулинин В.А., Мыщик А.В., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии. *Общая реаниматология.* 2017; 12(4): 6–17.
4. Plata A., Lebedeva A., Denisov P., Nosova O., Postnikova T.Y., Pimashkin A. et al. Astrocytic atrophy following status epilepticus parallels reduced Ca^{2+} activity and impaired synaptic plasticity in the rat hippocampus. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jun 26; 11: 215.
5. Luo Y., Xu N. G., Yi W. et al. Study on the correlation between synaptic reconstruction and astrocyte after ischemia and the influence of electroacupuncture on rats. *Chin. J. Integr. Med.* 2011; 17(10): 750–7.
6. Rose C. R., Felix L., Zeug A. et al. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* 2018; 10(451): 1–20.
7. Ostergaard P.J., Jensen M.B. Histological quantification of astrocytosis after cerebral infarction: A systematic review. *Int. J. Neurosci.* 2013; 123(7): 439–43.
8. Pirici D., Mogoantă L., Mărgărețescu O., Pirici I., Tudorică V., Coconu M. Fractal analysis of astrocytes in stroke and dementia. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2009; 50(3): 381–90.
9. Степанов А.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Клеточные системы восстановления и утилизации поврежденных нейронов головного мозга белых крыс после 20-минутной ок-

- клюзии общих сонных артерий. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2017; 103(10): 1135–47.
10. Smith T.G. Jr., Lange G.D., Marks W.B. Fractal methods and results in cellular morphology. *J. Neurosci. Methods*. 1996; 69: 1123–6.
 11. Исаева В.В., Пушина Е.В., Каретин Ю.А. Изменения морфометрических показателей и фрактальной размерности нейронов спинного мозга в онтогенезе сими *Oncorhynchus masou*. *Биология моря*. 2006; 32(2): 125–33.
 12. Karperien A., Ahammer H., Jelinek H.F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci.* 2013; 7(3): 1–18.
 13. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*. М.; Высшая школа; 1991.
 14. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
 15. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. СПб; Питер; 2003.
 5. Luo Y., Xu N. G., Yi W. et al. Study on the correlation between synaptic reconstruction and astrocyte after ischemia and the influence of electroacupuncture on rats. *Chin. J. Integr. Med.* 2011; 17(10): 750–7.
 6. Rose C.R., Felix L., Zeug A. et al. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* 2018; 10(451): 1–20.
 7. Ostergaard P.J., Jensen M.B. Histological quantification of astrogliosis after cerebral infarction: A systematic review. *Int. J. Neurosci.* 2013; 123(7): 439–43.
 8. Pirici D., Mogoantă L., Mărgăritescu O., Pirici I., Tudorică V., Coconu M. Fractal analysis of astrocytes in stroke and dementia. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2009; 50(3): 381–90.
 9. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Avdeev D.B. Cellular systems for the recovery and recycling of damaged brain neurons in white rats after a 20-minute occlusion of common carotid arteries. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2017; 103(10): 1135–47. (in Russian)
 10. Smith T.G. Jr., Lange G.D., Marks W.B. Fractal methods and results in cellular morphology. *J. Neurosci. Methods*. 1996; 69: 1123–6.
 11. Isaeva V.V., Pushchina E.V., Karetin Yu.A. Changes in morphometric parameters and fractal dimension of spinal cord neurons in the ontogeny of sims *Oncorhynchus masou*. *Biologiya morya*. 2006; 32(2): 125–33. (in Russian)
 12. Karperien A., Ahammer H., Jelinek H.F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci.* 2013; 7(3): 1–18.
 13. Buresh Y., Bureshova O., Kh'yuston D.P. *Methods and basic experiments for the study of brain and behavior. [Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya]*. Moscow; Vysshaya shkola; 1991. (in Russian)
 14. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
 15. Borovikov V. *Statistica. The art of analyzing data on a computer. [Iskusstvo analiza dannykh na komp'yutere]*. St. Petersburg; Piter; 2003. (in Russian)

References

1. Becerra-Calixto A., Cardona-Gómez G.P. The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: potential in cell therapy. *Front Mol Neurosci*. 2017 Apr 3; 10(159): 88.
2. Mohn T.C., Koob A.O. Adult astrogenesis and the etiology of cortical neurodegeneration. *J. Exp. Neurosci.* 2015; 9: 25–34.
3. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Mytsik A.V., Stepanov S.S., Avdeev D.B. Neuro-glio-vascular complexes of the brain after acute ischemia. *Obshchaya reanimatologiya*. 2017; 12(4): 6–17. (in Russian)
4. Plata A., Lebedeva A., Denisov P., Nosova O., Postnikova T.Y., Pimashkin A., et al. Astrocytic atrophy following status epilepticus parallels reduced Ca²⁺ activity and impaired synaptic plasticity in the rat hippocampus. *Front Mol Neurosci*. 2018 Jun 26; 11: 215.

Сведения об авторах:

Авдеев Дмитрий Борисович, канд. ветеринарных наук, ст. преподаватель каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОГМУ, e-mail: avdeev86@inbox.ru;

Степанов Сергей Степанович, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОГМУ, e-mail: serg_stepanov@mail.ru;

Акулинин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОГМУ, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru;

Степанов Александр Сергеевич, очный аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОГМУ, e-mail: stepan55@yandex.ru;

Шоронова Анастасия Юрьевна, ассистент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОГМУ, e-mail: nastasya1994@mail.ru;

Самсонов Артём Андреевич, студент, ОГМУ, e-mail: artem.samsonov93@gmail.com

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Кожевникова Л.М.^{1,2}, Цорин И.Б.¹, Ионова Е.О.¹, Барчуков В.В.¹, Никифорова Т.Д.¹, Шигабудинова Л.К.¹, Столярчук В.Н.¹, Вититнова М.Б.¹, Колик Л.Г.¹, Дурнев А.Д.¹, Крыжановский С.А.¹

Гендерные особенности изменений состояния сердечно-сосудистой системы при алкогольной кардиомиопатии (экспериментальное исследование)

¹ ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д.8;

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

Цель исследования – изучение гендерных различий в сердечно-сосудистой системе у крыс с алкогольной кардиомиопатией. **Методика.** Алкогольную кардиомиопатию у крыс воспроизводили, предоставляя им в качестве единственного источника питья 10%-ный водный раствор этилового спирта в течение 24 нед. Для оценки размеров левого желудочка сердца и его инотропной функции использовали эхокардиографию. С помощью полимеразной цепной реакции «в реальном времени» определяли экспрессию ряда рецепторов и регуляторных белков в миокарде левого желудочка и грудной аорте.

Результаты. Сравнительный анализ показал, что у интактных самок по сравнению с самцами размеры левого желудочка сердца значительно меньше, в то время как фракции укорочения и выброса выше. Принудительная алкоголизация в течение 24-х нед как у самцов, так и у самок вызывает развитие алкогольной кардиомиопатии, эхокардиографически проявляющейся увеличением размеров левого желудочка сердца и угнетением его сократительной функции. Однако у самок увеличение размеров левого желудочка выражено в значительно большей степени. В биоптатах левого желудочка сердца животных обоего пола изменения уровня экспрессии мРНК рецепторов эндогенных трансмисмиттеров: катехоламинов (β_1 - и β_2 -AR), ангиотензина II (AT1A-R), эндотелина-1 (ETA-R) и регуляторных белков (Eras1, Eras2 и CaM) при алкогольной кардиомиопатии носит однонаправленный характер. В аорте самок повышается экспрессия мРНК ключевых вазоконстрикторных рецепторов (α_1 -R, ETA-R, VIA-R, AT1A-R), тогда как в аорте самцов, напротив снижается.

Заключение. Таким образом, как у самок, так и у самцов крыс 24-недельное систематическое потребление алкоголя приводит к формированию алкогольной кардиомиопатии, однако у самок выявленные патологические изменения прогностически более неблагоприятны.

Ключевые слова: алкогольная кардиомиопатия; самцы; самки; эхокардиография; ПЦР.

Для цитирования: Кожевникова Л.М., Цорин И.Б., Ионова Е.О., Барчуков В.В., Никифорова Т.Д., Шигабудинова Л.К., Столярчук В.Н., Вититнова М.Б., Колик Л.Г., Дурнев А.Д., Крыжановский С.А. Гендерные особенности изменений состояния сердечно-сосудистой системы при алкогольной кардиомиопатии (экспериментальное исследование). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 23-31.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.23-31

Для корреспонденции: Крыжановский Сергей Александрович, доктор мед. наук, зав. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», e-mail: SAK-538@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.07.2019

Kozhevnikova L.M.^{1,2}, Tzorin I.B.¹, Ionova E.O.¹, Barchukov V.V.¹, Nikiforova T.D.¹, Shigabudinova L.K.¹, Stolyaruk V.N.¹, Vititnova M.B.¹, Kolik L.G.¹, Durnev A.D.¹, Kryzhanovskii S.A.¹

Sex-related changes in the cardiovascular system in alcoholic cardiomyopathy. (An experimental study)

¹Zakusov Institute of Pharmacology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia;

²Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

Aim. To study sex-related differences of changes in the cardiovascular system in rats with alcoholic cardiomyopathy (ACMP).

Methods. Alcoholic cardiomyopathy was induced in rats by offering them a 10% aqueous solution of ethyl alcohol as the only source of fluid for 24 weeks. Echocardiography was used to assess the size and inotropic function of the left ventricle. Expression

of receptors and regulatory proteins in the left ventricular myocardium and thoracic aorta was determined using real-time polymerase chain reaction.

Results. Comparative analysis showed that the left ventricle was much smaller in intact females than in males whereas shortening and ejection fractions of the female left ventricle were greater. Forced alcoholization for 24 weeks induced ACMP in both males and females, which was evident on echocardiogram as enlargement of the left ventricle and depression of its contractility. However, the increase in left ventricular size was considerably more pronounced in females. In biopsy samples of the left ventricle, the expression of mRNA of genes for endogenous transmitter receptors [catecholamines (β_1 and β_2 -AR), angiotensin II (AT1-R), endothelin-1 (ETA-R) and regulatory proteins (Epac1, Epac2 and CaM) changed in the same direction in both males and females. The mRNA expression of key vasoconstrictor receptor genes (α_1 -R, VIA-R, AT1A-R) was increased in the female aorta but reduced in the male aorta.

Conclusion. In both female and male rats, the 24-week alcohol consumption on a regular basis resulted in ACMP; however, in females, pathological changes were prognostically more adverse.

Keywords: alcoholic cardiomyopathy; males; females; echocardiography; PCR.

For citation: Kozhevnikova L.M., Tsorin I.B., Ionova E.O., Barchukov V.V., Nikiforova T.D., Shigabudinova L.K., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Kolik L.G., Durnev A.D., Kryzhanovskii S.A. Sex-related changes in the cardiovascular system in alcoholic cardiomyopathy (An experimental study). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 23-31. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.23-31

For correspondence: *Kryzhanovskii Sergey Alexandrovich*, Doctor of Medical Sciences, Head of Laboratory of pharmacological screening, FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", e-mail: SAK-538@yandex.ru.

Information about authors:

Kozhevnikova L.M., <http://orcid.org/0000-0002-1323-6472>

Tsorin I.B., <http://orcid.org/0000-0002-3988-7724>

Ionova E.O., <http://orcid.org/0000-0003-0154-722X>

Barchukov V.V., <http://orcid.org/0000-0003-4229-3107>

Stolyaruk V.N., <http://orcid.org/0000-0002-4779-427X>

Vititnova M.B., <http://orcid.org/0000-0002-7407-7516>

Kolik L.G., <http://orcid.org/0000-0002-9847-8058>

Durnev A.D., <http://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

Kryzhanovskii S.A., <http://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

Acknowledgements. The study had not sponsorship.

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

Received 19.07.2019

Введение

В России хронический алкоголизм является одной из ведущих причин избыточной летальности – 26,6 человек на 100 000 населения [1]. Анализ структуры соматической летальности больных хроническим алкоголизмом свидетельствует о том, что её основной причиной является алкогольная кардиомиопатия (АКМП) [2]. Согласно данным центрального НИИ организации и информатизации здравоохранения и Росстата, смертность у мужчин в возрасте старше 20-60 лет с документально подтвержденным хроническим алкоголизмом от АКМП составляет 51,4-64,3 % от всех аутопсий, тогда как летальность от болезней органов пищеварения, включая цирроз печени, не превышает 16,4-28,8 %. У женщин эти показатели составляют соответственно 46,7-59,7% и 26,6-39,9% [3]. За последние годы летальность от АКМП как у мужчин, так и у женщин постоянно растет [4]. В РФ среди лиц трудоспособного возраста смертность от АКМП выше, чем

от инфаркта миокарда: у мужчин – в 1,8 раза, у женщин – в 7 раз [5]. Не меньшую остроту проблеме придает и тот факт, что у пациентов, страдающих АКМП, внезапная сердечная смерть диагностируется в 30-40 % случаев [6, 7]. Относительная частота развития АКМП у обоих полов одинакова, однако у женщин эта патология формируется в более короткие сроки после начала злоупотребления алкоголем и от меньших доз [8]. Злокачественные нарушения ритма сердца у женщин возникают также при употреблении меньших доз алкоголя [9].

Экспериментальные исследования, посвященные изучению гендерных различий при АКМП, немногочисленны, а интерпретация их результатов не всегда корректна. Например, в работе R.L. Fogle и соавт. у включенных в эксперимент животных через 18 нед потребления этанола значения конечно-систолического и конечно-диастолического размеров левого желудоч-

ка сердца и его инотропной функции не отличались от контроля [10], т.е. отсутствовали патогномичные для сформировавшейся АКМП диагностические признаки сердечной недостаточности.

Ранее нами была разработана трансляционная модель АКМП у крыс, воспроизводящая основные клинико-диагностические признаки этого заболевания, формирующаяся через 24 нед алкоголизации [11].

Цель исследования – сравнительная оценка гендерных особенностей состояния сердечно-сосудистой системы у крыс с сформировавшейся АКМП.

Методика

Животные. Опыты проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 180–200 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали с предоставлением брикетированного корма *ad libitum* при регулируемом 12/12 световом режиме в соответствии с приказом Минздрава России № 199н от 01 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Животные основных и контрольных групп содержались в индивидуальных клетках стандарта Т/3. Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/ЕЕС)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утвержденными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Животных каждого пола рандомизировали на две группы: 1-я – контрольные крысы, которые получали обычный рацион питания: 1-я подгруппа – самцы ($n=9$) и 2-я подгруппа – самки ($n=12$); 2-я – алкоголизованные крысы: 1-я подгруппа – самцы ($n=20$) и 2-я подгруппа – самки ($n=20$).

Модель АКМП. Все животные 2-й группы в качестве единственного источника жидкости получали 10%-ный водный раствор этанола в течение 24 нед. На протяжении всего исследования еженедельно регистрировали количество потребляемого этанола (г/кг). Все живот-

ные этой группы активно потребляли физиологически значимое количество 10%-ного раствора этанола. В пересчете на чистый этанол среднее потребление алкоголя в течение эксперимента, вне зависимости от пола, варьировало в пределах 5,0–6,5 г/кг в сут.

Эхокардиографические исследования. Наркотизированных животных (кетамин 100 мг/кг, в/б) фиксировали в положении на спине. Измерения производили в условиях закрытой грудной клетки и спонтанного дыхания в одномерном М- и двухмерном В-модальных режимах при положении датчика эхокардиографа в парастернальной позиции по длинной оси сердца. В М-модальном режиме оценивали конечно-систолический и конечно-диастолический размеры (КСР и КДР), затем по методу Teichholz рассчитывали показатели сократительной функции сердца – фракцию выброса (ФВ) и фракцию укорочения (ФУ). Оценку эхокардиографических показателей проводили, как минимум, по 5 последовательным сердечным циклам. Все измерения выполняли в соответствии с Рекомендациями Американского общества и Европейской ассоциации по эхокардиографии [12]. В работе использовали цифровой ультразвуковой эхокардиограф DP-6600 с электронным микроконвексным датчиком 65C15EA (6,5/8,0 МГц). Оценку динамики изменений показателей внутрисердечной гемодинамики проводили через 24 нед алкоголизации.

Молекулярные исследования. На следующий день после эхокардиографического исследования животных наркотизировали 25%-ым раствором уретана (4 мл/кг), декапитировали, извлекали грудной отдел аорты и левый желудочек сердца. Образцы тканей отмывали от крови и очищали от соединительной ткани и жира в физиологическом растворе хлорида натрия при +4 °С, затем помещали в раствор RNAlater (США, Ambion) и хранили при температуре -20 °С.

Образцы, извлеченные из раствора RNAlater, гомогенизировали в жидком азоте. Выделение РНК из тканей проводили с помощью набора GeneJET™ («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу производителя. Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Выделенную суммарную РНК для предотвращения контаминации геномной ДНК обрабатывали ДНКазой I («Thermo Fisher Scientific», США). Синтез кДНК проводили с помощью набора RevertAid™ Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific», США). ПЦР-РВ проводили с помощью набора qPCRMix-HS («Евроген», Россия), используя праймеры и флуоресцентные зонды («ДНК-синтез», Россия), согласно протоколам производителей на ам-

плификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). В качестве гена «домашнего хозяйства» был использован ген β-актина.

Анализ результатов ПЦР-РВ. Предварительную обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения, приложенного к прибору. Дальнейшая обработка проводилась в приложении Microsoft Excel с использованием алгоритма 2^{-ΔΔCt}. Расчет уровня матричной РНК (мРНК) проводили с использованием алгоритма $\Delta\Delta Ct$ (Ct), в основу которого положены относительные изменения пороговых циклов (Ct) исследуемого и референсного гена в опытных и контрольных образцах.

Статистический анализ. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка, гомогенность дисперсий проверяли с помощью критерия Левена. Так как распределение данных не отличалось от нормального, а дисперсии выборок были равны, то статистический анализ данных эхокардиографических исследований проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (факторы: пол и потребление алкоголя) с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену-Кейлсу. В молекулярных исследованиях статистическую значимость различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Эхокардиографические исследования. У всех включенных в исследование животных перед рандомизацией эхокардиографические показатели колебались в пределах физиологической нормы. Через 6 мес на-

блюдения у контрольных крыс обоего пола регистрируемые эхокардиографические показатели практически не изменились, отмечалось лишь незначительное (на 0,2-0,4 мм), связанное с увеличением массы и возраста животных, увеличение конечно-систолического и конечно-диастолического размеров (КСР, КДР). Статистический анализ данных выявил у интактных животных значимые гендерные различия, касающиеся как размеров левого желудочка, так и его инотропной функции. Так, если у самцов КСР и КДР больше чем у самок, то ФВ (показатель состояния инотропной функции) у самцов, напротив, меньше (**табл.**).

Согласно данным эхокардиографических исследований, у животных обоего пола через 24 нед. алкоголизации формируется АКМП. Ранее при разработке трансляционной модели АКМП было показано, что результаты эхокардиографических исследований, свидетельствующие о наличии у алкоголизованных животных значимых признаков патогномичной для этой патологии хронической сердечной недостаточности, напрямую коррелируют с результатами морфометрических (дилатация полостей сердца), гистологических (жировая инфильтрация миокарда, полиморфизм кардиомиоцитов и т.д.) и электрофизиологических (снижение электрической стабильности кардиомиоцитов) исследований [11].

Как следует из полученных данных, через 24 нед. алкоголизации как у самцов, так и у самок происходит сопоставимое снижение инотропной функции: так у самцов ФВ снизилась на 17%, у самок – на 20% (**табл.**). В экстраполяции на человека это соответствует сердечной недостаточности с ФВ $\approx 40\%$, т.е. пограничному состоянию между среднетяжелой и тяжелой формой заболевания. Если снижение сократительной функции левого желудочка у самцов и самок сопоставимы, то его дилатация значимо больше у самок. Так,

Таблица

Сравнение эхокардиографических показателей самцов и самок крыс с сформировавшейся АКМП

Группы животных	Пол	КСР, мм	КДР, мм	ФУ, %	ФВ, %
Контрольные крысы, 24 нед	Самцы, n=9	2,07±0,06 p=0,0001	4,12±0,12 p=0,0001	49,7±1,1 p=0,0001	84,1±0,9 p=0,0030
	Самки, n=12	1,29±0,05	2,94±0,07	56,1±0,8	90,9±0,5
Алкоголизованные крысы, 24 нед	Самцы, n=20	3,23±0,07 p=0,0001 p ₁ =0,0001	4,80±0,09 p=0,0186 p ₁ =0,0018	35,7±0,8 p=0,0001 p ₁ =0,0001	69,6±1,1 p=0,0001 p ₁ =0,0001
	Самки, n=20	2,51±0,12 p ₁ =0,0001	4,35±0,15 p ₁ =0,0001	42,7±1,0 p ₁ =0,0001	73,6±1,0 p ₁ =0,0001

Примечание. p – по отношению к самкам в каждой группе животных; p₁ – по отношению к интактным крысам того же пола.

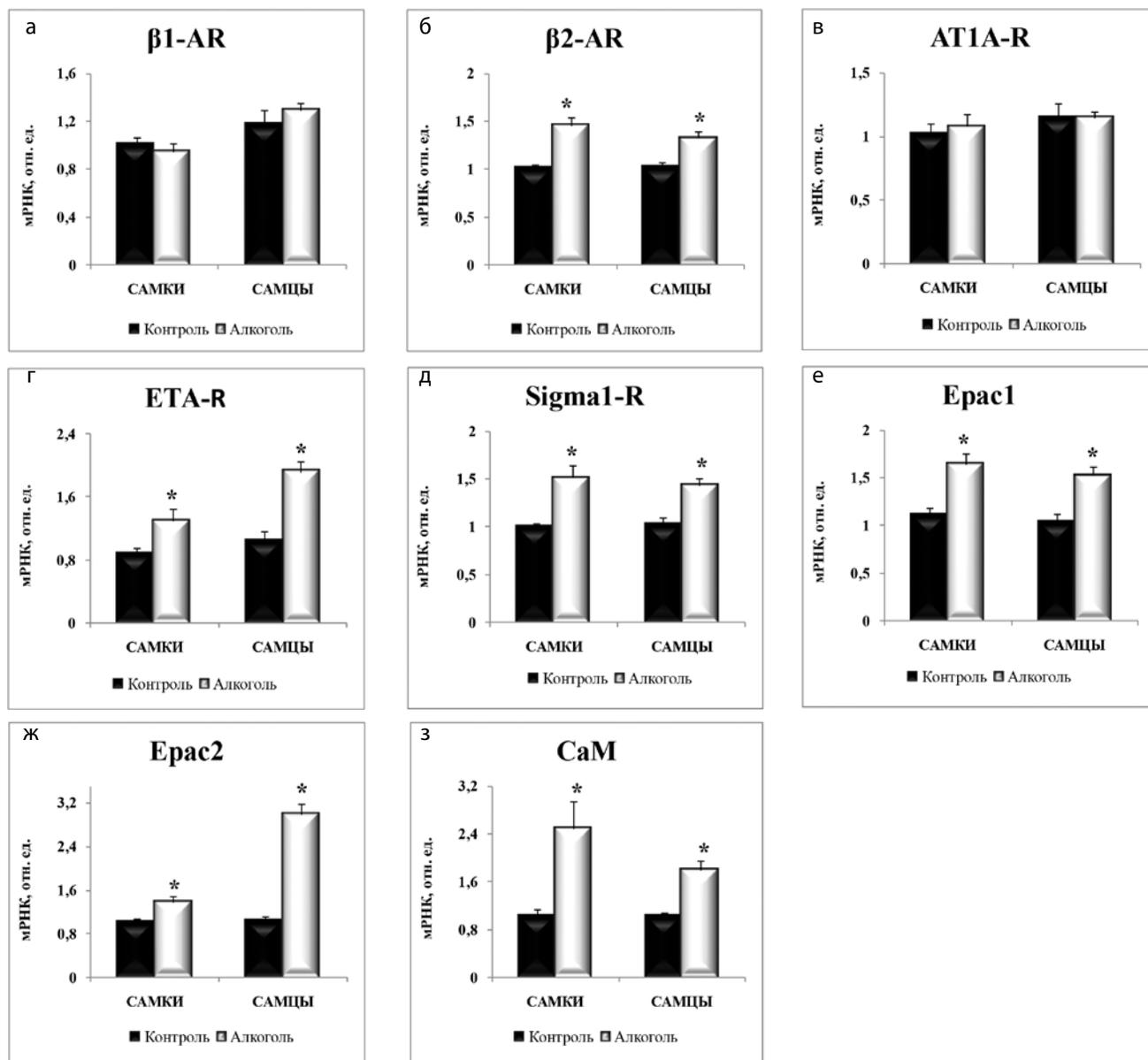


Рис. 1. Изменение уровня мРНК рецепторных и регуляторных белков в левом желудочке сердца самцов и самок крыс при АКМП.

* – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

например, КСР у алкоголизованных самцов по сравнению с контролем увеличен на 56%, а у самок – на 95% (табл.).

Статистическая обработка с помощью двухфакторного дисперсионного анализа полученных результатов свидетельствует о том, что оба изучаемых фактора (пол и потребление алкоголя) оказывают статистически значимое воздействие на геометрию и сократительную функцию сердца.

Молекулярные исследования. Сердце. В биоптатах левого желудочка сердца оценивали уровень экспрессии генов рецепторов эндогенных трансмисмиттеров [катехоламинов (β_1 - и β_2 -AR), ангиотензина II (AT1A-R), эндотелина-1 (ETA-R)], а также сигма₁-рецепторов (σ_1 -R). Помимо этого был оценен уровень экспрессии генов регуляторных белков Ерас1, Ерас2 и кальмодулина (CaM). Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что в миокарде левого желудочка ал-

коголизованных самцов и самок с АКМП не изменяется уровень мРНК β_1 -AR и AT1A-R (рис. 1, а и 1, в), вместе с тем, у крыс обоего пола отмечается значимое по сравнению с контролем увеличение уровня мРНК для:

1 – β_2 -AR (рис. 1, б). Увеличение экспрессии β_2 -AR, возможно, носит компенсаторный характер, поскольку известно, что в условиях формирующейся хронической сердечной недостаточности (ХСН) происходит десенситизация β_1 -AR, что влечет за собой снижение насосной функции левого желудочка, тогда как активация в этих условиях β_2 -AR инициирует увеличение инотропного ответа на катехоламины [13]. Этот кардиопротективный эффект β_2 -AR опосредуется активацией сопряженных с ними не Gs, а Gi сигнальных белков;

2 – ETA-R (рис. 1, г). Хорошо известно, что эндотелин 1 (ET1) в условиях ХСН посредством активации ETA-R инициирует активацию MAP-киназного каскада, приводящую к патологическому ремоделированию

левого желудочка сердца [14] и индуцирует генерацию активных форм кислорода, оказывающих кардиодепрессивное/кардиотоксическое действие [15];

3 – σ_1 -R (рис. 1, д). Полагают, что σ_1 -R являются своего рода «ремонтными» белками, которые поддерживают протеостаз и защищают клетки от протеотоксического стресса, регулируют процессы, ответственные за поддержание гомеостаза ионов Ca^{2+} и энергообразующей функции митохондрий [16-19]. Увеличение их плотности в кардиомиоцитах в наших экспериментах носит, скорее всего, компенсаторный, но явно недостаточный характер;

4 – белки Eras1 (рис. 1, е). Хорошо известно, что вторичным мессенджером сигнальной трансдукции от β -AR является cAMP, эффекторами которого помимо протеинкиназы A являются и относительно недавно открытые регуляторные белки Eras. В кардиомиоцитах идентифицированы две изоформы этих белков – Eras1 и Eras2. В физиологических условиях белки Eras1 играют важную роль в регуляции инотропной функции

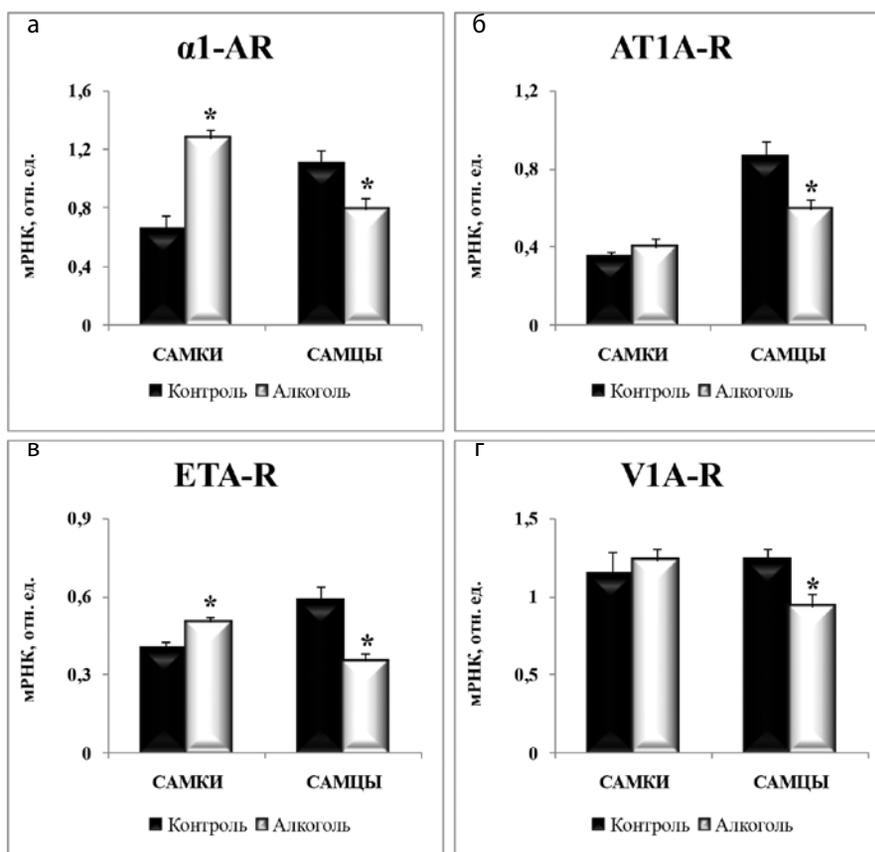


Рис. 2. Изменение уровня мРНК рецепторов эндогенных вазоконстрикторов в аорте самцов и самок крыс при АКМП.

* – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

сердца, процессов межклеточного сопряжения кардиомиоцитов, апоптоза и т.д. [20-22]. Вместе с тем, показано, что избыточная экспрессия белков Eras1 влечет за собой снижение инотропной функции и фиброз миокарда и, в конечном итоге, инициирует патологическое ремоделирование левого желудочка сердца и развитие ХСН [23-25];

5 – белки Eras2 (рис. 1, ж). Роль белков Eras2 в регуляции физиологических функций кардиомиоцитов окончательно не ясна, однако имеются убедительные данные о том, что увеличение их экспрессии в кардиомиоцитах левого желудочка сердца влечет за собой развитие злокачественных нарушений сердечного ритма, обусловленное диастолической утечкой ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, аномальным увеличением интенсивности позднего Na^+ тока, избыточной экспрессией коннексонов Sx43 в области щелевых контактов кардиомиоцитов и аномальной активностью трансмембранных потенциалзависимых K^+ каналов [25, 26];

6 – CaM (рис. 1, з). За последние годы накоплен убедительный материал, свидетельствующий о ключевой роли CaM в генезе ремоделирования миокарда и аритмогенеза при ХСН [27, 28, 29]. Нарушение сократительного статуса миокарда обусловлено способностью CaM вызывать перегрузку кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} [30], а CaM-обусловленная активация CaMKII, которая фосфорилирует как RyR2, так и IP_3R саркоплазматического ретикулума, инициирует аритмогенез [31].

Таким образом, в миокарде как самцов, так и самок с АКМП протекают однонаправленные патологические процессы, инициирующие ремоделирование миокарда, развитие ХСН и снижение электрической стабильности миокарда.

Сосуды. В биоптатах грудного отдела аорты оценивали уровень экспрессии генов рецепторов эндогенных вазоконстрикторов [катехоламинов (α_1 -AR), ангиотензина II (AT1A-R), вазопрессина (V1A-R) и эндотелина-1 (ETA-R)]. В результате проведенного исследования были выявлены гендерные различия в динамике изменения экспрессии генов вазоконстрикторных рецепторов у крыс с АКМП, которые проявлялись в следующем:

1 – α_1 -AR (рис. 2, а). У самцов с АКМП экспрессия мРНК α_1 -AR, по сравнению с контролем, значимо ($p < 0,05$) снижена, тогда как у самок, напротив, существенно увеличена ($p < 0,0036$);

2 – AT1A-R (рис. 2, б). У самцов с АКМП экспрессия мРНК AT1A-R также значимо ($p < 0,05$) снижена, у самок наблюдается увеличение, хотя и статистически не значимое (на 18%);

3 – ETA-R (рис. 2, в). У самцов с АКМП экспрессия мРНК ETA-R по сравнению с контролем значимо ($p < 0,05$) уменьшается, тогда как у самок, напротив, увеличивается ($p = 0,008$);

4 – V1A-R (рис. 2, г). Экспрессия мРНК V1A-R у самцов с АКМП значимо снижена (\approx на 25%); у самок, хотя и не значимо, увеличена.

Полученные в этой серии экспериментов результаты свидетельствуют о том, что у самцов с АКМП в аорте значимо снижается экспрессия мРНК для α_1 -AR, AT1A-R, ETA-R и V1A-R, активация которых инициирует вазоконстрикцию, что можно рассматривать как компенсаторную, приспособительную реакцию, направленную на снижение постнагрузки на поврежденный токсическим действием алкоголя миокард. У самок наблюдается противоположная картина, поскольку у них значимо увеличена экспрессия мРНК таких ключевых вазоконстрикторных рецепторов как α_1 -AR, ETA-R и наблюдается отчетливая тенденция к увеличению экспрессии V1A-R и AT1A-R. Полученные данные позволяют предположить, что у самок крыс увеличена постнагрузка на миокард, что естественно, способствует усилению тяжести патологического процесса. Нельзя исключить и того, что более интенсивная дилатация полости левого желудочка, выявленная у самок с АКМП при эхокардиографическом исследовании, в той или иной мере связана с увеличением постнагрузки на миокард.

Таким образом, сравнительный анализ особенностей изменения эхокардиографических показателей и экспрессии рецепторных и регуляторных белков в биоптатах тканей миокарда и грудной аорты свидетельствует о том, что у самок с АКМП выявленные патологические изменения прогностически более неблагоприятны, чем у самцов. Полученные результаты экспериментальных исследований согласуются с клиническими наблюдениями, указывающими на то, что у женщин, страдающих хроническим алкоголизмом, патологические изменения со стороны сердечно-сосудистой системы более выражены.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Крыжановский С.А., Кожевникова Л.М., Колик Л.Г.

Сбор и обработка материала – Кожевникова Л.М., Столярук В.Н., Ионова Е.О., Вититнова М.Б., Барчуков В.В., Никифорова Т.Д., Шигабудинова Л.К.

Статистическая обработка – Цорин И.Б., Кожевникова Л.М.

Написание текста – Крыжановский С.А., Кожевникова Л.М.

Редактирование – Дурнев А.Д.

Литература

1. Бохан Н.А., Мандель А.И., Максименко Н.Н., Михалева Л.Д. Смертельные исходы при алкогольной зависимости. *Наркология*. 2007; (12): 37-40.
2. Никитина С.Ю., Козеева Г.М. Совершенствование статистики смертности от алкоголизма. *Вопросы статистики*. 2006; (11): 21-3.
3. Семенова В.Г., Антонова О.И., Евдокушкина Г.Н. Гаврилова Н.С. Потери населения России в 2000-2008 гг., обусловленные алкоголем: масштабы, структура, тенденции. *Социальные аспекты здоровья населения: электронный научный журнал*. 2010. 01 июля [Электронный ресурс]. URL: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/188/27/>
4. Гервальд В.Я., Спицын П.С., Привалихина А.В. и др. Алкогольная кардиомиопатия по данным аутопсийных исследований. *Современные проблемы науки и образования*. 2016; (3). <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24561>.
5. Панова Е., Тимонин С. Смертность от болезней системы кровообращения в России и Москве в свете новых мировых тенденций. *Московская медицина*. 2017; 4(19): 57-64.
6. Чазов Е.И. *Внезапная смерть*. 2013. [Электронный ресурс]. <http://www.medicusamicus.com/index.php?action=2x1229x1>
7. Roerecke M., Rehm J. Alcohol use disorders and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Addiction*. 2013; 108(9): 1562-78.
8. Fernandez-Solo J., Estruch R., Nicolas J.-M. et al. Comparison of alcoholic cardiomyopathy in women versus men. *Am. J. Cardiol*. 1997; 80: 481-5.
9. Pfeiffer D., Jurisch D., Neef M., Hagendorff A. Alcohol and arrhythmias. *Herz*. 2016; 41(6): 498-502.
10. Fogle R.L., Hollenbeak C.S., Stanley B.A. et al. Functional proteomic analysis reveals sex-dependent differences in structural and energy-producing myocardial proteins in rat model of alcoholic cardiomyopathy. *Physiol. Genomics*. 2011; 43(7): 346-56.
11. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Колик Л.Г. и др. Трансляционная модель алкогольной кардиомиопатии. *Молекулярная медицина*. 2015; (3): 40-7.
12. Lang R.M., R.M., Bierig M., Devereux R.B. et al.; Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J. Am. Soc. Echocardiogr*. 2005; 18: 1440-63.
13. Xiao R.P., Zhang S.J., Chakir K. et al. Enhanced G(i) signaling selectively negates beta2-adrenergic receptor (AR) but not beta1-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation*. 2003; 108(13): 1633-9.
14. Lehmann L.H., Rostovsky J.S., Buss S.J. et al. Essential role of sympathetic endothelin A receptors for adverse cardiac remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(37): 13499-504.
15. Archer C.R., Robinson E.L., Drawnel F.M., Roderick H.L. Endothelin-1 promotes hypertrophic remodelling of cardiac myocytes by activating sustained signalling and transcription downstream of endothelin type A receptors. *Cell. Signal*. 2017; 36: 240-54.
16. Середенин С. Б., Воронин М. В. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009; 72(1): 3-11.
17. Maurice T., Su T.P. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Ther.* 2009; 124(2): 195-206.
18. Tagashira H., Bhuiyan M.S., Fukunaga K. Diverse regulation of IP3 and ryanodine receptors by pentazocine through σ 1-receptor in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2013; 305(8): H1201-12.
19. Abdullah C.S., Alam S., Aishwarya R. et al. Cardiac dysfunction in the Sigma 1 receptor knockout mouse associated with impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics. *J. Am. Heart Assoc*. 2018; 7(20): e009775.
20. Oestreich E.A., Wang H., Malik S. et al. Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca2+ mobilization in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem*. 2007; 282(8): 5488-95.
21. Duquesnes N., Derangeon M., Métrich M. et al. Epac stimulation induces rapid increases in connexin43 phosphorylation and function without preconditioning effect. *Pflugers. Arch*. 2010; 460(4): 731-41.
22. Kwak H.J., Park K.M., Choi H.E. et al. PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways. *Cell. Signal*. 2008; 20(5): 803-14.
23. Bissierier M., Blondeau J.P., Lezoualc'h F. Epac proteins: specific ligands and role in cardiac remodeling. *Biochem. Soc. Trans*. 2014; 42(2): 257-64.
24. Insel P.A., Murray F., Yokoyama U. et al. cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br. J. Pharmacol*. 2012; 166(2): 447-56.
25. Laudette M., Zuo H., Lezoualc'h F., Schmidt M. Epac function and cAMP scaffolds in the heart and lung. *J. Cardiovasc. Dev. Dis*. 2018; 5(1). pii: E9.
26. Hothi S.S., Gurung I.S., Heathcote J.C., Zhang Y. et al. Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart. *Pflugers. Arch*. 2008; 457(2): 253-70.
27. Tham Y.K., Bernardo B.C., Ooi J.Y. et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch. Toxicol*. 2015; 89(9): 1401-38.
28. Walweel K., Oo Y.W., Laver D.R. The emerging role of calmodulin regulation of RyR2 in controlling heart rhythm, the progression of heart failure and the antiarrhythmic action of dantrolene. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2017; 44(1): 135-42.
29. Кожевникова Л.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н. и др. Оценка экспрессии генов рецепторных и регуляторных белков в миокарде крыс с хронической сердечной недостаточностью. *Пат. физиол. и эксперим. терапия*. 2018; 62(4): 28-35.
30. Ruiz-Hurtado G., Morel E., Domínguez-Rodríguez A. et al. Epac in cardiac calcium signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2013; 58: 162-71.
31. Mustroph J., Neef S., Maier L.S. CaMKII as a target for arrhythmia suppression. *Pharmacol. Ther.* 2017; 176: 22-31.

References

1. Bohan N.A., Mandel' A.I., Maksimenko N.N., Mihaleva L.D. Deaths in alcohol dependence. *Narkologiya*. 2007; (12): 37-40. (in Russian)
2. Nikitina S.Yu., Kozeeva G.M. Improving alcohol mortality statistics. *Voprosy statistiki*. 2006; (11): 21-3. (in Russian)
3. Semenova V.G., Antonova O.I., Evdokushkina G.N. Gavrilo N.S. The loss of the population of Russia in 2000-2008, due to alcohol: the scale, structure, trends.. *Social'nye aspekty zdorov'ya naseleniya: elektronnyj nauchnyj zhurnal*. 2010. 01 iyulya [Electronic resource]. URL: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/188/27/>. (in Russian)
4. Gervald V.Ya., Spicyn P.S., Privalihina A.V. i dr. Alcoholic cardiomyopathy according to autopsy research. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; (3). <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24561>. (in Russian)

5. Panova E., Timonin S. Mortality from circulatory system diseases in Russia and Moscow in the light of new global trends. *Moskovskaya meditsina*. 2017; 4(19): 57-64. (in Russian)
6. Chazov E.I. *Sudden death*. 2013. [Electronic resource]. <http://www.medicusamicus.com/index.php?action=2x1229x1>. (in Russian)
7. Roerecke M., Rehm J. Alcohol use disorders and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Addiction*. 2013; 108(9): 1562-78.
8. Fernandez-Solo J., Estruch R., Nicolas J.-M. et al. Comparison of alcoholic cardiomyopathy in women versus men. *Am. J. Cardiol.* 1997; 80: 481-485.
9. Pfeiffer D., Jurisch D., Neef M., Hagendorff A. Alcohol and arrhythmias. *Herz*. 2016; 41(6): 498-502.
10. Fogle R.L., Hollenbeak C.S., Stanley B.A. et al. Functional proteomic analysis reveals sex-dependent differences in structural and energy-producing myocardial proteins in rat model of alcoholic cardiomyopathy. *Physiol. Genomics*. 2011; 43(7): 346-56.
11. Kryzhanovskii S.A., Kolik L.G., Tsorin I.B. et al. Translation model of alcoholic cardiomyopathy. *Mol. Med.* 2015; (3): 40-7.
12. Lang R.M., R.M., Bierig M., Devereux R.B. et al.; Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2005; 18: 1440-63.
13. Xiao R.P., Zhang S.J., Chakir K. et al. Enhanced G(i) signaling selectively negates beta2-adrenergic receptor (AR) but not beta1-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation*. 2003; 108(13): 1633-9.
14. Lehmann L.H., Rostoks J.S., Buss S.J. et al. Essential role of sympathetic endothelin A receptors for adverse cardiac remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(37): 13499-504.
15. Archer C.R., Robinson E.L., Drawnel F.M., Roderick H.L. Endothelin-1 promotes hypertrophic remodelling of cardiac myocytes by activating sustained signalling and transcription downstream of endothelin type A receptors. *Cell. Signal*. 2017; 36: 240-54.
16. Seredenin S.B., Voronin M. V. Neuroreceptor mechanisms of the afobazole effect. *Eksp. Klin. Farmakol.* 2009; 72(1): 3-11.
17. Maurice T., Su T.P. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Ther.* 2009; 124(2): 195-206.
18. Tagashira H., Bhuiyan M.S., Fukunaga K. Diverse regulation of IP3 and ryanodine receptors by pentazocine through σ_1 -receptor in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013; 305(8): H1201-12.
19. Abdullah C.S., Alam S., Aishwarya R. et al. Cardiac dysfunction in the Sigma 1 receptor knockout mouse associated with impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics. *J. Am. Heart Assoc.* 2018; 7(20): e009775.
20. Oestreich E.A., Wang H., Malik S. et al. Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca2+ mobilization in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(8): 5488-95.
21. Duquesnes N., Derangeon M., Métrich M. et al. Epac stimulation induces rapid increases in connexin43 phosphorylation and function without preconditioning effect. *Pflugers. Arch.* 2010; 460(4): 731-41.
22. Kwak H.J., Park K.M., Choi H.E. et al. PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways. *Cell. Signal*. 2008; 20(5): 803-14.
23. Bissier M., Blondeau J.P., Lezoualc'h F. Epac proteins: specific ligands and role in cardiac remodeling. *Biochem. Soc. Trans.* 2014; 42(2): 257-64.
24. Insel P.A., Murray F., Yokoyama U. et al. cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 166(2): 447-56.
25. Laudette M., Zuo H., Lezoualc'h F., Schmidt M. Epac function and cAMP scaffolds in the heart and lung. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2018; 5(1): pii: E9.
26. Hothi S.S., Gurung I.S., Heathcote J.C., Zhang Y. et al. Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart. *Pflugers. Arch.* 2008; 457(2): 253-70.
27. Tham Y.K., Bernardo B.C., Ooi J.Y. et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch. Toxicol.* 2015; 89(9): 1401-38.
28. Walweel K., Oo Y.W., Laver D.R. The emerging role of calmodulin regulation of RyR2 in controlling heart rhythm, the progression of heart failure and the antiarrhythmic action of dantrolene. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2017; 44(1): 135-42.
29. Kozhevnikova L.M., Tsorin I.B., Stolyaruk V.N. et al. The evaluation of expression of receptor and regulatory proteins genes in the myocardium of rats with chronic heart failure. *Patologicheskaya Fiziologiya I Experimental'naya terapiya*. 2018; 62(4): 28-35. (in Russian)
30. Ruiz-Hurtado G., Morel E., Domínguez-Rodríguez A. et al. Epac in cardiac calcium signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013; 58: 162-71.
31. Mustroph J., Neef S., Maier L.S. CaMKII as a target for arrhythmia suppression. *Pharmacol. Ther.* 2017; 176: 22-31.

Сведения об авторах:

Кожевникова Любовь Михайловна, доктор мед. наук, зав. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП; вед. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Цорин Иосиф Борисович, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Ионова Екатерина Олеговна, мл. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Барчуков Владимир Валерьевич, науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Никифорова Татьяна Дмитриевна, лаборант-исследователь лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Шигабудинова Лиля Константиновна, лаборант-исследователь лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Столярук Валерий Николаевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Виттнова Марина Борисовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Колук Лариса Геннадьевна, доктор биол. наук, проф. РАН, зав. лаб. фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Дурнев Андрей Дмитриев, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. лаб. лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Крыжановский Сергей Александрович, доктор мед. наук, зав. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова».

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.12-008.331

Шерстнев В.В.¹, Грудень М.А.¹, Сенько О.В.², Кузнецова А.В.³, Карлина В.П.⁴, Рыжов В.М.⁴

Гендерные особенности содержания в сыворотке крови молекулярных маркеров артериальной гипертензии при развитии предгипертонии

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина», 125315, г. Москва, Россия, Балтийская ул., д. 8;

²Вычислительный центр имени А.А. Дородницына РАН Федерального исследовательского центра «Информатика и управление» РАН, 119333, г. Москва, Россия, ул. Вавилова, д. 40;

³ФГБНУ Институт биохимической физики РАН имени Н.М. Эмануэля РАН, 19334, г. Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4;

⁴ФГБУЗ «Медико-санитарная часть № 170» Федерального медико-биологического агентства, 141070, г. Королёв, Россия, «Подлипки», ул. Ленина, д. 2

Цель исследования – изучение гендерных особенностей содержания в сыворотке крови молекулярных маркеров артериальной гипертензии у мужчин и женщин с «оптимальным» артериальным давлением и предгипертонией.

Методика. Обследовано 115 лиц мужского ($n=49$) и женского пола ($n=66$) в возрасте 48-49 лет с «оптимальным» давлением, ($AD \leq 120/80$ мм рт. ст., $n=63$), и предгипертонией ($AD 120-139/80-89$ мм рт. ст., $n=52$). С помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием оригинальных и коммерческих тест-систем в сыворотке крови определяли содержание биомаркеров: пептидов, ангиотензина II, HLOF24, белков S100b, эндотелина и аутоантител к ним, а также васкулоэндотелиального фактора роста сосудов. Методами математического анализа проведено сравнение содержания биомаркеров у мужчин и женщин с «оптимальным» АД и предгипертонией.

Результаты. В сыворотке крови мужчин и женщин с «оптимальным» АД и предгипертонией обнаружены статистически значимые различия в содержании ряда молекулярных маркеров. У мужчин с предгипертонией по сравнению с лицами мужского пола, имеющими «оптимальное» АД, документировано значимое повышение содержания эндотелина и титров аутоантител к белку S100b. Вместе с тем, у женщин с предгипертонией выявлено статистически значимое снижение содержания ангиотензина II. Как у мужчин, так и у женщин в сыворотке крови обнаружено статистически высоко значимое снижение уровня пептида HLOF24 при предгипертонии по сравнению с лицами, имеющими «оптимальное» АД.

Заключение. Документированные гендерные особенности содержания биомаркеров в крови отражают, по-видимому, ключевые молекулярные события при развитии предгипертонии у мужчин и женщин в исследованной возрастной когорте. Полученные результаты представляют интерес для понимания патогенеза предгипертонии и разработки методов её персонализированной коррекции.

Ключевые слова: биомаркеры; предгипертония; «оптимальное» артериальное давление; гендерные различия.

Для цитирования: Шерстнев В.В., Грудень М.А., Сенько О.В., Кузнецова А.В., Карлина В.П., Рыжов В.М. Гендерные особенности содержания в сыворотке крови молекулярных маркеров артериальной гипертензии при развитии предгипертонии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 62(4):32-38.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.32-38

Для корреспонденции: Шерстнев Владимир Вячеславович, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр., зав. лаб. ФГБНУ НИИ НФ им. П.К. Анохина, e-mail: sherstnev.vv@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФИ (ОГН), проект № 17-06-00707.

Поступила 09.07.2019

Sherstnev V.V.¹, Gruden M.A.¹, Senko O.V.², Kuznetsova A.V.³, Karlina V.P.⁴, Ryzhov V.M.⁴

Gender-related features of serum levels of molecular markers for arterial hypertension during development of prehypertension

¹P. K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia;

²A.A. Dorodnitsyn Computing Center at the Informatics and Management Federal Research Center, Vavilova Str. 40, Moscow 119333, Russia;

³N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Kosygina Str. 4, Moscow 119334, Russia;

⁴Health and Medical Unit No. 170 of the Federal Medical and Biological Agency, Lenina Str. 2, Podlipki, Korolev 141070, Russia

The aim of the study was to investigate features of the content of serum molecular markers for arterial hypertension in men and women with "optimal" blood pressure (BP) and prehypertension.

Methods. The study evaluated 115 males (n = 49) and females (n = 66) aged 47.6 ± 0.7 with an "optimal" BP (120/80 mm Hg, n = 63) and prehypertension (120-139 / 80-89 mm Hg, n = 52). Serum concentrations of biomarkers, including peptides, angiotensin II, HLD24, S100b protein, endothelin, and respective autoantibodies, and vascular endothelial vascular growth factor, were measured using ELISA with original and commercial kits. Serum concentrations of biomarkers were compared in men and women with "optimal" BP and prehypertensive subjects using mathematical analysis.

Results. Serum concentrations of some molecular markers were significantly different in men and women with "optimal" BP and prehypertension. Endothelin levels and autoantibody titers to S100b were higher for men with prehypertension than with "optimal" BP. Furthermore, prehypertensive women had a significantly lower level of angiotensin II. However, both prehypertensive men and women had highly significant decreases in the level of HLD24 compared to individuals with "optimal" BP.

Conclusion. The observed gender features of biomarker levels apparently reflect key molecular events during the development of prehypertension in men and women of the studied age cohort. The study results are of interest for understanding pathogenetic mechanisms of prehypertension and for development of methods for its individualized correction.

Keywords: biomarkers, prehypertension, «optimal» blood pressure, gender differences.

For citation: Шерстнев В.В., Грудень М.А., Сенько О.В., Кузнецова А.В., Карлина В.П., Рыжов В.М. Гендерные особенности содержания в сыворотке крови молекулярных маркеров артериальной гипертензии при развитии предгипертензии. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 32-38. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.32-38

For correspondence: *Sherstnev Vladimir Vyacheslavovich*, MD, professor, chief researcher, Head of functional neurochemistry laboratory, Federal State Budgetary Scientific Institution «P.K. Anochin Research Institute of normal physiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, E-mail: sherstnev.vv@yandex.ru

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

Acknowledgments. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Department of Humanities and Social Sciences. Grant N17-06-00707

Received 09.07.2019

Введение

Поиск и изучение диагностических и прогностических молекулярных маркеров предгипертензии (ПГ) является актуальным и перспективным направлением современной стратегии профилактики артериальной гипертензии (АГ) и других сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), основанной на персонализированной предикции заболевания [1, 2].

Лица с артериальным давлением (АД) в диапазоне 120-139/80-89 мм рт. ст. (ПГ) составляет от 20 до 50% от общего числа населения в различных странах с отчетливой тенденцией к постоянному росту и омоложению контингента. Риски развития АГ и ССЗ, а также увеличение числа летальных исходов от сердечно-сосудистых заболеваний у лиц с ПГ значимо выше по сравнению с лицами, имеющими оптимальное АД (менее 120/80 мм рт. ст.) [3-5].

В развитии и течении ПГ у мужчин и женщин имеются определенные различия. Доказано, что распространенность ПГ среди мужчин существенно более высокая, по сравнению с женщинами. Мужчины с ПГ имеют большее количество факторов риска ССЗ и более молодой возраст, чем женщины с ПГ. Однако у

женщин с ПГ в периоде постменопаузы отмечается более высокая смертность от сердечно-сосудистых заболеваний по сравнению с мужчинами аналогичного возраста. Мужчины и женщины с ПГ характеризуются также качественными различиями факторов риска, в частности, у женщин преобладают «метаболические» детерминанты развития ПГ [6-8].

В исследовании, проведенном нами ранее, было документировано, что развитие ПГ у женщин по сравнению с мужчинами характеризуется более выраженными изменениями структуры взаимосвязей между показателями факторов риска ССЗ. В сыворотке крови у мужчин и женщин с различными категориями АД обнаружены различия в содержании ряда молекулярных маркеров – участников ключевых молекулярных процессов регуляции физиологических систем поддержания оптимального уровня АД [9, 10].

Таким образом, изучение гендерных особенностей биомаркеров АГ при формировании ПГ представляется актуальным как для понимания патогенеза предгипертензии, так и для разработки методов молекулярной предикции АГ и ССЗ.

Цель исследования – изучение гендерных особенностей содержания в сыворотке крови молекулярных маркеров артериальной гипертензии у мужчин и женщин с «оптимальным» артериальным давлением и предгипертензией.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинской декларацией, «Рекомендациями для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей» Всемирной медицинской ассоциации и одобрено комиссией по этике ФГБНУ «НИИНФ им. П.К. Анохина». У всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Проведено обследование 115 человек (49 мужчин и 66 женщин), в возрасте 47 – 48 лет, находящихся на диспансерном наблюдении. Были сформированы группы лиц с «оптимальным АД» (АД < 120/80 мм рт. ст., 27 мужчин и 36 женщин) и с ПГ (АД 120/80–139/89 мм рт. ст., 22 мужчины и 30 женщин), что соответствует категориям «нормальное АД» и «высокое АД» согласно Российской классификации [11].

В сыворотке крови обследуемых определяли содержание следующих молекулярных факторов: ангиотензина II (АнгII), пептида HLDF24 (HLDF24), эндотелина-1 (ЭТ), белка S100b (S100b), уровень аутоантител (АТ) к АнгII (АТАнгII), к HLDF24 (АТHLDF24), к ЭТ (АТЭТ) и к белку S100b (АТС100b), а также содержание васкулоэндотелиального фактора роста сосудов (VEGF). Указанные факторы могут рассматриваться в качестве биомаркеров АГ [9].

Содержание HLDF24 (нг/мл), S100b (нг/мл) и уровень АТ к ним, выраженный в титрах, определяли методом гетерогенного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [10, 12]. Концентрацию АнгII (пг/мл), ЭТ (пМ/мл), и VEGF (пг/мл) определяли методом конкурентного ИФА с использованием коммерческих наборов (RayBiotech Inc., Biomedica). Титры АТ к АнгII и ЭТ выявляли с помощью ИФА, используя синтетический конъюгат АнгII с БСА и очищенный препарат ЭТ (Sigma, USA). Клинические и лабораторные исследования были выполнены в соответствии с Российскими клиническими рекомендациями по диагностике и лечению артериальной гипертензии [11].

Статистический анализ результатов проводили по алгоритму пакета программ «Statistica, версия 8» с оценкой статистической значимости различий между группами с помощью критерия Стьюдента. Для сравнительного изучения межгрупповых различий использовали оригинальный метод оптимальных достоверных разбиений (ОРД) с оценкой значимости по каждому из показателей с помощью рандомизированного перестановочного теста [13]. Критическое значение уровня гипотез принималось равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ данных показал, что мужчины с «оптимальным» АД по сравнению с лицами мужского пола с ПГ характеризуются статистически высоко значимым ($p < 0,0001$) снижением содержания в сыворотке крови HLDF24, существенным возрастанием концентрации ЭТ ($p = 0,05$) и титров АТС100b ($p = 0,02$) (табл. 1). Полученные факты подтверждают

Таблица 1

Сравнение средних значений содержания молекулярных факторов в сыворотке крови у мужчин с «оптимальным» давлением и предгипертензией

Молекулярный фактор	Группы обследованных лиц		Критерий Стьюдента
	«Оптимальное» давление	Предгипертензия	
S100b, нг/мл	104,3±51,9	84,4±29,7	0,2
Ангиотензин II, пг/мл	16,8±10,4	23,8±22,6	0,24
Эндотелин1, пМ/л	0,159±0,205	1,31±2,8	0,05
VEGF, пг/мл	680,0±574,1	548,8±375,8	0,46
HLDF24, нг/мл	108,0±15,25	57,9±8,85	<0.0001
Антитела к S100b, титр	1: 193,1±1: 204,7	1: 371,4±1: 304,8	0,02
Антитела к ангиотензину II, титр	1: 605,2±1: 722,0	1:488,1 ± 1:737,9	0,58
Антитела к эндотелину, титр	1: 210,3 ±1: 737,9	1: 192,9±1: 266,1	0,84
Антитела к HLDF24, титр	1: 169±1: 313,2	1: 138,1±1: 171,7	0,69

результаты анализа, выполненного с использованием метода ОРД. У мужчин с ПГ документировано на высоком уровне значимости ($p < 0,0003$) снижение концентрации HLDF24, статистически значимое увеличение содержания ЭТ ($p < 0,02$) и тенденцию ($p < 0,07$) к росту титров АТS100b по сравнению с мужчинами, имеющими «оптимальное» АД (табл. 2).

Сравнительный анализ показал, что женщины с ПГ, в отличие от женщин с «оптимальным» АД, характеризуются высокосignificantным ($p < 0,0001$) снижением содержания в сыворотке крови пептида HLDF24 (табл. 3). Метод ОРД выявил у женщин с ПГ, не только статистически значимое ($p < 0,003$) снижение содержания HLDF24, но и значимое ($p < 0,02$) уменьшение концентрации АнгII (табл. 4). Статистически значимых раз-

личий содержания других молекулярных факторов у мужчин и женщин обнаружено не было (табл. 1–4).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о гендерных особенностях содержания молекулярных маркеров АГ в сыворотке крови лиц с ПГ и «оптимальном» АД. У мужчин с ПГ по сравнению с лицами мужского пола, имеющими «оптимальное» АД, статистически значимо повышены титры АТS100b и содержание ЭТ. Тогда как у женщин с ПГ, в отличие от женщин с «оптимальным» АД – статистически значимо снижен уровень АнгII. При этом у мужчин и женщин с ПГ документировано высокосignificantное снижение концентрации HLDF24 по сравнению с лицами с «оптимальным» АД.

Обнаруженные гендерные особенности содержания биомаркеров АГ у лиц с ПГ выявляют наиболее

Таблица 2

Сравнение средних значений концентрации молекулярных факторов и уровень антител к ним в группе женщин с «оптимальным» давлением и предгипертонией

Молекулярный фактор	Группы обследованных лиц		Критерий Стьюдента
	«Оптимальное» давление	Предгипертония	
S100b,нг	102,3±82,4	83,9±29,7	0,2
Ангиотензин II, пг/мл	16,8±10,4	23,8±22,6	0,24
Эндотелин, пМ/л	0,159±0,205	1,31±2,8	0,08
VEGF, пг/мл	680,0±574,1	548,8±375,8	0,46
HLDF24, нг/мл	108,0±15,25	57,9±8,85	<0.0001
Антитела к S100b, титр	1: 193,1±1: 204,7	1: 371,4±1: 304,8	0,017
Антитела к ангиотензину II, титр	1: 605,2±1: 722,0	1: 488,1 ± 1: 737,9	0,58
Антитела к эндотелину, титр	1: 210,3 ± 1: 737,9	1: 192,9±1: 266,1	0,84
Антитела к HLDF24, титр	1: 169±1: 313,2	1: 138,1±1: 171,7	0,69

Таблица 3

Сравнение средних значений содержания молекулярных факторов в сыворотке крови у женщин с «оптимальным» давлением и предгипертонией

Молекулярный фактор	Группы обследованных лиц		Критерий Стьюдента
	«Оптимальное» давление	Предгипертония	
S100b,нг	102,3±82,4	83,9±29,7	0,30
Ангиотензин II, пг/мл	37,1±64,3	22,4±19,17	0,30
Эндотелин, пМ/л	0,82±1,64	0,77±2,06	0,92
VEGF, пг/мл	569,8±447,1	546,2±363,2	0,84
HLDF24, нг/мл	102,1±11,54	61,9±10,58	<0.0001
Антитела к S100b, титр	302,6±542,76	374,1±643,3	0,63
Антитела к ангиотензину II, титр	288,2±576,2	506,9±805,6	0,21
Антитела к эндотелину, титр	105,3±97,8	105,2±72,4	0,99
Антитела к HLDF24, титр	305,3±581,2	163,8±285,6	0,24

Таблица 4

Результаты одномерного анализа с использованием метода ОДР содержания молекулярных факторов в сыворотке крови у женщин с «оптимальным» давлением (ОП) и предгипертонией (ПГ)

Молекулярный фактор	Граница	Ниже границы		Выше границы		F	p <
		ОД	ПГ	ОД	ПГ		
S100b, нг/мл	116,65	25	22	7	1	3,25	0,52
Ангиотензин II, пг/мл	8,58	0	6	32	17	9,5	0,02
Эндотелин1, пМ/л	0,085	3	6	29	17	2,68	0,8
VEGF, пг/мл	155,85	5	0	27	23	3,88	0,54
HLDF24, нг/мл	86	0	23	32	0	54	0.0003
Антитела к S100b, титр	1200	37	27	1	2	0,689	1,0
Антитела к ангиотензину II, титр	350	31	17	7	12	4,2	0,15
Антитела к эндотелину, титр	75	21	10	17	19	2,81	0,32
Антитела к HLDF24, титр	600	32	28	6	1	2,64	0,36

важные звенья патогенеза гипертензии на молекулярном уровне у мужчин и женщин. Развитие ПГ и её трансформацию в АГ связывают, в настоящее время, с нарушением ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), эндотелиальной дисфункцией, процессами воспаления, атеросклерозом и аутоиммунными реакциями [14-16].

Представленные данные позволяют полагать, что у мужчин детерминантой формирования ПГ является эндотелиальная дисфункция, характеризующаяся преобладанием вазоконстрикторных факторов по сравнению с вазодилататорами. Эндотелин I, повышенное содержание которого зарегистрировано у мужчин с ПГ, является наиболее мощным эндогенным вазоконстриктором. Повышенный уровень ATS100b, выявленный у мужчин с ПГ, свидетельствует о нарушении эндотелия церебральных сосудов гематоэнцефалического барьера, а также развитии иммунного ответа с направленностью к антигенам мозга [17,18].

У женщин преобладающий механизм формирования ПГ связан, по-видимому, с нарушением РААС, о чем свидетельствует статистически значимо сниженный уровень АнгII в сыворотке крови женщин с ПГ по сравнению с пациентками с «оптимальным» давлением. АнгII – один из основных компонентов РААС, он обладает выраженным вазоконстрикторным действием, вовлечен в процессы атерогенеза и воспаления [15,19,20]. Следует отметить, что у женщин с ПГ в перименопаузе характерна прогрессирующая активация РААС. Показано, что менопауза является значимым фактором риска развития ПГ у женщин [21,22].

Нами показано также, что при ПГ как у мужчин, так и у женщин в сыворотке крови определяется высоко значимое снижение содержания HLDF24 по сравнению с лицами, имеющими «оптимальное» АД. Пептид HLDF24, являющийся фрагментом белка HLDF, обладает отчетливой гемодинамической активностью, вызывая при внутривенном введении дозозависимый гипотензивный эффект и рефлекторное повышение частоты сердечных сокращений. В качестве механизмов биологической активности HLDF24 рассматривают возможность пептида снижать образование эндогенного ЭТ, то есть, выступать в роли антагониста эндотелин - превращающего фермента, а также влиять на уровень половых гормонов и вызывать аутоиммунные ответы [23, 24]. Имеющиеся данные о биологической активности и механизмах действия HLDF24, а также документированные нами экспериментальные данные свидетельствуют о возможной роли пептида как фактора межсистемной регуляции АД. Для поддержания оптимального АД необходим определенный уровень концентрации HLDF24 в сыворотке крови. Снижение содержания HLDF24 ниже критического уровня инициирует развитие ПГ. Нами показано, что мужчины и женщины с ПГ имеют близкие значения пограничных показателей содержания HLDF24 в сыворотке крови (77,5 и 86 нг/мл, соответственно).

Таким образом, результаты работы позволяют полагать, что преобладающий механизм формирования ПГ у мужчин, исследованной возрастной когорты, связан с эндотелиальной дисфункцией, тогда как у женщин – с нарушением ренин-ангиотензин-альдостероновой системы.

Литература

- Itoh H, Kurihara I, Miyashita K2. Organ memory: a key principle for understanding the pathophysiology of hypertension and other non-communicable diseases. *Hypertens Res.* 2018; 41(10): 771-9. doi: 10.1038/s41440-018-0081-x.
- Itoh H, Hayashi K, Miyashita K. Pre-emptive medicine for hypertension and its prospects. *Hypertens Res.* 2019; 42(3): 301-5. doi: 10.1038/s41440-018-0177-3.
- Ерина А.М., Ротарь О.П., Орлов А.В., Саинцев В.Н., Шальнова С.А. Деев А.Д. и др. Предгипертензия и кардиометаболические факторы риска (по материалам исследования ЭССЕ-РФ). *Артериальная гипертензия.* 2017; 23(3): 243-52.
- Egan B.M., Stevens-Fabry S. Prehypertension-prevalence, health risky and management strategies. *Nat Rev. Cardiol.* 2015; 12 (5): 289-300. doi: 10.1038/nrcardio.2015.17.
- Huang Y, Su L, Cai X, Mai W, Wang S, Hu Y, Wu Y, Tang H, Xu D. Association of all-cause and cardiovascular mortality with prehypertension: a meta-analysis. *Am Heart J.* 2014; 167 (2): 60-168. doi: 10.1016/j.ahj.2013.10.023.
- Bozorgmanesh M, Ghoreishian H, Mohebi R, Azizi F, Hadaegh F. Sex-specific predictors of the prehypertension-to-hypertension progression: community-based cohort of a West-Asian population. *Eur J Prev Cardiol.* 2014; 21(8): 956-63. doi: 10.1177/2047487313481757.
- Hadaegh F, Hashemini M., Abdi H., Khalili D., Bozorgmanesh M., Arshi B., Azizi F. Prehypertension Tsunami: A decade of follow-up of an Iranian adult population. *PLOS One.* 2015; 10 (10): e0139412.
- Ishikawa Y., Ishikawa J., Ishikawa S., Kayaba K., Nakamura Y., Shimada K. et al. Prevalence and determinants of the prehypertension in the Japanese general population: The Jichi Medical School cohort study. *Hypertens Res.* 2008; 31(7): 1323-30.
- Sherstnev VV, Gruden' MA, Elistratova EI, Karlina VP, Kuznetsova AV, Ryzhova TV, et al. Molecular markers of arterial hypertension in patients with normotony, pre-hypertension and hypertension. *Bull Exp Biol Med.* 2015; 158(5): 604-6. doi: 10.1007/s10517-015-2816-x.
- Шерстнев В.В., Грудень М.А., Сенько О.В., Карлина В.П., Кузнецова А.В., Рыжов В.М. Гендерные особенности связи факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний и формирования предгипертензии. *Патогенез.* 2018; 16(3): 557-60.
- Чазова И.Е., Ощепкова Е.В., Жернакова Ю.В., Карпов Ю.А., Архипов М.В., Барбараш О.Л. и др. Клинические рекомендации диагностики и лечение артериальной гипертензии. *Кардиологический вестник.* 2015; 10(1): 5-30.
- Елистратова Е.И., Грудень М.А., Давыдова Т.В., Шерстнев В.В. Особенности иммунобиохимических показателей у пациентов с различными цереброваскулярными заболеваниями гипертонического генеза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2011; 3: 25-8.
- Сенько О.В., Морозов А.М., Кузнецова А.В., Клименко Л.Л. Оценка эффекта множественного тестирования в методе оптимальных достоверных разбиений. *Машинное обучение и анализ данных.* 2018; 2(1): 26-38.
- Барбараш Н.А., Кувшинов Д.Ю. Актуальные проблемы предгипертензии. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2016; 1(1): 338-42.
- Albarwani S, Al-Siyabi S., Tanira M.O. Prehypertension: Underlying pathology and therapeutic options. *World J. Cardiol.* 2014; 26(8):728-43. doi: 10.4330/wjc.v6.i8.728.
- Rodríguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y, Johnson RJ. The immunological basis of hypertension. *Am J Hypertens.* 2014; 27(11): 1327-237. doi: 10.1093/ajh/hpu142.
- Грудень М.А., Шерстнев В.В. Оценка состояния гематоэнцефалического барьера в развитии аутоиммунных реакций к белку S100b в системе предгипертензия/гипертензия. *Научный форум. Сибирь.* 2018; 4(2): 46-9.
- Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 956: 511-40. doi: 10.1007/5584_2016_90.
- Медведев И. Н., Кумова Т. А., Гамолина О. В. Роль ренин-ангиотензиновой системы в развитии артериальной гипертензии. *Российский кардиологический журнал.* 2009; 78(4): 82-4.
- Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T., Rizzo V. et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2018; 98(3): 1627-738. doi: 10.1152/physrev.00038.2017.
- Muchanga M., Lepira F.B., Tozin R., Mbelambela E. P., Ngatu N. R., Sumaili E.K. et al. Prevalence and risk factors of pre-hypertension in Congolese pre and postmenopausal women. *Afr Health Sci.* 2016; 16(4): 979-85. doi: 10.4314/ahs.v16i4.14.
- Zambrana RE, Lopez L., Dinwedde GY, Ray RM, Phillips LS, Trevisan M. et al. Prevalence and incident prehypertension and hypertension in postmenopausal. *Hypertens.* 2014; 27(3): 372-81. doi: 10.1093/ajh/hpt279.
- Gapon MV, Dranitsyna SM, Minkevich NI, Gruden' MA, Babichenko II, Kostanyan IA. Experimental model of hemorrhagic stroke: rabbit immunization with HL-60 promyelocytic cell differentiation factor. *Bull Exp Biol Med.* 2006; 141(2): 272-4.
- Ржевский Д.И., Драницина С.М., Байдукова Л.К. Гемодинамические эффекты пептидных фрагментов фактора дифференцировки HLDG. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2006; 144(6): 652-5.

References

- Itoh H, Kurihara I, Miyashita K2. Organ memory: a key principle for understanding the pathophysiology of hypertension and other non-communicable diseases. *Hypertens Res.* 2018; 41(10): 771-9. doi: 10.1038/s41440-018-0081-x.
- Itoh H, Hayashi K, Miyashita K. Pre-emptive medicine for hypertension and its prospects. *Hypertens Res.* 2019; 42(3): 301-5. doi: 10.1038/s41440-018-0177-3.
- Erina AM, Rotar OP, Orlov A.V., Saintsev V.N., Shalnova S.A. Deev A.D. and others. Prehypertension and cardiometabolic risk factors (based on the ESSE-RF study). *Arterial hypertension.* 2017; 23(3): 243-52.
- Egan B.M., Stevens-Fabry S. Prehypertension-prevalence, health risky and management strategies. *Nat Rev. Cardiol.* 2015; 12 (5): 289-300. doi: 10.1038/nrcardio.2015.17.
- Huang Y, Su L, Cai X, Mai W, Wang S, Hu Y, et al. Association of all-cause and cardiovascular mortality with prehypertension: a meta-analysis. *Am Heart J.* 2014; 167(2): 60-168. doi: 10.1016/j.ahj.2013.10.023.
- Bozorgmanesh M, Ghoreishian H, Mohebi R, Azizi F, Hadaegh F. Sex-specific predictors of the prehypertension-to-hypertension progression: community-based cohort of a West-Asian population. *Eur J Prev Cardiol.* 2014; 21(8): 956-63. doi: 10.1177/2047487313481757.
- Hadaegh F, Hashemini M., Abdi H., Khalili D., Bozorgmanesh M., Arshi B., Azizi F. Prehypertension Tsunami: A decade of follow-up of an Iranian adult population. *PLOS One.* 2015; 10(10): e0139412.

8. Ishikawa Y., Ishikawa J., Ishikawa S., Kayaba K., Nakamura Y., Shimada K. et al. Prevalence and determinants of the prehypertension in the Japanese general population: The Jichi Medical School cohort study. *Hypertens Res.* 2008; 31(7): 1323-30.
9. Sherstnev V.V., Gruden' MA, Elistratova EI, Karlina VP, Kuznetsova AV, Ryzhova TV, et al. Molecular markers of arterial hypertension in patients with normotony, pre-hypertension and hypertension. *Bull Exp Biol Med.* 2015; 158(5): 604-6. doi: 10.1007/s10517-015-2816-x.
10. Sherstnev V.V., Gruden MA, Senko OV, Karlina V.P., Kuznetsova A.V., Ryzhov V.M. Gender features of the communication of risk factors for cardiovascular diseases and the formation of prehypertension. *Patogenez.* 2018; 16 (3): 557-60. (in Russian)
11. Chazova I.E., Oshchepkova E.V., Zhernakova Yu.V., Karpov Yu.A., Arkhipov M.V., Barbarash O.L. et al. Diagnosis and treatment of arterial hypertension (clinical recommendations). *Kardiologicheskiy vestnik.* 2015; 10(1): 5-30. (in Russian)
12. Elistratova EI, Gruden' MA, Davydova TV, Sherstnev V.V. Serum immunobiochemical markers in patients suffered with hypertension-induced cerebrovascular diseases. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2011; 3: 25-8. (in Russian)
13. Senko OV, Morozov AM, Kuznetsova A.V., Klimenko L.L. Evaluation of the effect of multiple testing in the method of optimal reliable partitions. *Mashinnoe obuchenie i analiz dannykh.* 2018; (1): 26-38. (in Russian)
14. Barbarash N.A., Kuvshinov D.Yu. Actual problem of prehypertension. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina.* 16; 1(1): 338-42. (in Russian)
15. Albarwani S, Al-Siyabi S., Tanira M.O. Prehypertension: Underlying pathology and therapeutic options. *World J. Cardiol.* 2014; 26 (8): 728-43. doi: 10.4330/wjc.v6.i8.728.
16. Rodríguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y, Johnson RJ. The immunological basis of hypertension. *Am J Hypertens.* 2014; 27(11): 1327-237. doi: 10.1093/ajh/hpu142.
17. Gruden MA, Sherstnev V.V. Evaluation of the state of the blood-brain barrier in the development of autoimmune reactions to the S100b protein in the prehypertension / hypertension system. *Scientific forum. Siberia.* 2018; 4 (2): 46-49.
18. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 956: 511-40. doi: 10.1007/5584_2016_90. (in Russian)
19. Medvedev I.N., Kumova T.A., Gamolin O.V. The role of the renin-angiotensin system in the development of arterial hypertension. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal.* 2009; 78(4): 82-4. (in Russian)
20. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T., Rizo V. et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2018; 98(3): 1627-738. doi: 10.1152/physrev.00038.2017.
21. Muchanga M., Lepira F.B., Tozin R., Mbelambela E. P., Ngatu N. R., Sumaili E.K. et al., Prevalence and risk factors of pre-hypertension in Congolese pre and post menopausal women. *Afr Health Sci.* 2016; 16(4): 979-85. doi: 10.4314/ahs.v16i4.14.
22. Zambrana RE, Lopez L., Dinwedde GY, Ray RM, Phillips LS, Trevisan M., Wassertheil-Smoller S. Prevalence and incident prehypertension and hypertension in postmenopausal. *Hypertens.* 2014; 27(3): 372-81. doi: 10.1093/ajh/hpt279.
23. Gapon MV, Dranitsyna SM, Minkevich NI, Gruden' MA, Babichenko II, Kostanyan IA. Experimental model of hemorrhagic stroke: rabbit immunization with HL-60 promyelocytic cell differentiation factor. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2006; 141(2): 272-4.
24. Rzhnevsky D.I., Dranitsina S.M., Baidukova L.K. Hemodynamic effects of peptide fragments of the differentiation factor HLDG. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2006; 144(6): 652-5.

Сведения об авторах:

Шерстнев Владимир Вячеславович, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. зав. лаб. «функциональной нейрохимии» ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина»

Грудень Марина Алексеевна, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. «функциональной нейрохимии» ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина» mgriden@mail.ru

Сенько Олег Валентинович, доктор физ.-мат. наук, проф., Вычислительный центр им. А.А. Дородницына РАН Федерального исследовательского центра «Информатика и управление»;

Карлина Валентина Павловна, зав. лаб. «клинической биохимии», ФГБУЗ «Медико-санитарная часть № 170» Федерального медико-биологического агентства;

Кузнецова Анна Владимировна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН»;

Рыжов Владимир Михайлович, канд. мед. наук, гл. врач, ФГБУЗ «Медико-санитарная часть № 170» ФМБА.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.12-008.331.1: 612.11

Кузник Б.И.^{1,2}, Смоляков Ю.Н.^{1,2}, Давыдов С.О.^{1,2}, Гусева Е.С.², Максименя М.В.¹

Взаимосвязи между форменными элементами крови, половыми гормонами и системой ПОЛ у женщин с эссенциальной гипертензией

¹Читинская государственная медицинская академия,
672000, г. Чита, Россия, ул. Горького, 39а;

²Иновационная клиника «Академия здоровья»,
672038, г. Чита, Россия, ул. Коханского, д. 13

У женщин, больных гипертонической болезнью, существуют тесные корреляционные взаимосвязи между различными форменными элементами крови и уровнем артериального давления, показателями деятельности сердца, тестами, характеризующими состояние гемодинамики, тромбодинамики и коагуляционной активности крови.

Цель исследования – изучение роли различных форменных элементов крови и их соотношения в регуляции уровня эстрогена, прогестерона и пролактина, ТБК-активных продуктов и антиоксидантной активности у больных гипертонической болезнью.

Методика. Исследования проведены на 72 больных гипертонической болезнью, контрольную группу составили 12 женщин с нормальным артериальным давлением. Больные были разделены на 2 группы: в 1-ю группу вошли 37 пациенток с гипертонической болезнью II стадии, находящиеся на гипотензивной терапии, 2-ю – составили 35 женщин с гипертензией II стадии, которые кроме медикаментозного лечения, регулярно проходили курсы кинезотерапии на протяжении 2-3 лет.

Результаты. Методом корреляционного анализа установлено, что у здоровых женщин и больных гипертонической болезнью, изучаемые взаимосвязи могут носить как однонаправленный, так и разнонаправленный характер. У здоровых женщин обнаруживается прямая связь между количеством лимфоцитов и уровнем прогестерона и обратная – с уровнем пролактина. Прямая связь также выявлена между индексом нейтрофилы/базофилы и прогестероном. При гипертензии у больных 1-й группы обнаруживается прямая связь между количеством эритроцитов и прогестероном, числом эозинофилов и пролактином; индекса лимфоциты/эозинофилы с эстрадиолом; индексов нейтрофилы/моноциты, нейтрофилы/базофилы и лимфоциты/базофилы с прогестероном. Отрицательная корреляция выявляется между индексами нейтрофилы/лимфоциты и нейтрофилы/эозинофилы с пролактином. У больных 2-й группы обнаружены прямые корреляционные связи между абсолютным количеством лейкоцитов, нейтрофилов и эозинофилов и отрицательная связь индекса эритроциты/лейкоциты с пролактином. При оценке корреляционных взаимосвязей показателей крови с показателями активности оксидантно/антиоксидантной системы показано, что у здоровых женщин существуют положительные связи между числом моноцитов с содержанием ТБК-продуктов и активностью антиоксидантной системы; эозинофилов с активностью антиоксидантной системы; индекса лейкоциты/тромбоциты с уровнем ТБК-продуктов. При гипертонической болезни в группе без кинезотерапии (1-я группа) выявлена отрицательная взаимосвязь между общим числом эритроцитов и показателями активности антиоксидантной системы.

Заключение. Практически все форменные элементы крови и различные их взаимоотношения у здоровых и больных гипертонической болезнью играют существенную роль в регуляции уровня эстрадиола, прогестерона, пролактина и состояния системы перекисного окисления липидов – антиоксидантная активность.

Ключевые слова: корреляционные взаимосвязи; форменные элементы крови; эстроген; прогестерон; пролактин; ТБК, антиоксидантная активность.

Для цитирования: Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н., Давыдов С.О., Гусева Е.С., Максименя М.В. Взаимосвязи между форменными элементами крови, половыми гормонами и системой ПОЛ у женщин с эссенциальной гипертензией. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4):39-47.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.39-47

Для корреспонденции: Кузник Борис Ильич, e-mail: bi_kuznik@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.09.2019

Kuznik B.I.^{1,2}, Smolyakov Y.N.^{1,2}, Davydov S.O.^{1,2}, Guseva E.S.², Maximenya M.V.¹

Relationships between blood cells, sex hormones, and lipid peroxidation in women with essential hypertension

¹Chita State Medical Academy, Gorky Str. 39a, Chita 672000, Russia;²«Academy of Health» Innovation Clinic, Kokhanskogo Str. 13, Chita 672038, Russia

Close correlations exist between different blood cells (BC), blood pressure, heart function, results of hemodynamics tests, thrombodynamics, and blood coagulation in women with hypertension.

Aim. The study addressed the role of different BCs and their combinations in regulation of estrogen, progesterone, prolactin, TBA-reactive substances (TBARS), and antioxidant activity (AOA) in hypertensive patients.

Methods. The study included 12 healthy women (control) and 72 patients with essential hypertension (EH). Patients with EH were divided into two groups; the first group (EH-1) consisted of 37 women with stage II EH receiving an antihypertensive therapy and the second group (EH-2) consisted of 35 women who, in addition to the drug therapy, yearly underwent 3-4 courses of kinesitherapy for 2-3 year on a regular basis.

Results. Both in healthy women and patients of the EH-1 and EH-2 groups, the studied relationships were either positive or negative. In healthy women, LYM positively correlated with progesterone and inversely correlated with prolactin, and the NEU/BAS ratio positively correlated with progesterone. In patients of the EH-1 group, there were positive correlations of RBC with progesterone; EOS with prolactin; and LYM/EOS with estradiol; and NEU/MON, NEU/BAS, and LYM/BAS with progesterone. The NEU/LYM and NEU/EOS ratios inversely correlated with prolactin. In patients of the EH-2 group, there were positive correlations of WBC, NEU, and EOS with prolactin and inverse correlations of the RBC/WBC ratio with prolactin. Evaluation of correlations between blood indexes and the oxidant/antioxidant system showed that in healthy women, there were positive correlations of the MON count with TBARS and AOA; EOS with AOA; and the WBC/PLT ratio with TBARS. Patients of the EH-1 group showed a negative correlation of the total RBC count with AOA. **Conclusion.** In both healthy subjects and EH groups, almost all BCs and their relationships play a significant role in regulation of estradiol, progesterone, prolactin, and the lipid peroxidation/AOA system.

Keywords: correlations; blood cells; estrogen; progesterone; prolactin; TBARS; AOA.

For citation: Kuznik B.I., Smolyakov Y.N., Davydov S.O., Guseva E.S., Maximenya M.V. Relationships between the blood cells, sexual hormones and lipid peroxidation in women with essential hypertension. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 39-47. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.39-47

For correspondence: Kuznik Boris Ilyich, MD, Professor of the Department of Normal Physiology, Chita State Medical Academy, E-mail: bi_kuznik@mail.ru

Information about authors:

Kuznik B.I., <https://orcid.org/0000-0002-2502-9411>Smolyakov Y.N., <https://orcid.org/0000-0001-7920-7642>Davydov S.O., <https://orcid.org/0000-0001-6690-7391>Guseva E.S., <https://orcid.org/0000-0001-6212-6571>Maximenya M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6308-3411>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 29.09.2019

Нами предыдущими исследованиями [1, 2] установлено, что у женщин, больных гипертонической болезнью (ГБ), существуют тесные корреляционные взаимосвязи между различными форменными элементами крови (ФЭК) и уровнем АД, показателями деятельности сердца (по ЭхоКГ), тестами, характеризующими состояние гемодинамики, тромбодинамики и коагуляционной активности крови. Известно, что, в развитии ГБ существенную роль играют нарушения гормональной регуляции, активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и снижение антиоксидантной активности (АОА). Вместе с тем, в доступной литературе мы не встретили исчерпывающих работ, в которых бы освещалась роль

форменных элементов крови и их взаимосвязи с показателями гормонального статуса, а также с состоянием системы ПОЛ-АОА, играющих существенную роль в патогенезе ГБ. Этим вопросам и посвящается наше исследование. **Цель** исследования – изучение роли различных форменных элементов крови и их соотношения в регуляции уровня эстрогена, прогестерона и пролактина, ТБК-активных продуктов и антиоксидантной активности у больных гипертонической болезнью.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинской декларацией, «Рекомендациями для врачей,

занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей». У всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

В исследовании приняли участие 72 женщины с ГБ II стадии и 12 сопоставимых по возрасту и индексу массы тела (ИМТ) относительно здоровых женщин. Больные ГБ были разделены на 2 группы. В 1-ю группу (ГБ-1) вошли 37 женщин с ГБ II стадии имеющих относительно высокий дополнительный риск развития сердечно-сосудистых осложнений. Во 2-ю группу (ГБ-2) вошли 35 женщин с ГБ II стадии, регулярно проходившие на протяжении 2-3 лет по 3-4 полуторамесячных курса кинезитерапии. Средний возраст обследуемых женщин с гипертонией составил 54 – 60 лет, ИМТ 28.4 ± 4.4 . Основной диагноз был установлен на основании признаков поражения органов мишеней: гипертрофия левого желудочка (по данным ЭХОКГ), локальное сужение артерий сетчатки, ультразвуковые признаки атеросклеротического поражения аорты, сонных и бедренных артерий. Все пациентки получали лечение от гипертонии в виде монотерапии или комбинации двух препаратов по стандартным схемам.

Критериями исключения из исследования были все ассоциированные с ГБ клинические состояния, врожденные и приобретенные пороки сердца, кардиомиопатии, сахарный диабет, нарушения функции щитовидной железы, злокачественные новообразования, болезни крови, хроническая обструктивная болезнь легких с тяжелой дыхательной недостаточностью, хроническая почечная и печеночная недостаточность, воспалительные заболевания, ожирение (индекс массы тела более 40.0). Подсчет общего числа эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и их популяций в крови производился на гемоанализаторе PENTRA-80, Horiba ABX Diagnostics (USA). Иммунохимически (аппарат «Advia Centaur», Siemens, Germany) определяли уровень эстрадиола, пролактина и прогестерона, содержание тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в эритроцитах – по методу Л.А. Андреевой [3], антиоксидантную активность (АОА) по методу М.Ш. Промыслова и др. [4].

Статистическая обработка выполнена с помощью языка R версии 3.6.0 [5]. С целью оценки корреляционных связей применяли метод Спирмена (при несоответствии нормальному распределению факторов, группа контроля) и Пирсона в остальных группах. Статистическая значимость корреляционных коэффициентов определялась уровнем $p < 0.05$. При $p < 0.1$ взаимосвязи рассматривались как близкие к значимым (вероятностные).

Результаты и обсуждение

Как показали наши исследования [6, 7], у больных группы ГБ-1 по сравнению со здоровыми содержание эстрадиола, прогестерона и пролактина было существенно снижено. У больных группы ГБ-2 концентрация основных женских половых гормонов, за исключением эстрадиола (его концентрация оказалась значительно сниженной), значимо не отличалась от показателей контроля. У больных ГБ-1 выявлено увеличение ТБК активных продуктов и значительное снижение активности антиоксидантной системы. У больных ГБ-2 эти сдвиги выражены в меньшей степени [6, 8].

На рисунке представлена композиция 3 прямоугольных корреляционных матриц, демонстрирующих взаимосвязи концентрации половых гормонов с показателями ПОЛ, а также с отдельными форменными элементами крови и индексами их взаимосвязей во всех исследуемых группах. Отдельно отмечены значимые ($p < 0,05$) и вероятностные ($p < 0.1$) различия. С помощью подобной демонстрации можно видеть, что исследуемые взаимосвязи значительно различаются между собой у здоровых женщин (контроль) и групп пациенток с гипертонической болезнью (ГБ-1 и ГБ-2).

Анализ показал, что у здоровых женщин выявляется прямая корреляция между индексами NEU/BAS, LYM/ BAS, EOS/ BAS и прогестероном ($r=0.6$, $p=0.039$, $r = 0.774$, $p=0.008$, $r=0.626$, $p=0.040$, соответственно). Кроме того, были выявлены отрицательные связи близкие к значимым между BAS, индексом RBC/ PLT с прогестероном ($r=-0.584$, $p=0.059$; $r=-0.622$, $p=0.074$ соответственно). Обнаружена также отрицательная связь между RBC и эстрадиолом ($r=-0.746$, $p=0.013$). Между LYM/ MON и пролактином установлены прямые корреляционные связи ($r=0.699$, $p=0.017$) и отрицательные близкие к значимым между LYM и MON с одной стороны и пролактином с другой ($r=-0.598$, $p=0.068$; $r=-0.647$, $p=0.060$ соответственно). Обнаружены также прямые связи между MON, EOS, индексом NEU/ LYM, с показателями активности антиоксидантной системы ($r=0.811$, $p=0.027$; $r=0.736$, $p=0.024$; $r=0.707$ $p=0.050$). Одновременно проявилась тенденция к отрицательной связи, близкая к значимой, между индексом NEU/BAS и АОА ($r=-0.27$, $p=0.060$).

В группе ГБ-1 установлена тенденция к прямой связи между количеством NEU и ТБК ($r=0.35$, $p=0.058$) и отрицательная взаимосвязь между общим числом RBC и АОА ($r=-0.401$, $p=0.028$). У больных группы ГБ-2 выявлена прямая связь WBC и NEU с концентрацией пролактина ($r=0.457$, $p=0.015$ и $r=0.495$, $p=0.007$, соответственно) и значимая отрицательная между RBC/WBC и пролактином ($r=-$

0.394, $p=0.038$). В этой же группе намечается вероятностная прямая связь между NEU и эстрадиолом ($r=0.339$, $p=0.072$), и отрицательная между индексом LYM/MON и ТБК ($r=-0.523$, $p=0.012$).

Наконец, следует указать на то, что у здоровых женщин и больных группы ГБ-2 существуют прямые связи между эстрадиолом и прогестероном. Кроме того, в группе ГБ-2 обнаружены прямые связи эстрадиола с пролактином.

Анализ полученных данных. Представленные данные свидетельствуют о том, что практически все форменные элементы крови и их соотношение играют далеко не последнюю роль в регуляции уровня женских половых гормонов, а также активности систем ПОЛ-АОА как у здоровых женщин, так и больных ГБ. При этом отчетливо видно (рисунок), что у здоровых женщин и больных групп ГБ-1 и ГБ-2 обнаруженные взаимосвязи далеко не однотипны и могут носить как однонаправленный, так и прямо противоположный характер.

Более того, у здоровых и больных ГБ на исследуемые нами показатели могут оказывать влияние различные форменные элементы крови и их взаимосвязи.

Как выше отмечено, у здоровых женщин обнаружена прямая корреляция между NEU/BAS, LYM/BAS, EOS/BAS и прогестероном, отрицательные связи близкие к значимым между BAS, RBC/PLT и прогестероном, а также отрицательная связь между RBC и эстрадиолом. Между индексом LYM/MON и пролактином установлены прямые взаимосвязи и отрицательные близкие к значимым между LYM и MON с одной стороны и пролактином с другой. У пациенток группы ГБ-1 проявляется прямая связь между RBC и прогестероном, EOS с пролактином и вероятностная прямая связь LIM с пролактином. Одновременно проявляются тенденция или значимые отрицательные связи между индексами RBC/PLT и WBC/PLT, а также положительная связь LYM/EOS с эстрадиолом. Кроме того, индексы NEU/MON, NEU/BAS и LYM/BAS положи-

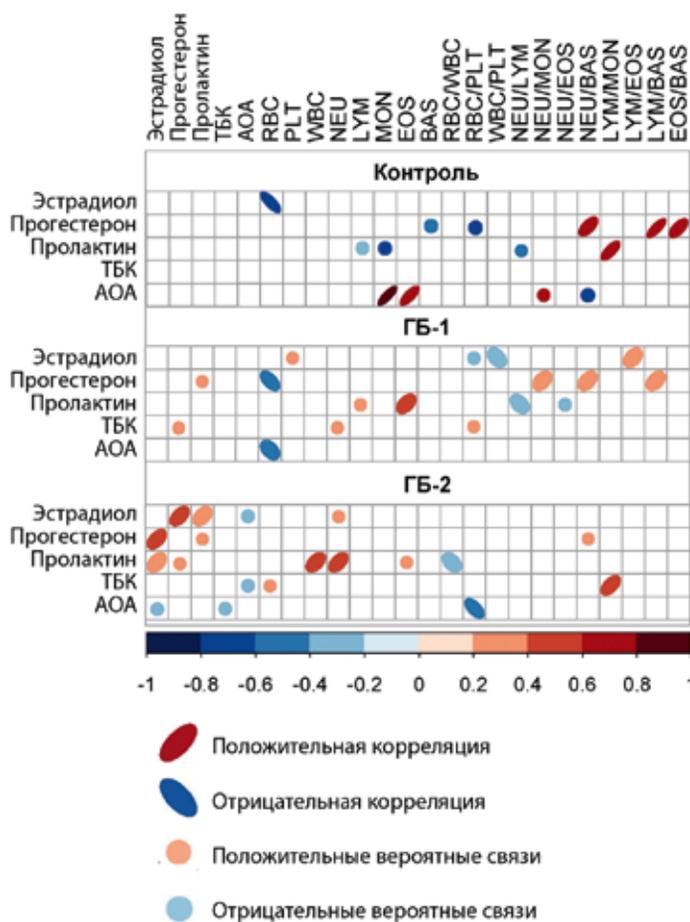


Рис. Матрица корреляционных взаимосвязей между форменными элементами крови, половыми гормонами и системой ПОЛ.

тельно коррелируют с концентрацией прогестерона, а индексы NEU/LYM и NEU/EOS – отрицательно с уровнем пролактина. У больных группы ГБ-2 намечается вероятностная взаимосвязь между NEU и эстрадиолом, а также значимые прямые связи WBC, NEU, EOS с пролактином. Выявляется тенденция к положительной взаимосвязи между индексом NEU/BAS и прогестероном и значимая отрицательная между RBC/WBC и пролактином.

Известно, что гормональный фон женщины оказывает влияние на содержание общего числа лейкоцитов и их популяций. В частности, у здоровых женщин установлено, что в период овуляции увеличивается общее содержание лейкоцитов (овуляторный лейкоцитоз), в том числе количество нейтрофилов. При этом происходит «всплеск» уровня лютеинизирующего гормона, что приводит к общей активации полиморфоядерных лейкоцитов (ПМЯЛ), необходимой, возможно, для инициации овуляции [9, 10]. В момент овуляции установлены прямые связи между WBC, числом нейтрофилов и эстрогеном [11], а в межменструальный период – прямые корреляционные взаимосвязи между WBC и содержанием эстрадиола и отрицательные между WBC, числом нейтрофилов и прогестероном [12]. В лютеиновую фазу наблюдается параллельное увеличение числа лейкоцитов и увеличение концентрации прогестерона [13]. У женщин, находящихся в менопаузе, обнаружена отрицательная корреляция между WBC и уровнем фолликуло-стимулирующего гормона [14].

Введение в течение 5 нед β -эстрогена старым крысам с спонтанной гипертонией приводило наряду с снижением АД к значительному уменьшению числа Т-лимфоцитов, снижению соотношения CD4+/CD8+ и концентрации основных провоспалительных цитокинов [15]. Более того, оказалось, что эстроген ингибирует дифференцировку Th17, что приводит к снижению их числа в кровотоке [16]. Наконец, Т- и в большей степени В-лимфоциты способны через специфические рецепторы связывать и поглощать эстрадиол, что может отражаться на его концентрации в крови [17]. V. Pergialiotis и соавт. [18] установили, что у женщин с поликистозом яичников соотношения PLT/LYM и NEU/LYM отрицательно коррелируют с уровнем прогестерона, а PLT/NEU – с концентрацией эстрогена.

Показано, что при увеличении числа лейкоцитов и эритроцитов у обоих полов возрастает риск развития метаболического синдрома (МС), но у женщин эта взаимосвязь выражена в большей степени. У женщин также имеется прямая корреляция между количеством тромбоцитов и проявлением МС [19].

Chen Yejun и соавт. [20] обследовали 20667 женщин в возрасте от 18 до 93 лет. У женщин в возрасте около 50 лет количество NEU снижалось, в то время как количество LIM возрастало. Соответственно, женщины до 50 лет имели значительно более высокий процент и абсолютное число NEU и более низкий процент и абсолютное количество LYM, а также более высокий индекс NEU/LIM, чем женщины в возрасте 51 года и старше. Разумеется, обнаруженные особенности в значительной степени обусловлены изменением гормонального статуса. Установлено, что пролактин играет далеко не последнюю роль в регуляции иммунного ответа, оказывая влияние на процесс созревания В-клеток и выработку ими специфических антител [21]. Низкие дозы пролактина вызывают провоспалительные реакции и выработку антител, тогда как высокие дозы подавляют эти ответы. Доказано, что низкие дозы пролактина способны усиливать функцию CD4+, тогда как высокие проявляют тенденцию к их подавлению [22]. Под воздействием пролактина может усиливаться функция дендритных клеток, что сопровождается повышением продукции IL-6 и IL-23, а также приводит к изменению фенотипов Т-регуляторных клеток [23].

Как видно из приведенных данных, сведения о взаимосвязи форменных элементов крови с функцией женских половых гормонов скудны и зачастую носят ориентировочный характер. До сих пор остается непонятным, чем могут быть обусловлены подобные связи.

В литературе имеются сведения о том, что лейкоциты, воздействуя на системы ПОЛ-АОА, способны оказывать существенное влияние на течение гипертонической болезни. Так, E. Norpp и соавт. [24] в обстоятельном обзоре сообщали, что ПМЯЛ играют ведущую роль в процессах повреждения, обусловленных атеросклерозом и артериальной гипертонией. Повышенное количество лейкоцитов и более высокий уровень активации ПМЯЛ являются факторами риска АГ и сердечно-сосудистых заболеваний. Спонтанно активированные ПМЯЛ высвобождают провоспалительные факторы, в том числе цитокины и продуцируют активные формы кислорода, оказывающие негативное влияние на тонус сосудов и адгезию ПМЯЛ к эндотелию. Окислительный стресс в ПМЯЛ при ГБ проявляется в увеличении продукции NADPH-оксидазы и активации ПОЛ, а также в снижении концентрации цитозольной и митохондриальной супероксиддисмутазы, что неминуемо сопровождается повреждением эндотелия, усилением адгезии форменных элементов, приводя в конечном итоге к сердечно-сосудистым катастрофам. В то же время действие радикалов на сосудистую стенку может быть предотвращено антиокси-

дантами, такими как супероксиддисмутаза и каталаза гранулоцитов [25]. По мнению R Garg и соавт. [26], основное влияние на процессы ПОЛ при ГБ оказывают нейтрофилы и моноциты, что связано с образованием лейкотриенов генерацией высокореактивного кислорода и свободных радикалов, способных вызывать повреждение тканей и приводить к эндотелиальной дисфункции. Между тем, в опытах на крысах при моделировании ГБ показано, что существует прямая связь между числом тромбоцитов, их активацией и интенсивностью процессов ПОЛ, а также риском развития сердечно-сосудистых катастроф [27].

Как видно из представленных сведений литературы, существуют лишь косвенные данные, подтверждающие полученные нами результаты о роли форменных элементов крови и их различных сочетаний на уровень половых гормонов, процессов ПОЛ и АОА при ГБ. В литературе практически не существует работ, детализирующих представляемые факты. Остается неясным, почему выявленные нами взаимосвязи у здоровых пожилых женщин и у больных групп ГБ-1 и ГБ-2 носят столь различный характер. Известно, что при ГБ, а также при систематической физической нагрузке, изменяется гормональный фон, способный влиять на функциональную активность форменных элементов крови (главным образом, лейкоцитов и тромбоцитов) и их взаимоотношение с физиологическими системами организма. Об этом, в частности, свидетельствуют представленные нами данные. Установлено, что при физической нагрузке возникает так называемый миогенный лейкоцитоз [10, 28], что способствует регенерации поврежденных во время интенсивной физической нагрузки мышц [29]. Существуют половые и возрастные различия в интенсивности миогенного лейкоцитоза, что обусловлено различиями гормонального фона [28]. При систематической физической нагрузке изменяется активность ПОЛ-АОА [30], что не могло не отразиться на результатах, полученных в группах ГБ-1 и ГБ-2. MR Mota и соавт. [31] указывают, что комбинированные физические упражнения увеличивают функциональные возможности антиоксидантной системы и уменьшают повреждения, вызванные окислительным стрессом. Вместе с тем, эта мало исследованная проблема нуждается в дальнейшем тщательном изучении.

Заключение

Все представленные данные свидетельствуют о том, что форменные элементы крови способны непосредственно или опосредованно влиять на концентрацию основных женских половых гормонов, а также на

процессы ПОЛ-АОА. Эти связи могут носить как прямой, так и обратный характер. Особенно интенсивно на уровень половых гормонов оказывают воздействие EOS и LYM, а также индексы NEU/MON, NEU/BAS и LYM/BAS. На состояние системы ПОЛ-АОА больше всего оказывают влияние MON и EOS, а также соотношение WBC/PLT. Особый интерес представляют установленные нами факты, свидетельствующие о том, что у здоровых людей, а также у больных ГБ, проходящих систематически и не проходящих курсы кинезотерапии, взаимосвязи носят разнонаправленный характер.

Безусловно, выявленные различия во многом определяются гормональным фоном, а также теми изменениями, которые оказывает умеренная физическая нагрузка на показатели крови, а также гормональный фон и процессы ПОЛ-АОА. Анализ показал, что этот вопрос абсолютно не освещен в современной литературе и требует дальнейшего тщательного изучения. Вместе с тем, изменение количественного и качественного состава форменных элементов крови может отражаться на характере течения ГБ, вплоть до развития тяжелых осложнений (инфарктов миокарда и инсультов) [32–34]. Последнее также должно учитываться клиницистами.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Кузник Б.И., Давыдов С.О.

Сбор и обработка материала – Гусева Е.С.

Статистическая обработка – Смоляков Ю.Н.

Написания текста – Кузник Б.И.

Редактирование – Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н.

Литература

1. Кузник Б.И., Давыдов С.О., Гусева Е.С., Степанов А.В., Смоляков Ю.Н., Цыбиков Н.Н., Файн И.В., Маген Э. Взаимоотношение отдельных популяций лейкоцитов и деятельность сердечнососудистой системы у женщин, страдающих гипертонической болезнью. *Системные гипертонии*. 2017; 14 (4): 32-7. doi: 10.26442/2075-082X_14.4.32-7.
2. Кузник Б.И., Давыдов С.О., Гусева Е.С., Смоляков Ю.Н., Степанов А.В., Цыбиков Н.Н. Роль форменных элементов крови в формировании гемокоагуляционных сдвигов при гипертонической болезни. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 4: 84-92. doi: 10.25557/0031-2991.2018.04.84-92.
3. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. *Лабораторное дело*. 1988; 11: 41-3.
4. Промыслов М.Ш., Демчук М.Л. Модификация метода определения суммарной антиокислительной активности сыворотки крови. *Вопросы медицинской химии*. 1990; 36(4): 90-2.
5. Core Team. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. Available at: <https://www.R-project.org> (Accessed 20 June 2019).

6. Кузник Б.И., Давыдов С.О., Степанов А.В., Гусева Е.С., Смоляков Ю.Н., Цыбиков Н.Н. и др. Адгезивная молекула JAM-A и состояние системы гемостаза у женщин, страдающих гипертонической болезнью. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2017; 3: 22-31. doi: 10.25555/THR.2017.3.0791.
7. Кузник Б.И. Хавинсон В.Х., Давыдов С.О., Степанов А.В. Белки молодости и старости. *Белки – маркёры клеточного старения и предсказатели продолжительности жизни*. Palmarium, academic publishing. 2017.
8. Кузник Б.И., Давыдов С.О., Смоляков Ю.Н., Степанов А.В., Гусева Е.С., Файн И.В., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х. Роль белков «молодости и старости» в патогенезе гипертонической болезни. *Успехи геронтологии*. 2018; 3: 362-7.
9. Shirai F., Kawaguchi M., Yutsudo M., Dohi Y. Human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes at the ovulatory period are in an activated state. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002; 196(1-2): 21-8. doi: 10.1016/S0303-7207(02)00228-9.
10. Кузник Б.И. *Физиология и патология системы крови*. М.; Вузовская книга. 2004.
11. Makinoda S., Hirotsaki N., Waseda T. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the mechanism of human ovulation and its clinical usefulness. *Current Medicinal Chemistry*. 2008; 15(6): 604-13. doi: 10.2174/092986708783769740.
12. Nowak J., Borkowska B., Pawlowski B. Leukocyte changes across menstruation, ovulation, and mid-luteal phase and association with sex hormone variation. *Am J Hum Biol*. 2016; 28(5): 721-8. doi: 10.1002/ajhb.22856.
13. Żelaźniewicz A., Borkowska B., Nowak J., Pawłowski B. The progesterone level, leukocyte count and disgust sensitivity across the menstrual cycle. *Physiol Behav*. 2016; 161: 60-5. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.04.002.
14. Vaikkakara S., Raj M.N., Sachan A., Mohan A., Vengamma B., Rao P.V.L.N.S. et al. Impact of Severity of Illness on the Function of the Hypothalamo-pituitary-gonadal Axis in Postmenopausal Women with Acute Severe Illness: Implications for Predicting Disease Outcome. *Indian J Endocrinol Metab*. 2017; 21(5): 738-44. doi: 10.4103/ijem.IJEM_398_16.
15. Ni X., Zhang L., Ma X., Shan L.Y., Li L., Si J.Q., Ma K.T. β -estradiol alleviates hypertension-and concanavalin A-mediated inflammatory responses via modulation of connexins in peripheral blood lymphocytes. *Molecular medicine reports*. 2019; 3743-55. doi: 10.3892/mmr.2019.10037.
16. Xiu F., Sabz A.Z., Palaniyar N., Sweezey N. A dual neutrophil-T cell purification procedure and methodological considerations in studying the effects of estrogen on human Th17 cell differentiation. *J Immunol. Methods*. 2019; 467: 1-11. doi: 10.1016/j.jim.2019.01.002.
17. Balogh A., Karpati E., Schneider A.E., Hetey S., Szilagyi A., Juhasz K. et al. Sex hormone-binding globulin provides a novel entry pathway for estradiol and influences subsequent signaling in lymphocytes via membrane receptor. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 4. doi: 10.1038/s41598-018-36882-3.
18. Pergialiotis V., Trakakis E., Parthenis C., Hatziazgelaki E., Chrelias C., Thomakos N., Papantoniou N. Correlation of platelet to lymphocyte and neutrophil to lymphocyte ratio with hormonal and metabolic parameters in women with PCOS. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2018; 34(3). doi: 10.1515/hmbci-2017-0073.
19. Zhou P., Meng Z., Liu M., Ren X., Zhu M., He Q. et al. The associations between leukocyte, erythrocyte or platelet, and metabolic syndrome in different genders of Chinese. *Medicine*. 2016; 95(44): 2-7. doi: 10.1097/MD.0000000000005189.
20. Chen Y., Zhang Y., Zhao G., Chen C., Yang P., Ye S., Tan X. Difference in Leukocyte Composition between Women before and after Menopausal Age, and Distinct Sexual Dimorphism. *Plos One*. 2016; 11(9): 2-10. doi: 10.1371/journal.pone.0162953.
21. Legorreta-Haquet M.V., Flores-Fernández R., Blanco-Favela F., Fuentes-Pananá E.M., Chávez-Sánchez L., Hernández-González R. et al. Prolactin levels correlate with abnormal B cell maturation in MRL and MRL/lpr mouse models of systemic lupus erythematosus-like disease. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013. doi: 10.1155/2013/287469.
22. Tomio A., Schust D.J., Kawana K., Yasugi T., Kawana Y., Mahalingaiah S. et al. Prolactin can modulate CD4+ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunology and cell biology*. 2008; 86(7): 616-21. doi: 10.1038/icc.2008.29.
23. Wu W., Sun M., Zhang H.P., Chen T., Wu R., Liu C. et al. Prolactin mediates psychological stress-induced dysfunction of regulatory T cells to facilitate intestinal inflammation. *Gut*. 2014; 63(12):1883-92. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306083.
24. Hopps E., Presti R.L., Caimi G. Pathophysiology of polymorphonuclear leukocyte in arterial hypertension. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2009; 41(3): 209-18. doi: 10.3233/CH-2009-1173.
25. Madjid M., Awan I., Willerson J.T., Casscells S.W. Leukocyte Count and Coronary Heart Disease. *J Am. Col. Cardiol*. 2004; 44(10): 1547-956. doi: 10.1016/j.jacc.2004.07.056.
26. Garg R., Kumbkarni Y., Aljada A., Mohanty P., Ghanim H., Hamouda W., Dandona P. Troglitazone Reduces Reactive Oxygen Species Generation by Leukocytes and Lipid Peroxidation and Improves Flow-Mediated Vasodilatation in Obese Subjects. *Hypertension*. 2000; 36: 430-5. doi: 10.1161/01.HYP.36.3.430.
27. Vazzana N., Ganci A., Cefalù A.B., Lattanzio S., Noto D., Santoro N. et al. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation as potential contributors to increased cardiovascular risk in the low-HDL phenotype. *J Am. Heart Assoc*. 2013; 2(2): e000063. doi: 10.1161/JAHA.113.000063.
28. Michaud M., Balardy L., Moulis G., Gaudin C. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am. Med. Direct. Ass*. 2013; 14(12): 877-82. doi: 10.1016/j.jamda.2013.05.009.
29. Saclier M., Cuvellier S., Melanie M., Mounier R., Chazaud B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *The FEBS Journal*. 2013; 280(17): 4118-30. doi: 10.1111/febs.12166.
30. Khani M., Motamedi P., Dehkhoda M.R., Nkukheslat D.S., Karimi P. Effect of thyme extract supplementation on lipid peroxidation, antioxidant capacity, PGC-1 α content and endurance exercise performance in rats. *Journal of the international society of sports nutrition*. 2017; 14(1): 11. doi: 10.1186/s12970-017-0167-x.
31. Mota M.P., dos Santos Z.A., Soares J.F.P., de Fátima Pereira A, João P.V., Gaivão I.O.N., Oliveira M.M. Intervention with a combined physical exercise training to reduce oxidative stress of women over 40 years of age. *Experimental gerontology*. 2019; 123: 1-9. doi: 10.1016/j.exger.2019.05.002.
32. Collier B.S. Leukocytosis and Ischemic Vascular Disease Morbidity and Mortality. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005; 25: 658-70. doi: 10.1161/01.ATV.0000156877.94472.a5.
33. Кузник Б.И., Морозова И.Ю., Роднина О.С., Страмбовская Н.Н., Ширшов Ю.А. Лейкоцитозы и исходы острого нарушения мозгового кровообращения. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.Корсакова*. 2010; 110(3): 10-4.
34. Морозова И.Ю., Страмбовская Н.Н., Кузник Б.И., Роднина О.С. Роль лейкоцитов в развитии нарушения гемостаза у больных с мозговым инсультом. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2015; 1: 51-6.

References

- Kuznik B.I., Davydov S.O., Guseva E.S., Stepanov A.V., Smolyakov Y.N., Tsybikov N.N., Fayn I.V., Magen E. Interrelationship between individual leukocyte populations and the cardiovascular system in women, suffering from hypertension. *Sistemnye gipertenzii*. 2017; 14(4): 32-7. doi: 10.26442 / 2075-082X_14.4.32-7. (in Russian)
- Kuznik B.I., Davydov S.O., Guseva E.S., Smolyakov Yu.N., Stepanov AV, Tsybikov N.N. The role of blood cells in the formation of hemocoagulation changes in hypertension. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; 4: 84-92. doi: 10.25557/0031-2991.2018.04.84-92. (in Russian)
- Andreeva L.I., Kozhemyakin L.A., Kiskun A.A. Modification of the method for determining lipid peroxides in a test with thiobarbituric acid. *Laboratornoe delo*. 1988; 11: 41-3. (in Russian)
- Promyslov M.Sh., Demchuk M.L. Modification of the method for determining the total antioxidant activity of blood serum. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1990; 36(4): 90-2. (in Russian)
- Core Team. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. Available at: <https://www.R-project.org> (Accessed 20 June 2019).
- Kuznik B.I., Davydov S.O., Stepanov A.V., Guseva E.S., Smolyakov Y.N., Tsybikov N.N., Tereshkov P.P., Fefelova E.V., Maksimenya M.V., Bikbaeva M.V. Adhesive JAM-A molecule and the state of the hemostatic system in women suffering from hypertension. *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2017; 3: 22-31. doi: 10.25555/THR.2017.3.0791. (in Russian)
- Kuznik B.I., Havinson V.Kh., Davydov S.O., Stepanov A.V. *Proteins of youth and old age. Proteins are markers of cellular aging and predictors of longevity. [Belki molodosti i starosti. Belki – markjory kletchnogo starenija i predskazateli prodolzhitel'nosti zhizni]* Palmarium, academic publishing. 2017. (in Russian)
- Kuznik B.I., Davydov S.O., Smolyakov Y.N., Stepanov A.V., Guseva E.S., Fayn I.V., Linkova N.S., Khavinson V.Kh. The role of proteins "youth and old age" in the pathogenesis of hypertension. *Uspekhi gerontologii*. 2018; 3: 362-7. (in Russian)
- Shirai F., Kawaguchi M., Yutsudo M., Dohi Y. Human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes at the ovulatory period are in an activated state. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002; 196(1-2): 21-8. doi: 10.1016/S0303-7207(02)00228-9.
- Kuznik B.I. *Physiology and pathology of the blood system. [Fiziologiya i patologiya sistemy krovi]* Moscow; Vuzovskaya kniga. 2004. (in Russian)
- Makinoda S., Hirotsaki N., Waseda T. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the mechanism of human ovulation and its clinical usefulness. *Current Medicinal Chemistry*. 2008; 15(6): 604-13. doi: 10.2174/092986708783769740.
- Nowak J., Borkowska B., Pawlowski B. Leukocyte changes across menstruation, ovulation, and mid-luteal phase and association with sex hormone variation. *Am J Hum Biol*. 2016; 28(5): 721-8. doi: 10.1002/ajhb.22856.
- Żelaźniewicz A, Borkowska B, Nowak J, Pawłowski B. The progesterone level, leukocyte count and disgust sensitivity across the menstrual cycle. *Physiol Behav*. 2016; 161: 60-5. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.04.002.
- Vaikkakara S., Raj M.N., Sachan A., Mohan A., Vengamma B., Rao P.V.L.N.S.et al. Impact of Severity of Illness on the Function of the Hypothalamo-pituitary-gonadal Axis in Postmenopausal Women with Acute Severe Illness: Implications for Predicting Disease Outcome. *Indian J Endocrinol Metab*. 2017; 21(5): 738-44. doi: 10.4103/ijem.IJEM_398_16.
- Ni X., Zhang L., Ma X., Shan L.Y., Li L., Si J.Q., Ma K.T. β -estradiol alleviates hypertension-and concanavalin A-mediated inflammatory responses via modulation of connexins in peripheral blood lymphocytes. *Molecular medicine reports*. 2019; 3743-55. doi: 10.3892/mmr.2019.10037.
- Xiu F., Sabz A.Z., Palaniyar N., Swezey N. A dual neutrophil-T cell purification procedure and methodological considerations in studying the effects of estrogen on human Th17 cell differentiation. *J Immunol. Methods*. 2019; 467: 1-11. doi: 10.1016/j.jim.2019.01.002.
- Balogh A., Karpati E., Schneider A.E., Hetey S., Szilagyi A., Juhasz K. et al. Sex hormone-binding globulin provides a novel entry pathway for estradiol and influences subsequent signaling in lymphocytes via membrane receptor. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 4. doi: 10.1038/s41598-018-36882-3.
- Pergialiotis V., Trakakis E., Parthenis C., Hatziagelaki E., Chrelia C., Thomakos N., Papanтониou N. Correlation of platelet to lymphocyte and neutrophil to lymphocyte ratio with hormonal and metabolic parameters in women with PCOS. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2018; 34(3). doi: 10.1515/hmbci-2017-0073.
- Zhou P., Meng Z., Liu M., Ren X., Zhu M., He Q. et al. The associations between leukocyte, erythrocyte or platelet, and metabolic syndrome in different genders of Chinese. *Medicine*. 2016; 95(44): 2-7. doi: 10.1097/MD.0000000000005189.
- Chen Y., Zhang Y., Zhao G., Chen C., Yang P., Ye S., Tan X. Difference in Leukocyte Composition between Women before and after Menopausal Age, and Distinct Sexual Dimorphism. *Plos One*. 2016; 11(9): 2-10. doi: 10.1371/journal.pone.0162953
- Legorreta-Haquet M.V., Flores-Fernández R., Blanco-Favela F., Fuentes-Pananá E.M., Chávez-Sánchez L., Hernández-González R. et al. Prolactin levels correlate with abnormal B cell maturation in MRL and MRL/lpr mouse models of systemic lupus erythematosus-like disease. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013. doi: 10.1155/2013/287469.
- Tomio A., Schust D.J., Kawana K., Yasugi T., Kawana Y., Mahalingaiah S. et al. Prolactin can modulate CD4+ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunology and cell biology*. 2008; 86(7): 616-21. doi: 10.1038/icb.2008.29.
- Wu W., Sun M., Zhang H.P., Chen T., Wu R., Liu C. et al. Prolactin mediates psychological stress-induced dysfunction of regulatory T cells to facilitate intestinal inflammation. *Gut*. 2014; 63(12): 1883-92. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306083.
- Hopps E., Presti R.L., Caimi G. Pathophysiology of polymorphonuclear leukocyte in arterial hypertension. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2009; 41(3): 209-18. doi: 10.3233/CH-2009-1173.
- Madjid M., Awan I., Willerson J.T., Casscells S.W. Leukocyte Count and Coronary Heart Disease. *J Am. Coll. Cardiol*. 2004; 44(10): 1547-956. doi: 10.1016/j.jacc.2004.07.056.
- Garg R., Kumbkarni Y., Aljada A., Mohanty P., Ghanim H., Hamouda W., Dandona P. Troglitazone Reduces Reactive Oxygen Species Generation by Leukocytes and Lipid Peroxidation and Improves Flow-Mediated Vasodilatation in Obese Subjects. *Hypertension*. 2000; 36: 430-5. doi: 10.1161/01.HYP.36.3.430.
- Vazzana N., Ganci A., Cefalù A.B., Lattanzio S., Noto D., Santoro N., Saggini R., Puccetti L., Averna M., Davi G. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation as potential contributors to increased cardiovascular risk in the low-HDL phenotype. *J Am. Heart Assoc*. 2013; 2(2): e000063. doi: 10.1161/JAHA.113.000063.
- Michaud M, Balardy L, Moulis G, Gaudin C. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am. Med. Direct. Assoc*. 2013; 14(12): 877-82. doi: 10.1016/j.jamda.2013.05.009.

29. Saclier M., Cuvellier S., Melanie M., Mounier R., Chazaud B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *The FEBS Journal*. 2013; 280(17): 4118-30. doi: 10.1111/febs.12166.
30. Khani M., Motamedi P., Dehkhoda M.R., Nkukheslat D.S., Kari-mi P. Effect of thyme extract supplementation on lipid peroxidation, antioxidant capacity, PGC-1 α content and endurance exercise performance in rats. *Journal of the international society of sports nutrition*. 2017; 14(1): 11. doi: 10.1186/s12970-017-0167-x.
31. Mota M.P., dos Santos Z.A., Soares J.F.P., de Fátima Pereira A, João P.V., Gaivão I.O.N., Oliveira M.M. Intervention with a combined physical exercise training to reduce oxidative stress of women over 40 years of age. *Experimental gerontology*. 2019; 123: 1-9. doi: 10.1016/j.exger.2019.05.002.
32. Collier B.S. Leukocytosis and Ischemic Vascular Disease Morbidity and Mortality. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005; 25: 658-70. doi: 10.1161/01.ATV.0000156877.94472.a5.
33. Kuznik B.I., Morozova I.Y., Rodnina O.S., Strambovskaya N.N., Shirshov Y.A. Leukocytosis and outcomes of acute cerebrovascular accident. *Zhurnal nevrologii i psikhatrii im. S. Korsakova*. 2010; 110(3): 10-4. (in Russian)
34. Morozova I.Y., Strambovskaya N.N., Kuznik B.I., Rodnina O.S. The role of leukocytes in the development of hemostatic disorders in patients with cerebral stroke. *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2015; 1: 51-6. (in Russian)

Сведения об авторах:

Кузник Борис Ильич, доктор мед. наук, проф., каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО ЧГМА, науч. консультант инновационной клиники «Академия Здоровья», E-mail: bi_kuznik@mail.ru;

Смоляков Юрий Николаевич, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. медицинской физики и информатики ФГБОУ ВО ЧГМА, E-mail: smolyakov@rambler.ru;

Давыдов Сергей Олегович, доктор мед. наук, проф. каф. травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО ЧГМА, руководитель инновационной клиники «Академия Здоровья», E-mail: davydov-so@mail.ru;

Гусева Екатерина Сергеевна, канд. мед. наук, ассистент каф. поликлинической терапии, зам. директора по клинико-экспертной и организационно-методической работе клиники «Академия здоровья», E-mail: guseva81@gmail.com;

Максименя Мария Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии ФГБОУ ВО ЧГМА, E-mail: mmv4510@mail.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.151.5-072.7: 612.115.13: 612.115.35: 616.36-089.85: 612.085.1

Момот А.П.¹⁻³, Вдовин В.М.^{2,3}, Орехов Д.А.⁴, Лычёва Н.А.^{2,3}, Толстокоров И.Г.⁵, Шевченко В.О.⁵, Красюкова В.О.², Шахматов И.И.^{2,3}

Профилактика массивных интраоперационных кровотечений, ассоциированных с гепарином, при системном применении фибрин-мономера в эксперименте

¹Алтайский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 656045, г. Барнаул, Россия, ул. Ляпидевского, д. 1/2;

²ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, 656038, г. Барнаул, Россия, пр. Ленина, д. 40;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины», 630117, г. Новосибирск, Россия, ул. Тимакова, д. 4;

⁴КГБУЗ «Алтайский краевой кардиологический диспансер», 656055, г. Барнаул, Россия, ул. Малахова, д. 46;

⁵ООО КДЦ «Добрый доктор», 656006, г. Барнаул, Россия, ул. Балтийская, д. 4-а

Цель исследования – изучение способности фибрин-мономера предупреждать тяжелую интраоперационную кровопотерю, ассоциированную с введением нефракционированного гепарина, при дозированной травме печени.

Методика. На кроликах «Шиншилла» индуцировали гипокоагуляцию нефракционированным гепарином (150 ед/кг). Профилактику интраоперационных кровотечений осуществляли внутривенным введением фибрин-мономера (0,25 мг/кг) за 1 ч до травмы или протамина сульфата (1,5 мг/кг) за 10 мин до травмы. После нанесения стандартной травмы печени оценивали объем (в % ОЦК) и темп (мг/с) кровопотери. Анализировали число тромбоцитов, активированное парциальное тромбопластиновое время, протромбиновое и тромбиновое время свертывания, уровень фибриногена и активность антитромбина III, параметры ротационной тромбоэластометрии крови.

Результаты. Объем кровопотери в группах животных после в/в введения фибрин-мономера и протамина сульфата на фоне гепаринизации был, соответственно, в 5,1 и 4,0 раза меньше по сравнению с группой плацебо, получавшей тот же антикоагулянт. Вместе с тем, фибрин-мономер не влиял на параметры коагулограммы (отсутствие видимого гемостазиологического эффекта) и тромбоэластограммы, тогда как применение протамина сульфата в качестве антидота гепарина сопровождалось нормализацией данных тромбоэластометрии и коррекцией гипокоагуляционного сдвига по активированному парциальному тромбопластиновому времени, протромбиновому и тромбиновому времени.

Заключение. Установлено, что фибрин-мономер (0,25 мг/кг) снижает посттравматическое кровотечение в условиях блокады свертывания крови гепарином без видимых признаков восстановления гемостатического равновесия.

Ключевые слова: массивные кровотечения; фибрин-мономер; гепарин; протамина сульфат; система гемостаза; гемостатический эффект.

Для цитирования: Момот А.П., Вдовин В.М., Орехов Д.А., Лычёва Н.А., Толстокоров И.Г., Шевченко В.О., Красюкова В.О., Шахматов И.И. Профилактика массивных интраоперационных кровотечений, ассоциированных с гепарином, при системном применении фибрин-мономера в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4):48-55.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.48-55

Для корреспонденции: Вдовин Вячеслав Михайлович, e-mail: erytrab@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ (Грант № 18-415-220001, конкурса – Конкурс проектов 2018 г.), ООО фирмы «Технология-Стандарт» и Алтайского государственного медицинского университета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.03.2019

Momot A.P.^{1,3}, Vdovin V.M.^{2,3}, Orekhov D.A.⁴, Lycheva N.A.^{2,3}, Tolstokorov I.G.⁵, Shevchenko V.O.⁵, Krasnyukova V.O.², Shakhmatov I.I.^{2,3}

Prevention of heparin-associated massive intraoperative bleedings by systemic administration of fibrin monomer in experiment

¹Altai Branch of the National Research Center for Hematology, Lyapidevskogo Str. 1/2, Barnaul 656045, Russia;

²Altai State Medical University, Prospekt Lenina 40, Barnaul 656038, Russia;

³Research Institute of Physiology and Basic Medicine, Timakova Str. 4, Novosibirsk 630117, Russia;

⁴Altai Regional Cardiology Health Center, Malakhova Str. 46, Barnaul 656055, Russia;

⁵Consultation and Diagnostic Clinic "Dobriy Doktor" Ltd., Baltiyskaya Str. 4a, Barnaul 656006, Russia

The research objective was to study the ability of fibrin monomer to prevent severe intraoperative blood loss associated with administration of unfractionated heparin in controlled liver injury.

Methods. Hypocoagulation was induced in chinchilla rabbits with unfractionated heparin (150 U/kg). Intraoperative bleeding was prevented by administration of fibrin monomer (FM, 0.25 mg/kg, i.v.) one hour prior to the injury and of protamine sulfate (PS, 1.5 mg/kg, i.v.) 10 min prior to the injury. Following the liver injury, blood loss was assessed as percentage of circulating blood volume and the blood loss rate (mg/s). Platelet counts, aPTT, PT, TT, fibrinogen level, antithrombin III activity, and parameters of blood rotation thromboelastometry were analyzed.

Results. The volume of blood loss was 5.1 times and 4.0 times less, respectively, after the FM and PS administration during heparinization compared to the placebo group treated with the same anticoagulant. However, FM affected neither coagulogram indexes (no visible hemostasiological effect) nor thromboelastogram while the use of PS as an antidote for heparin was associated with normalization of thromboelastometric data and correction of hypercoagulative changes in aPTT, PT, TT.

Conclusion. FM at a dose of 0.25 mg/kg reduced severity of posttraumatic bleeding induced by heparin inhibition of coagulation with no visible signs of hemostatic balance recovery.

Keywords: massive bleeding; fibrin monomer; heparin; protamine sulfate; hemostasis system; hemostatic effect.

For citation: Momot A.P., Vdovin V.M., Orekhov D.A., Lycheva N.A., Tolstokorov I.G., Shevchenko V.O., Krasnyukova V.O., Shakhmatov I.I. Prevention of massive intraoperative bleedings associated with heparin with the systemic use of fibrin monomer in the experiment. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 48-55. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.48-55

For correspondence: Vjacheslav M. Vdovin, PhD, associate professor, head of the department of pathological physiology Altai State Medical University (ASMU), 40 Lenina Ave, Barnaul, 656038, Russian Federation, e-mail: erytrab@gmail.com

Information about authors:

Momot A.P., <http://orcid.org/0000-0002-8413-5484>

Vdovin V.M., <https://orcid.org/0000-0002-4606-3627>

Orekhov D.A., <https://orcid.org/0000-0003-0644-6313>

Lycheva N.A., <https://orcid.org/0000-0002-5842-5728>

Tolstokorov I.G., <https://orcid.org/0000-0001-5406-9191>

Shevchenko V.O., <https://orcid.org/0000-0002-3471-3426>

Krasnyukova V.O., <https://orcid.org/0000-0001-5752-3003>

Shakhmatov I.I., <https://orcid.org/0000-0002-0979-8560>

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

Acknowledgments. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant № 18-415-220001), «Technology-Standard» Ltd, ASMU.

Received 14.03.2019

Введение

Нефракционированный гепарин (НГ) — один из наиболее распространенных в клинической практике антикоагулянтов, о котором известно уже более ста лет [1, 2]. Основу структуры НГ составляют натриевые соли гликозаминогликанов, различающиеся по

своей молекулярной массе. При попадании в кровоток НГ образует комплекс с антитромбином III, усиливая возможность последнего ингибировать преимущественно тромбин (IIa), а также факторы IXa, Xa, XIa и XIIa [3–5].

При передозировке НГ или при экстренных хирургических вмешательствах у гепаринизированных животных вероятно развитие тяжелых кровотечений [6]. В данных ситуациях рекомендуется введение антидота НГ — протамина сульфата (ПС), с тем ориентировочным расчетом, что 1 мл 1 % раствора протамина сульфата нейтрализует 80-120 МЕ остаточной активности гепарина в крови [7]. Применение ПС активно используется в кардиохирургической практике во время операций с использованием искусственного кровообращения, требующего введения относительно больших доз НГ (2,0-4,0 МЕ/мл) [8]. К недостаткам применения ПС относят возможность развития побочных эффектов, в виде гипотензии легочной вазоконстрикции, а также аллергических и анафилактических реакций [9, 10].

В Алтайском гематологическом центре в течение ряда лет исследуются свойства фибрин-мономера (ФМ, дез-ААВВ-фибриноген), получаемого из плазмы крови человека и представляющего собой продукт направленного протеолитического действия тромбина на фибриноген. Функция ФМ направлена на формирование основы фибринового тромба в результате полимеризации (или самосборки) мономерных молекул этого белка [4, 5, 11].

В недавно опубликованной работе [12] нами была подтверждена принадлежность препарата ФМ к производным фибриногена в соответствии с данными оценки молекулярной массы соответствующих α -, β - и γ -цепей при выполнении денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле по методу U.K. Laemmli [13] и по результатам проведения иммуноблоттинга на основе технологии, описанной G.L. Soe и соавт. [14]. Для объективной оценки эффектов ФМ с помощью амидолитического метода доказано отсутствие в нем сколько-нибудь значимых примесей тромбина (фактора Па). Было установлено также наличие системного гемостатического действия ФМ, который минимизировал посттравматическую кровопотерю в эксперименте как у животных без фармакологического воздействия на систему гемостаза [12], так и у животных, получавших дабигатрана этексилат [15]. ФМ в данных исследованиях применялся внутривенно (0,25 мг/кг), что соответствовало его физиологическому уровню в плазме крови здоровых людей (менее 6,0 мкг/мл) [16, 17].

Цель исследования — изучение способности фибрин-мономера предупреждать тяжелую интраоперационную кровопотерю, связанную с введением нефракционированного гепарина, при дозированной травме печени.

Методика

Работы на животных проводили в соответствии с Базельской декларацией, Европейской конвенцией и

директивами по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте 86/609/ЕЕС, а также Хельсинской декларацией и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО АГМУ МЗ РФ.

Исследования выполнены на 67 здоровых кроликах-самцах «Шиншилла» массой 3,0-4,5 кг, из которых были сформированы 4 экспериментальные группы (дизайн исследования представлен на рис. 1).

В качестве экспериментального препарата использован раствор ФМ (0,25 мг/кг), полученный в соответствии с имеющимся патентом¹.

В качестве препарата сравнения был использован раствор протамина сульфата (1,5 мг/кг, фирма «Эллара», Россия). Препараты вводили в краевую вену уха иглой-катетером «Cathy» (фирма «НМД», Финляндия). Для снижения коагуляционного потенциала всем животным в группах со 2-й по 4-ю вводили раствор НГ (150 ед/кг или 1,5 мг/кг, фирма «Синтез», Россия). Эксперименты проводили слепым методом, при котором экспериментаторы, оценивающие гемостатические эффекты исследуемых препаратов, не знали, к какой группе относится то или иное животное.

Исследования осуществляли по следующей схеме: животным 1-й группы ($n=11$) вводили раствор плацебо в объеме 0,5 мл (4,0 М раствор мочевины, соответствующий ее концентрации в растворе ФМ), через 1 ч выполняли забор крови из краевой вены уха, проводили лапаротомию и наносили стандартную травму печени в соответствии с имеющимися рекомендациями [18]. Животным 2-й ($n=17$) и 4-й ($n=25$) групп вводили растворы плацебо или ФМ, соответственно. Спустя 45 мин в/в болюсно вводили раствор НГ, после чего через 10 мин выполняли забор крови с последующей травмой печени. Животным 3-й группы ($n=14$) в/в болюсно вводили раствор НГ, после чего через 15 мин медленно в/в вводили ПС. Через 10 мин осуществляли взятие крови с последующим нанесением травмы печени. Перед лапаротомией проводили анестезию препаратом «Телазол» (10 мг/кг в/в, фирма «Зэотис», Россия).

После нанесения травмы (при помощи марлевых салфеток) оценивали характер паренхиматозного кровотечения — по объему кровопотери в процентах от объема циркулирующей крови (% ОЦК) с учетом массы тела животного, а также по темпу кровопотери в единицу времени (мг/с) [18].

¹ Момот А.П., Шахматов И.И., Ломаев И.С., Терехов С.С. Способ промышленного получения фибрин-мономера из плазмы крови. Патент. 2522237, РФ; 2014.

Животных выводили из эксперимента передозировкой наркоза после прекращения кровотечения из раны, или в момент остановки сердечно-легочной деятельности.

Для оценки системы гемостаза кровь получали после надреза краевой вены уха (самотеком) перед нанесением травмы печени (рис. 1). Первые 3–4 капли крови после надреза не использовали. Кровь помещали в пробирки с соответствующими стабилизаторами: для подсчета числа тромбоцитов – с калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (AQUISEL® КЗЕ/EDTA 3К, фирма «Aquisel S.L.», Испания), для изучения других параметров – с 0,11 М (3,8 %) раствором цитрата натрия (соотношение крови и стабилизатора 9:1. Далее, стабилизированную цитратом натрия кровь центрифугировали при 1200 г в течение 15 мин для получения обедненной тромбоцитами плазмы.

Исследование гемокоагуляции предусматривало оценку: 1 – количества тромбоцитов в венозной крови на гематологическом анализаторе «Drew-3» (фирма «Drew Scientific Inc.», Великобритания-США); 2 – активированного парциального тромбопластинового (АПТВ), протромбинового (ПВ) и тромбинового (ТВ) времени свертывания, а также концентрации фибриногена – на коагулометре «Thrombostat 2» (фирма

«Behnk Elektronik», Германия); 3 – активности анти-тромбина III – на спектрофотометре «Photometer 5010 v5+» (фирма «Robert Riele GmbH Co & KG», Германия) реагентами фирмы «Технология-Стандарт» (Россия). Результаты оценки АПТВ, ПВ и ТВ представляли в виде отношения, рассчитанного по формуле:

$$Ratio = \frac{BC_{\text{опыт}}}{BC_{\text{контроль}}}, \text{ где:}$$

$Ratio$ – отношение;

$BC_{\text{опыт}}$ – время свертывания в опытной плазме (с);

$BC_{\text{контроль}}$ – время свертывания в контрольной плазме (с).

Уровень D-димера в плазме крови устанавливали при помощи тест-системы «Nycocard® D-Dimer» на анализаторе-рефлектометре «Nycocard Reader II» (фирма «Axis-Shield PoC AS», Норвегия). Кроме того кровь исследовалась на тромбоэластометре «ROTEM® Gamma» (фирма «Pentapharm GmbH», Германия), с реагентом «star-TEM».

Распределение признаков оценивали по критерию Шапиро-Уилки, различия между группами – по t-критерию Стьюдента, U-критерию Манна-Уитни, критерию Фишера, корреляцию – коэффициенту ранговой корреляции Спирмена (rS). Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Обработка результатов проводилась программой MedCalc Version

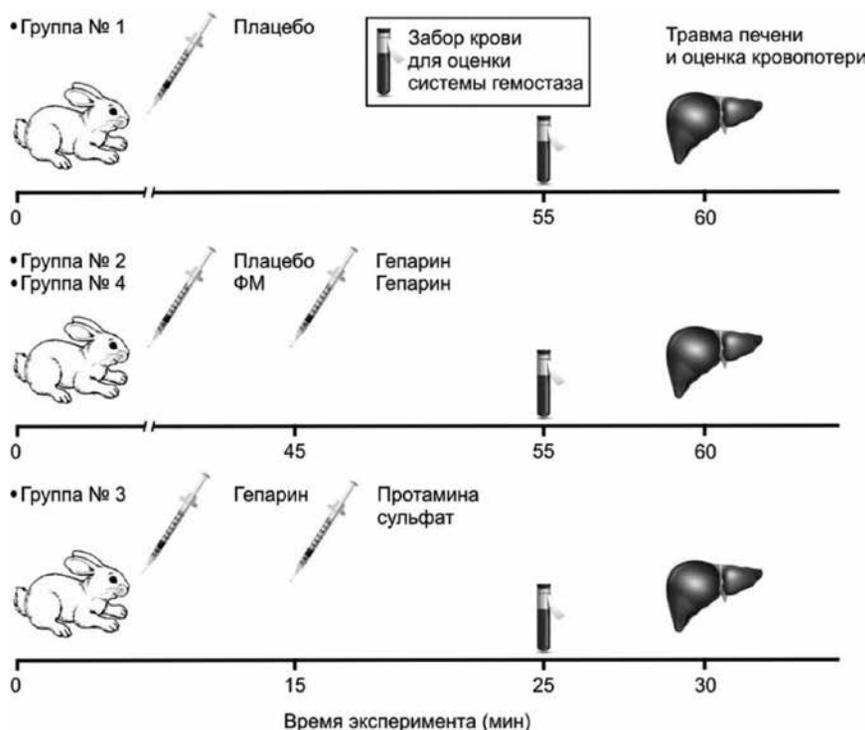


Рис. 1. Дизайн исследований с дозированной травмой печени. ФМ – фибрин-мономер.

17.9.7. Данные представлены в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Me [Q₂₅; Q₇₅]).

Результаты и обсуждение

По итогам исследования установлено число животных с летальным исходом на фоне продолжающейся раневой кровопотери (табл. 1).

В группе 2-й, получавшей плацебо, при введении НГ травма печени сопровождалась высокой летальностью (6 особей из 17 животных). Применение ФМ у гипаринизированных животных статистически значимо уменьшало число погибших животных с травмой печени (гр. 4-я).

Гибель животных была также сопоставима с выраженностью кровопотери (рис. 2). Объем кровопотери в группе гипаринизированных животных, получивших

плацебо при травме (гр. 2-я) был в 1,8 раза больше в сравнении с аналогичным показателем в 1-й группе и составил 18,9 [8,5÷21,8] % и 10,1 [4,1÷13,5] % (по медиане) от величины теоретически рассчитанного ОЦК, соответственно (рис. 2). При этом темп кровопотери у животных в указанных группах не различался.

Полученные результаты у животных 1-й и 2-й групп послужили отправной точкой для изучения эффектов рассматриваемых гемостатиков у гепаринизированных кроликов.

При применении ПС (3-я гр.) и ФМ (4-я гр.) кровопотеря была в 4 (4,7 [3,0÷8,5] % ОЦК) и 5,1 раз (3,7 [2,5÷5,2] % ОЦК) соответственно меньше в сравнении с группой плацебо (2-я гр.) (рис. 2).

Это сопровождалось схожей динамикой изменения темпа кровопотери (в мг/с): после введения ПС

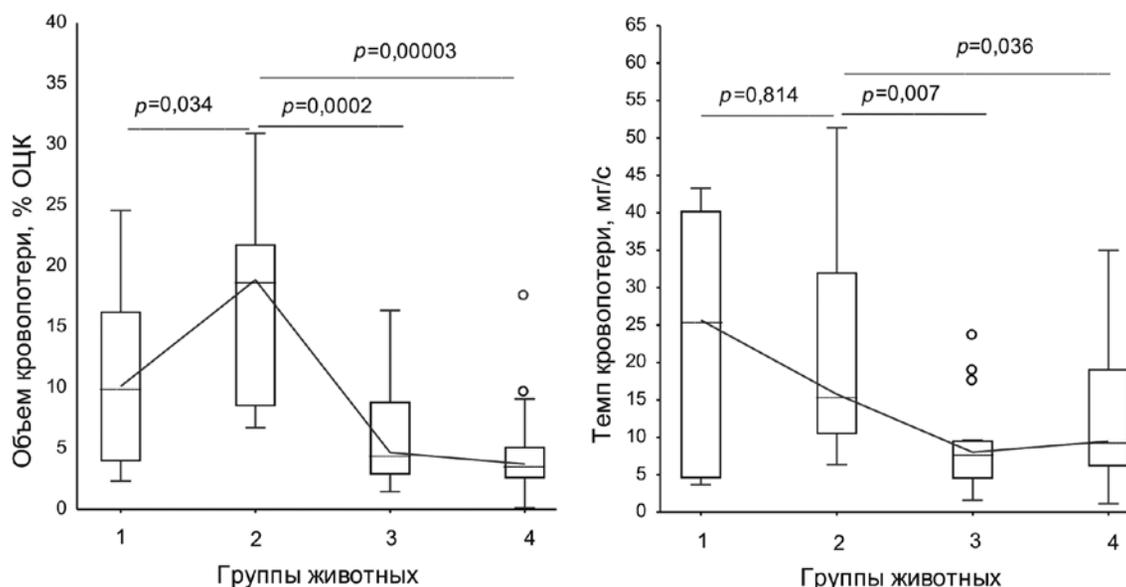


Рис. 2. Параметры кровопотери в экспериментальных группах.

Значения представлены в виде Me – горизонтальной линии внутри прямоугольника и значений, соответствующих 2,5-й и 97,5-й перцентилем – нижний и верхний вертикальные бары

Таблица 1

Летальность животных в различных экспериментальных группах

Показатель	Группа 1-я (плацебо+травма) (n=11)	Группа 2-я (плацебо+гепарин+травма) (n=17)	Группа 3-я (гепарин+ПС+травма) (n=14)	Группа 4-я (гепарин+ФМ+травма) (n=25)
Летальность, количество особей	0	6	1	1
		$p_{1-2}=0,054$	$p_{1-3}=0,560$ $p_{2-3}=0,094$	$p_{1-4}=0,694$ $p_{2-4}=0,012$ $p_{3-4}=0,595$

темп кровопотери снижался в 3-й группе в 2 раза (8,0 [4,8÷9,4]) и при введении ФМ (гр. 4-я) – в 1,7 раза (9,5 [6,1÷19,1]) по сравнению с группой 2-й (15,8 [10,4÷32,1]).

Выявлена корреляция между объемом и темпом кровопотери у животных, получавших ПС (гр. 3-я) $rS=0,86$ ($p=0,00005$). В других группах корреляция отсутствовала.

Наряду с оценкой кровопотери у животных были изучены базовые показатели коагулограммы и данные тромбоэластометрии с целью визуализации гепарин-индуцируемой гипокоагуляции, а также сравнительной оценки результатов введения гемостатиков (табл. 2).

Так, у гепаринизированных животных (гр. 2-я и 4-я) отмечалась гипокоагуляция, проявлявшаяся увеличением отношения АПТВ, ПВ и ТВ, либо полным отсутствием свертывания плазмы крови при измере-

нии ТВ, а также изменения тромбоэластограммы в виде удлинения времени свертывания крови по показателю СТ (регистрация других показателей не проводилась).

Применение ФМ на фоне введения НГ (гр. 4-я), не сопровождалось коррекцией гипокоагуляционного сдвига, что, однако, находилось в противоречии с наблюдаемым системным гемостатическим эффектом. Применение у гепаринизированных животных ПС (гр. 3-я), как и ожидалось, нормализовало параметры коагулограммы и тромбоэластограммы.

Наблюдаемая в работе гепарин-индуцированная гипокоагуляция способствовала массивному раневому кровотечению, что не ново. Однако системный гемостатический эффект низкой дозы ФМ, сравнимый с применением ПС у гепаринизированных животных, ранее описан не был, как и свойство ФМ осуществлять

Таблица 2

Показатели системы гемостаза у животных экспериментальных групп на фоне введения НГ, гемостатиков и плацебо

Показатели	Группа 1-я (плацебо+травма) (n=11)	Группа 2-я (плацебо+гепарин+травма) (n=17)	Группа 3-я (гепарин+ПС+травма) (n=14)	Группа 4-я (ФМ+гепарин+травма) (n=25)
Число тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	480,5 [412,3÷555,0]	412,0 [305,0÷512,0] $p_{1,2}=0,075$	516,5 [478,3÷674,3] $p_{2,3}=0,386$	430,0 [326,0÷512,0] $p_{2,4}=0,111$
АПТВ, отношение	1,0 [0,9÷1,2]	7,2 [5,7÷10,5] (н. с. в 4 случаях) $p_{1,2}=0,0001 \Delta +7,2$ раза	0,9 [0,9÷1,0] $p_{2,3}=0,00003 \Delta -8,0$ раз	5,3 [3,6÷9,7] (н. с. в 6 случаях) $p_{2,4}=0,147$
ПВ, отношение	0,9 [0,9÷1,3]	1,7 [1,4÷2,4] $p_{1,2}=0,001 \Delta +1,9$ раза	0,7 [0,6÷0,9] $p_{2,3}=0,00002 \Delta -2,4$ раза	1,6 [1,2÷2,3] $p_{2,4}=0,427$
ТВ, отношение	0,9 [0,9÷1,0]	н. с. в 16 случаях	0,9 [0,8÷1,1] $p_{1,3}=0,781$	н. с. в 25 случаях
Фибриноген, г/л	3,7 [2,80÷4,50]	3,0 [2,9÷4,7] $p_{1,2}=0,724$	4,5 [3,7÷4,8] $p_{2,3}=0,152$	3,2 [2,8÷3,6] $p_{2,4}=0,481$
Антитромбин III, %	104,0 [96,3÷104,8]	102,4 [96,0÷107,2] $p_{1,2}=0,979$	97,0 [96,0÷99,0] $p_{2,3}=0,075$	101,5 [92,5÷105,0] $p_{2,4}=0,467$
СТ, с	628,0 [473,3÷863,3]	2424,0 [2196,5÷2588,5] $p_{1,2}=0,00007 \Delta +3,9$ раза	627,0 [389,0÷1036,0] $p_{2,3}=0,00003 \Delta -3,9$ раза	2278,0 [1404,0÷2411,0] $p_{2,4}=0,078$
Угол α (градусы)	56,5 [49,5÷65,3]	н.с. в 16 случаях	56,0 [50,3÷60,3] $p_{1,3}=0,430$	н. с. в 23 случаях
CFT, с	198,5 [142,3÷255,5]	н.с. в 17 случаях	198,0 [181,0÷318,0] $p_{1,3}=0,380$	н. с. в 23 случаях
MCF, мм	58,5 [54,0÷64,0]	н.с. в 16 случаях	62,0 [58,0÷67,0] $p_{1,3}=0,539$	н. с. в 21 случае

Примечание. p – уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей; АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время; ПВ – протромбиновое время; ПС – протамина сульфат; ТВ – тромбиновое время; н.с. – нет свертывания; ФМ – фибрин-мономер; СТ – время коагуляции; угол α – амплитуда сгустка; CFT – время образования сгустка; MCF – максимальная твердость сгустка; Δ – разница показателей.

гемостатическую функцию при гипокоагуляции, обусловленной НГ.

Анализируя полученные результаты, а также учитывая, что аналогичные эффекты ФМ были получены ранее и на других экспериментальных моделях со снижением коагуляционного потенциала (с применением дабигатрана этексилата [15] или варфарина² речь может идти о новых механизмах остановки кровотечения, не вписывающихся в современные представления о функционировании системы свертывания крови.

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что физиологическая доза фибрин-мономера (0,25 мг/кг), недостаточная для спонтанного образования сгустка фибрина, способна снижать выраженность посттравматического кровотечения в условиях блокады свертывания крови, обусловленной гепаринизацией животных. При этом кровоостанавливающий эффект фибрин мономера не сопровождается восстановлением гемостатического равновесия, как это происходит при использовании протамина сульфата. Механизмы данного феномена пока не известны и их расшифровка возможна в ходе проведения дальнейших исследований.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Момот А.П., Вдовин В.М.

Сбор и обработка материала — Вдовин В.М., Орехов Д.А., Лычева Н.А., Толстоколов И.Г., Шевченко В.О., Красюкова В.О.

Статистическая обработка — Вдовин В.М.

Написания текста — Вдовин В.М., Момот А.П., Шахматов И.И.

Редактирование — Момот А.П., Вдовин В.М., Шахматов И.И.

Литература

1. Кирюшченков П.А., Ковалев М.В., Тамбовцева М.А. Эволюция использования гепарина в акушерской практике. *Акушерство и гинекология*. 2013; 6: 76-81.
2. Fareed J., Hoppensteadt D.A., Bick R.L. An update on heparins at the beginning of the new millennium. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26(1): 5-21.
3. Баркаган З.С. *Очерки антитромботической фармакопрофилактики и терапии*. М.; Ньюдиамед; 2000.
4. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань; ФЭн; 2000.

² Момот А.П., Вдовин В.М., Толстоколов И.Г., Шахматов И.И., Орехов Д.А., Шевченко В.О., Лычева Н.А., Фохт Э.В., Обухова Л.Е. Способ профилактики кровотечений, вызванных применением варфарина, в эксперименте. Патент 2645414, РФ; 2018.

5. Кузник Б.И. *Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии*. Чита; Экспресс-издательство; 2010.
6. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозов и тромбоэмболических осложнений (ВТЭО). *Флебология*. 2015; 2(4): 2-52.
7. Меджиева О.А., Язынина Е.В., ред. Справочник Видаль. *Лекарственные препараты в России*. Видаль Рус; 2017.
8. Чарная М.А., Клыпа Т.В., Морозов Ю.А., Шмерко Н.П., Гладышева В.Г., Андриянова А.А. Влияние протамина сульфата на систему гемостаза после операций в условиях искусственного кровообращения. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2007; 8: 17-20.
9. Porsche R., Brenner Z.R. Allergy to protamine sulfate. *Heart Lung*. 1999; 28(6): 418-28.
10. Sokolowska E., Kalaska B., Miklosz J., Mogielnicki A. The toxicology of heparin reversal with protamine: past, present and future. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016; 12(8): 897-909.
11. Луговой Э.В. *Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза*. Физико-химический и иммунохимический анализ. Киев; Наукова думка; 2003.
12. Момот А.П., Вдовин В.М., Шахматов И.И., Толстоколов И.Г., Орехов Д.А., Шевченко В.О. и др. Системные гемостатические и протромботические эффекты фибрин-мономера в эксперименте при дозированной травме печени. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39(1): 6-12.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.
14. Soe G.L., Kohno I., Inuzuka K., Itoh Y., Matsuda M. A monoclonal antibody that recognizes a neo-antigen exposed in the E domain of fibrin monomer complexed with fibrinogen or its derivatives: its application to the measurement of soluble fibrin in plasma. *Blood*. 1996; 188(6): 2109-17.
15. Вдовин В.М., Момот А.П., Красюкова В.О., Толстоколов И.Г., Орехов Д.А., Шевченко В.О. и др. Системные гемостатические и гемостазиологические эффекты фибрин-мономера при прямом ингибировании тромбина в эксперименте. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2019; 105(2): 207-15.
16. Kyoung-Jin P., Eui-Hoon K., Hee-Jin K., Sun-Hee K. Evaluation of the Diagnostic Performance of Fibrin Monomer in Disseminated Intravascular Coagulation. *Korean J. Lab. Med.* 2011; 31(3): 143-7.
17. Shaz B.H., Winkler A.M., James A.B., Hillyer C.D., MacLeod J.B. Pathophysiology of Early Trauma Induced Coagulopathy: Emerging Evidence for Hemodilution and Coagulation Factor Depletion. *J. Trauma*. 2011; 70(6): 1401-7.
18. Миронов А.Н., ред. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Ч. 1. М.; Гриф и К; 2012.

References

1. Kiryushchenkov P.A., Kovalev M.V., Tambovceva M.A. Evolution of heparin use in obstetric practice. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2013; 6: 76-81. (in Russian)
2. Fareed J., Hoppensteadt D.A., Bick R.L. An update on heparins at the beginning of the new millennium. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26(1): 5-21.
3. Barkagan Z.S. *Essays on antithrombotic pharmacological prophylaxis and therapy. [Ocherki antitromboticheskoy farmakoprofilaktiki i terapii]*. Moscow; N'yudiamed; 2000. (in Russian)

4. Zubairov D.M. *Molecular basis of blood clotting and thrombus formation. [Molekulyarnye osnovy svertyvaniya krovi i tromboobrazovaniya]*. Kazan; Fen; 2000. (in Russian)
5. Kuznik B.I. *Cellular and molecular regulation mechanisms of hemostasis system in health and disease. [Kletochnye i molekulyarnye mekhanizmy regulyatsii sistemy gemostaza v norme i patologii]*. Chita; Ekspress-izdatel'stvo; 2010. (in Russian)
6. Russian clinical guidelines for diagnosis, treatment and prevention of venous thromboembolic complications (VTE). *Flebologiya*. 2015; 2(4): 2-52. (in Russian)
7. Medzhieva O.A., Yazynina E.V., red. *Reference Vidal. Medications in Russia. [Spravochnik Vidal'. Lekarsvennyye preparaty v Rossii]*. Vidal' Rus; 2017. (in Russian)
8. Charnaya M.A., Klypa T.V., Morozov Yu.A., Shmerko N.P., Gladysheva V.G., Andriyanova A.A. The effect of protamine sulfate on the hemostasis system after operations under conditions of artificial blood circulation. *Hirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova*. 2007; 8: 17-20. (in Russian)
9. Porsche R., Brenner Z.R. Allergy to protamine sulfate. *Heart Lung*. 1999; 28(6): 418-28.
10. Sokolowska E., Kalaska B., Miklosz J., Mogielnicki A. The toxicology of heparin reversal with protamine: past, present and future. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016; 12(8): 897-909.
11. Lugovskoy E.V. *Molecular mechanisms of fibrin formation and fibrinolysis. Physico-chemical and immunochemical analysis. [Molekulyarnye mekhanizmy obrazovaniya fibrina i fibrinoliza. Fiziko-khimicheskii i immunokhimicheskii analiz]*. Kiev; Naukova dumka; 2003. (in Russian)
12. Momot A.P., Vdovin V.M., Shahmatov I.I., Tolstokorov I.G., Orekhov D.A., Shevchenko V.O. et al. Systemic hemostatic and prothrombotic effects of fibrin monomer in the experiment with dosed injury of the liver. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*. 2019; 39(1): 6-12. (in Russian)
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.
14. Soe G.L., Kohno I., Inuzuka K., Itoh Y., Matsuda M. A monoclonal antibody that recognizes a neo-antigen exposed in the E domain of fibrin monomer complexed with fibrinogen or its derivatives: its application to the measurement of soluble fibrin in plasma. *Blood*. 1996; 188(6): 2109-17.
15. Vdovin V.M., Momot A.P., Krasnyukova V.O., Tolstokorov I.G., Orekhov D.A., Shevchenko V.O. et al. Systemic hemostatic and hemostasiological effects of fibrin monomer with direct inhibition of thrombin in the experiment. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2019; 105(2): 207-15. (in Russian)
16. Kyoung-Jin P., Eui-Hoon K., Hee-Jin K., Sun-Hee K. Evaluation of the Diagnostic Performance of Fibrin Monomer in Disseminated Intravascular Coagulation. *Korean J. Lab. Med*. 2011; 31(3): 143-7.
17. Shaz B.H., Winkler A.M., James A.B., Hillyer C.D., MacLeod J.B. Pathophysiology of Early Trauma Induced Coagulopathy: Emerging Evidence for Hemodilution and Coagulation Factor Depletion. *J. Trauma*. 2011; 70(6): 1401-7.
18. Mironov A.N., red. *Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. CH. 1. Moscow; Grif i K; 2012. (in Russian)

Сведения об авторах:

Момот Андрей Павлович, директор Алтайского филиала ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; проф. каф. сестринского дела ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России; гл. науч. сотр. лаб. физиологии и патологии гемостаза и гемодинамики ФГБНУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины», доктор мед. наук, проф., e-mail: xuzan@yandex.ru;

Вдовин Вячеслав Михайлович, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России; ст. науч. сотр. лаб. физиологии и патологии гемостаза и гемодинамики ФГБНУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины», канд. мед. наук, доцент, e-mail: erytrab@gmail.com;

Орехов Дмитрий Андреевич, хирург, КГБУЗ «Алтайский краевой кардиологический диспансер», г. Барнаул, Россия, e-mail: orekhoffs@mail;

Лычёва Наталья Александровна, доцент каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России; мл. науч. сотр. лаб. физиологии и патологии гемостаза и гемодинамики ФГБНУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины», канд. биол. наук, доцент, e-mail: natalia.lycheva@yandex.ru;

Толстокоров Игорь Геннадьевич, канд. мед. наук, хирург ООО КДЦ «Добрый доктор», e-mail: e-igorka69@yandex.ru;

Шевченко Валентин Олегович, хирург ООО КДЦ «Добрый доктор», e-mail: valentin_shevche@mail.ru;

Красюкова Вероника Олеговна, ассистент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России, e-mail: 922kvo@mail.ru;

Шахматов Игорь Ильич, зав. каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России; гл. науч. сотр. лаб. физиологии и патологии гемостаза и гемодинамики ФГБНУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины», доктор мед. наук, проф., e-mail: iish59@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-153.1

Байбурина Г.А., Нургалева Е.А., Самигуллина А.Ф., Аглетдинов Э.Ф.

Особенности свободнорадикального окисления и динамики содержания кортикостероидных рецепторов в легких у животных с разной чувствительностью к гипоксии в постреанимационном периоде

ФГБОУ «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450008, г. Уфа, ул. Ленина 3

Цель исследования – изучение особенностей динамики показателей свободнорадикального окисления и уровня кортикостероидных рецепторов в легких у животных с разной чувствительностью к гипоксии в постреанимационном периоде.

Методика. Эксперимент выполнен на самцах беспородных белых крыс, разделенных по устойчивости к гипоксии на 2 группы: неустойчивые и высокоустойчивые. Остановку системного кровообращения продолжительностью 5 мин моделировали под общим эфирным наркозом (через 1 нед после тестирования на устойчивость к гипоксии) интраторакальным пережатием сосудистого пучка сердца с последующей реанимацией. Через 1, 3, 5, 7, 14, 21 и 35 сут животных под эфирным наркозом декапитировали. В плазме крови определяли содержание кортикостерона и альдостерона, в гомогенатах легких – концентрацию глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов, уровни продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, карбонилированных белков, железозависимое образование битирозина, активность супероксиддисмутазы, каталазы, содержание восстановленного глутатиона.

Результаты. Установлено, что для неустойчивых к гипоксии животных характерна высокая интенсивность свободнорадикального окисления, проявляющаяся развитием карбонильного стресса на фоне снижения активности ключевых антиоксидантов и сопряженная с выраженными изменениями динамики кортикостероидных рецепторов: в первые 3 сут постреанимационного периода наблюдалось снижение уровня кортикостероидных рецепторов, а к концу 35-суточного мониторинга значительное нарастание концентрации минералокортикоидных рецепторов. Высокую степень устойчивости к гипоксии отличает относительно низкая интенсивность свободнорадикального окисления, характеризующаяся только усилением липопероксидации за счет адекватной емкости и сохранности водорастворимых антиоксидантных систем, экранирующих белки. В раннем восстановительном периоде это сопровождается сохранением уровня кортикостероидных рецепторов, в позднем – существенным ростом концентрации глюкокортикоидных рецепторов.

Заключение. Увеличение содержания глюкокортикоидных рецепторов у высокоустойчивых к гипоксии животных в позднем восстановительном периоде (14-е – 35-е сут) играет важную роль, предположительно путем модулирования течения воспалительного процесса, ограничения неконтролируемых иммунных реакции и повреждение тканей. Следствием значительного нарастания концентрации минералокортикоидных рецепторов у животных с низкой устойчивостью к гипоксии может быть усиление сосудистого ремоделирования и развитие фиброза в легких.

Ключевые слова: глюкокортикоидные рецепторы, минералокортикоидные рецепторы, свободнорадикальное окисление, резистентность к гипоксии.

Для цитирования: Байбурина Г.А., Нургалева Е.А., Самигуллина А.Ф., Аглетдинов Э.Ф. особенности свободнорадикального окисления и динамики содержания кортикостероидных рецепторов в легких у животных с разной чувствительностью к гипоксии в постреанимационном периоде. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 56-63.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.56-63

Для корреспонденции: Байбурина Гульнара Анусовна, e-mail: gulnar.2014@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.05.2019

Bayburina G.A., Nurgaleeva E.A., Samigullina A.F., Agletdinov E.F.

Effect of free radical oxidation and content of corticosteroid receptors in lungs of animals with different sensitivity to hypoxia in the postresuscitation period

Bashkir State Medical University,
Lenina Str. 3, Ufa 450008, Russia

Aim. The aim of the study was to characterize changes in free radical oxidation and corticosteroid receptor density in the lungs of animals with different sensitivity to hypoxia in the postresuscitation period.

Methods. Experiments were performed on mongrel male white rats divided into two groups based on their hypoxia resistance, non-resistant and highly resistant. One week after testing the rats for resistance to hypoxia, a 5-min arrest of systemic circulation was modeled under ether anesthesia by intrathoracic compression of the vascular bundle of the heart with subsequent resuscitation. The follow-up period was 35 days. At 1, 3, 5, 7, 14, 21, and 35 days, the animals were sacrificed by decapitation under ether anesthesia, and blood and tissue samples were collected. Concentrations of corticosterone and aldosterone were measured in plasma; concentrations of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors, thiobarbituric acid reactive substances, and carbonylated proteins, iron-dependent formation of dityrosine, activities of superoxide dismutase and catalase, and concentration of reduced glutathione were measured in lung homogenates.

Results. Hypoxia non-resistant rats had a high intensity of free radical oxidation as evident from the development of carbonyl stress associated with decreased activities of key antioxidants and pronounced changes in the dynamics of corticosteroid receptors. A reduced level of corticosteroid receptors was observed in the first three days of resuscitation period and followed by a significant increase in mineralocorticoid receptors at the end of 35-day monitoring. High resistance to hypoxia was characterized by a relatively low intensity of free radical oxidation, evident only from increased lipid peroxidation, due to an adequate capacity and preservation of water-soluble antioxidants. During the early recovery period, high resistance to hypoxia was associated with preserved level of corticosteroid receptors whereas during late recovery, the high hypoxia resistance was associated with a significant increase in the concentration of glucocorticoid receptors.

Conclusion. The increased density of glucocorticoid receptors in hypoxia high-resistant animals during the late recovery period (days 14-35) plays an important role, presumably by modulating the inflammatory process and restricting uncontrolled immune responses and tissue damage. The significant increase in mineralocorticoid receptors in hypoxia low-resistance animals may result in stimulation of vascular remodeling and development of pulmonary fibrosis.

Keywords: glucocorticoid receptors; mineralocorticoid receptors; free radical oxidation; resistance to hypoxia.

For citation: Bayburina G.A., Nurgaleeva E.A., Samigullina A.F., Agletdinov E.F. Effect of free radical oxidation on content of corticosteroid receptors in the lungs of animals with different sensitivity to hypoxia in the postresuscitation period. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 56-63. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.56-63

For correspondence: *Gulnar A. Bayburina*, Candidate of Sciences in Medicine, Associate Professor at the Department of Pathophysiology, «Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Medical University»; 3 Lenin str., 450008, Ufa, Russian Federation, e-mail: gulnar.2014@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 17.05.2019

Известно, что в патогенезе большинства критических состояний ведущими факторами являются гипоксия и реоксигенация, инициирующие развитие сложного комплекса патологических и компенсаторно-приспособительных реакций. Несмотря на универсальность метаболических сдвигов, вызываемых дефицитом кислорода, диапазон функциональных последствий гипоксии у разных организмов различен, что

обусловлено генетически детерминированными физиолого-биохимическими реакциями [1].

Для реализации компенсаторно-приспособительных реакций при острой гипоксии необходимо согласование множества метаболических процессов, включая свободно-радикальное окисление (СРО), которое осуществляется, в том числе, с участием гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы. Особенности СРО в

тканях определяются образованием не только продуктов свободнорадикальной деструкции липидов, но также углеводов и белков, что сопровождается накоплением карбонильных соединений с высокой реакционной способностью и выраженными токсическими свойствами. Это приводит к развитию так называемого карбонильного стресса, считающегося наиболее тяжелым проявлением окислительного стресса [2]. Кортикостероидные рецепторы, будучи белковыми соединениями, могут активно вовлекаться в патологические процессы, индуцированные карбонильным стрессом.

Эндогенные глюкокортикоиды опосредуют большую часть своих действий через близкородственные глюко- (ГР) и минералокортикоидные рецепторы (МР). Баланс между экспрессией МР и ГР имеет решающее значение для гомеостаза, поскольку оба рецептора способны активировать одни и те же гены-мишени, вызывая разные, а иногда и противоположные эффекты при действии глюкокортикоидов [3].

Цель исследования – изучение особенностей динамики показателей свободнорадикального окисления и уровня кортикостероидных рецепторов в легких у животных с разной чувствительностью к гипоксии в постреанимационном периоде.

Методика

Исследования проводились в соответствии с требованиями правил проведения работ с экспериментальными животными, с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации.

Исследования выполнены на 160 половозрелых беспородных белых крысах-самцах массой 200–220 г. Опыты проводили в первой половине дня. По итогам предварительного тестирования были выделены 2 группы: неустойчивые (НУ) и высокоустойчивые (ВУ) к гипоксии животные [4] по 70 опытных и 10 контрольных крыс в каждой. Через нед после тестирования под общим эфирным наркозом моделировали 5-минутную остановку системного кровообращения интраторакальным пережатием сосудистого пучка сердца с последующей реанимацией по методу В.Г. Корпачева [5]. Контрольная группа получала эфирный наркоз без моделирования клинической смерти. Период наблюдения составлял 35 сут. По истечении 1, 3, 5, 7, 14, 21 и 35 сут животных под эфирным наркозом декапитировали и осуществляли забор крови и тканей для исследования.

Содержание кортикостерона и альдостерона в плазме крови изучали иммунорадиометрическим методом (стандартные тест-системы фирмы IMMUNOTECH, Франция). Содержание глюко- и минералокортикоид-

ных рецепторов в гомогенатах легких определяли методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных тест-систем для тканей крыс ELISA Kit (Китай) фирмы Cloud-Clone Corp. (США) в соответствии с протоколом производителя.

Содержание в гомогенатах легких продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-рп), определяли с помощью набора реактивов фирмы ООО АГАТ-МЕД (Москва), карбонилированных белков (КБ) – по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином с спектрофотометрической регистрацией динитрофенилгидразонов [6], железо-зависимое образование бигидроксилина (БГ) – по методу Е.Е. Дубининой [6]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных тест-систем «RANSOD» фирмы «Randox Laboratories Ltd» (Великобритания), каталазы – по методу М.А. Королюка (1988) [7], содержание восстановленного глутатиона (GSH) оценивали по Patterson и соавт., в модификации Путилиной (1982) [8].

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 с расчетом медианы (Me), межквартильных интервалов [25%–75%]. Значимость различий средних величин оценивали, используя U-критерий Манна-Уитни. Для выявления связи признаков применяли корреляционный анализ по Спирмену. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В постреанимационном периоде были выявлены в динамике отчетливые различия в интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ) в зависимости от устойчивости животных к гипоксии. Тенденция к разнонаправленным реакциям звеньев СРО, описанная нами ранее в печени [9], проявилась и в ткани легких: у ВУ животных в ходе постреанимационного периода преобладали процессы ПОЛ, а у НУ животных – ОМБ с отчетливой реципрокностью их динамики (рис. 1, а–в). То есть, у ВУ к гипоксии крыс свободнорадикальное повреждение молекул ограничивалось только липидами за счет адекватной емкости и сохранности водорастворимых компонентов антиоксидантных систем, экранирующих белки, что согласуется с данными по активности ключевых антиоксидантов (рис. 1, г).

Так, у ВУ для каталазы была характерна значительная индукция активности на всем протяжении эксперимента (у НУ – она снижена или сопоставима с контролем); уровень восстановленного глутатиона статистически значимо снижался, но при этом на всех

сроках постреанимационного периода, кроме 1-х сут, был статистически значимо выше, чем в оппозитной группе. Высокую устойчивость в обеих группах проявляла супероксиддисмутаза: в ходе всего эксперимента ее активность была сопоставима с контролем.

Сопоставление уровня гормонов (рис. 2) и содержания ГР в различные сроки наблюдения у ВУ крыс (таблица) показало, что не всегда динамика изменения содержания рецепторов и плазменного кортикостерона была однонаправленной.

Так, пиковая концентрация плазменного кортикостерона и альдостерона в 1-е сут постреанимационного периода вызвала статистически значимый рост уровня ГР и тенденцию к росту МР. В интервале 3-7-е сут следовала адекватная реакция системы «гормон

– рецептор». Наиболее высокие значения уровня ГР отмечались в промежутке 14-е – 35-е сут (122-140% от контрольных значений), когда уровень кортикостерона был наименьшим (68-76%). В этот период отмечалась статистически значимая отрицательная корреляция между уровнями ГР и кортикостерона (14-е сут $r = -0,75, p=0,013$; 21-е сут $r = -0,786, p=0,007$; 35-е сут $r = -0,81, p=0,005$).

Из сказанного следует, что в 1-е сут действовали механизмы, лимитирующие рост содержания ГР, а в более позднем периоде, напротив, усиливающие. Такой неадекватный стимулу рецепторный ответ в группе ВУ к гипоксии животных препятствует полноценной реализации адаптивного стрессового ответа. На ранних сроках эта ситуация может быть обусловлена

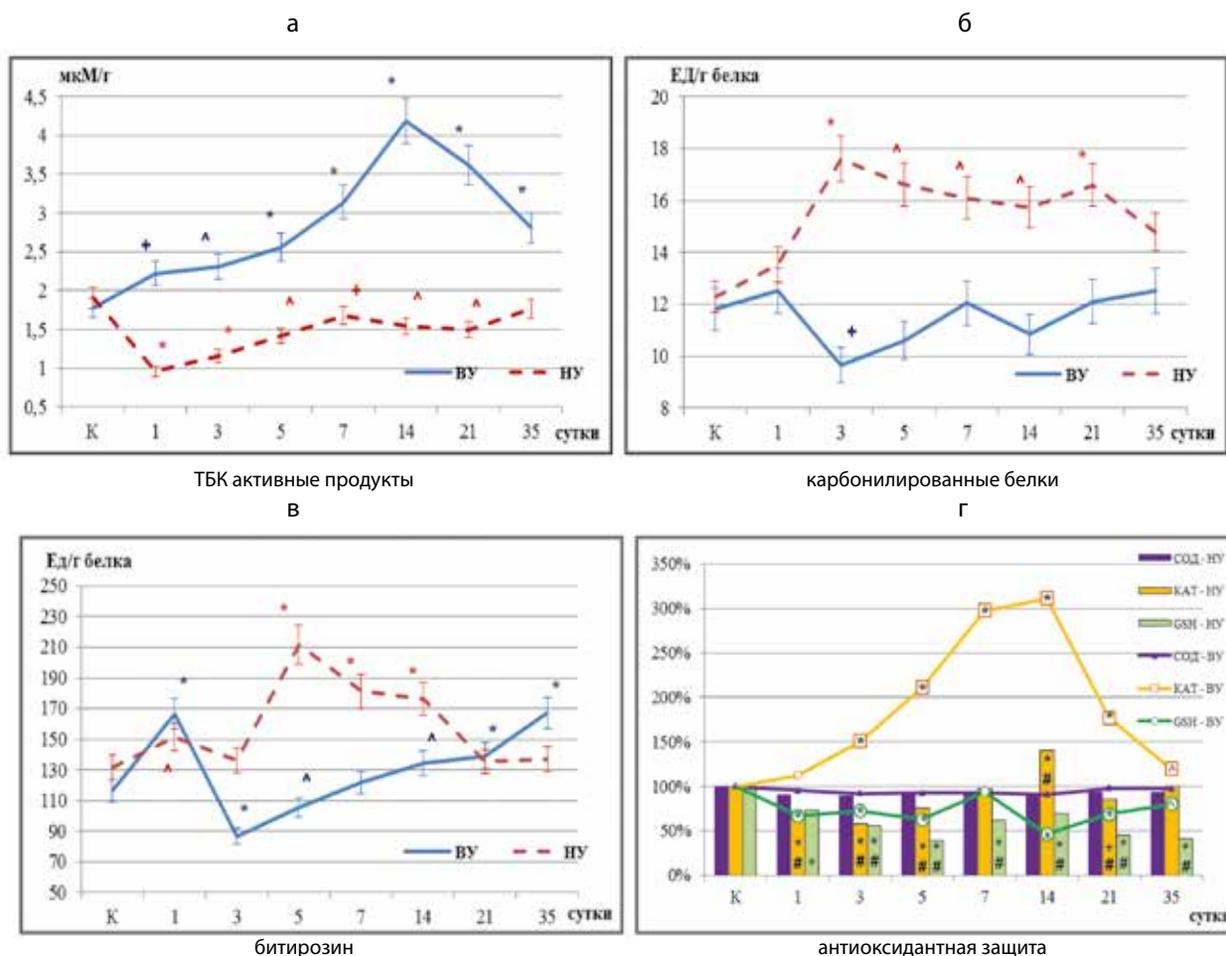


Рис. 1. Показатели свободнорадикального окисления (а-в) и антиоксидантной защиты (г) в гомогенатах легких крыс высокоустойчивых (ВУ) и неустойчивых (НУ) к гипоксии.

Статистическая значимость различий: + $p \leq 0,05$, $\Delta p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$ в сравнении с группой контроля; # $p \leq 0,05$ между группами ВУ и НУ к гипоксии.

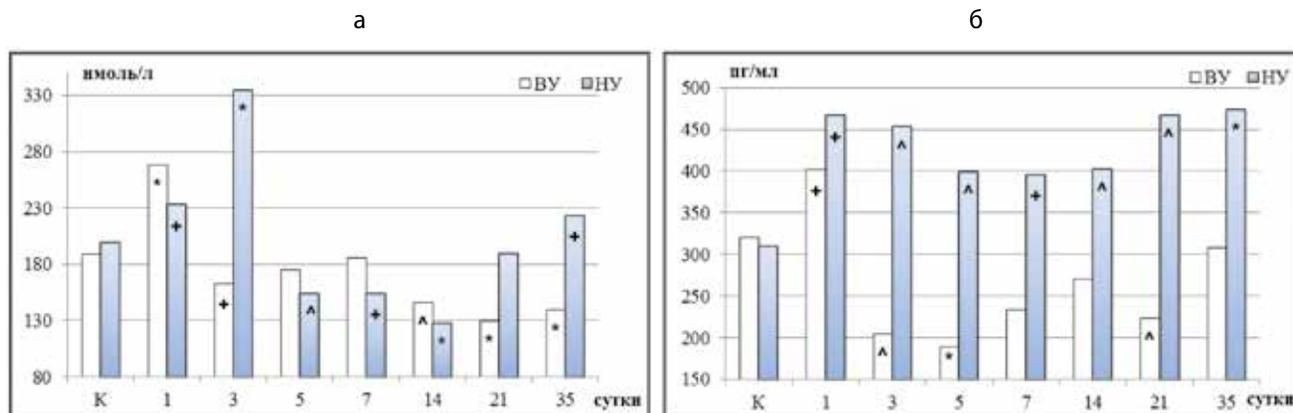


Рис. 2. Содержание а) кортикостерона и б) альдостерона в плазме крови крыс высокоустойчивых (BV) и неустойчивых (NV) к гипоксии в динамике постреанимационного периода.

Статистическая значимость различий в сравнении с группой контроля: + $p \leq 0,05$, ^ $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$.

Таблица

Содержание кортикостероидных рецепторов в гомогенатах легких крыс с разной устойчивостью к гипоксии в динамике постреанимационного периода, Ме [25%-75%]

Периоды наблюдения	Глюкокортикоидные рецепторы, мкг/г белка		Минералокортикоидные рецепторы, нг/г белка	
	Группы животных по устойчивости к гипоксии			
	высокоустойчивые	неустойчивые	высокоустойчивые	неустойчивые
контроль	27,31 [24,16-29,46]	23,86 [20,33-27,49] $p_1=0,199$	23,81 [20,11-27,11]	26,27 [24,58-30,42] $p_1=0,196$
1 сут	32,41 [28,80-36,10] $p=0,041$	18,84 [16,43-22,13] $p=0,037, p_1<0,001$	25,17 [19,08-32,98] $p=0,596$	27,14 [20,70-27,58] $p=0,821, p_1=0,034$
3 сут	22,64 [18,73-23,89] $p=0,048$	13,28 [10,63-16,02] $p<0,001, p_1<0,001$	18,12 [14,12-22,31] $p=0,012$	29,76 [24,60-41,93] $p=0,256, p_1=0,001$
5 сут	24,34 [19,68-29,31] $p=0,405$	21,19 [17,76-23,58] $p=0,131, p_1=0,131$	15,52 [10,23-17,49] $p=0,005$	25,67 [18,29-27,62] $p=0,405, p_1=0,007$
7 сут	25,38 [21,63-35,30] $p=0,821$	22,59 [18,54-24,66] $p=0,406, p_1=0,151$	24,63 [19,76-28,46] $p=0,938$	35,16 [30,10-39,18] $p=0,004, p_1=0,001$
14 сут	33,44 [27,94-36,21] $p=0,041$	26,01 [19,76-27,46] $p=0,939, p_1=0,034$	15,18 [10,26-18,46] $p=0,001$	37,42 [29,35-44,47] $p=0,008, p_1<0,001$
21 сут	36,83 [33,26-41,55] $p<0,001$	24,33 [21,13-28,06] $p=0,705, p_1=0,019$	22,44 [19,76-26,43] $p=0,623$	32,46 [27,20-34,34] $p=0,028, p_1=0,003$
35 сут	38,28 [30,15-45,65] $p=0,007$	26,84 [24,16-32,26] $p=0,112, p_1=0,034$	20,17 [16,89-22,16] $p=0,185$	30,61 [28,77-32,79] $p=0,04, p_1=0,048$

Примечание. p – статистическая значимость различий в сравнении с контрольной группой, p_1 – между группами животных с разной устойчивостью к гипоксии.

кратковременным усилением ОМБ. В этот отрезок времени выявляются статистически значимые отрицательные корреляции между уровнем ГР и битиризином ($r = -0,649$, $p=0,041$), ГР и кортикостероном ($r=-0,661$, $p=0,032$).

В экспериментальных исследованиях, проведенных нами ранее, было установлено, что для постреанимационного периода характерны 2 волны эндотоксинемии с максимумом в 1-е – 3-и и 10-е – 14-е сут, причем вторая волна эндотоксикоза обусловлена системным воспалительным ответом и развитием синдрома полиорганной недостаточности [10]. В ряде источников литературы показано, что ГР могут взаимодействовать с провоспалительными факторами транскрипции (NF κ B и AP-1), чтобы опосредовать репрессию генов [11], а также влиять на индукцию генов, кодирующих противовоспалительные белки [12]. Тем самым нарастание плотности ГР у ВУ животных в позднем восстановительном периоде 14-е – 35-е сут играет важную роль в модуляции течения воспалительного процесса. Известно, что относительный дефицит глюкокортикоидных гормонов в легких может быть в некоторой степени компенсирован их локальной продукцией в результате активации глюкокортикоид-конвертирующего фермента 11-бета-гидроксистероид-дегидрогеназы 1 типа (11 β -HSD1), что может способствовать ограничению неконтролируемых иммунных реакций и повреждения тканей [13]. Механизм повышения экспрессии фермента 11 β -HSD1 связывают с активацией фактора транскрипции AP-1, связанного с MAPK-сигнализацией через пути ERK1/2 и JNK [14].

Таким образом, у ВУ животных в легких наблюдалось преобладание содержания ГР в течение всего эксперимента (рис. 3) вне зависимости от концентрации плазменного кортикостерона, в отличие от МР, динамика концентрации которых была адекватна уровню глюкокортикоидных гормонов.

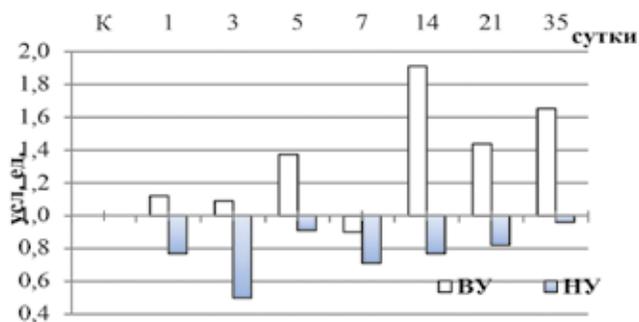


Рис. 3. Динамика соотношения кортикостероидных рецепторов ГР/МР в легких крыс в постреанимационном периоде.

У животных МУ к гипоксии, напротив, в ходе всеобщего постреанимационного периода наблюдалось смещение баланса рецепторов в сторону превалирования уровня МР (рис. 3). Эффект снижения плотности рецепторов на фоне высокого уровня гормонов был более длительным (1-е – 3-и сут) и затронул, в основном, ГР (табл.). Одним из вероятных факторов, препятствующих реализации адаптивных противовоспалительных эффектов глюкокортикоидов через ГР-сигнализацию в периоде раннего эндотоксикоза, является высокий уровень ОМБ. Таким образом, формируется порочный круг: ишемия-реперфузия – высокий уровень ОМБ – снижение содержания глюкокортикоидных рецепторов – снижение адаптивной глюкокортикоидной регуляции в ткани легких – интенсификация окислительного стресса – высокий уровень ОМБ.

Снижение содержания ГР на фоне высокой плазменной концентрации кортикостерона (1-е – 3-и сут) при сохранении чувствительности МР способствует увеличению уровня этих рецепторов. Повышение концентрации МР, наблюдаемое в период статистически значимого снижения уровня кортикостерона (5-е – 35-е сут), обусловлено стимуляцией рецепторов высоким содержанием в крови альдостерона. В результате наблюдается усиление эффектов, реализуемых гормонами через МР-сигнализацию.

Повышение активности МР является неблагоприятным фактором, влияющим на течение восстановительных процессов после ишемии-реперфузии легких. Есть данные, что гипоксия увеличивает экспрессию стероидогенного регуляторного белка StAR в эндотелиальных клетках легочной артерии и стимулирует экстраадrenalовый синтез альдостерона, что, в свою очередь, способствует сосудистому ремоделированию, включая фиброз [15–17]. МР-активация также способствует образованию АФК и развитию окислительного стресса, что, в свою очередь, стимулирует пролиферацию клеток сосудов [18].

Таким образом, начиная с 5-х сут постреанимационного периода в группе МУ животных порочный круг трансформируется: ишемия-реперфузия – усиление ОМБ – снижение содержания глюкокортикоидных рецепторов – снижение адаптивной глюкокортикоидной регуляции – неадекватное усиление минералокортикоидной регуляции – усиление окислительного стресса – формирование условий для развития отсроченных осложнений в виде сосудистого ремоделирования и фиброза.

Заключение

Таким образом, высокая интенсивность свободно-радикального окисления, проявляющаяся развитием

карбонильного стресса у неустойчивых к гипоксии животных на фоне снижения активности ключевых антиоксидантов, сопряжена с более выраженными изменениями динамики кортикостероидных рецепторов: в первые 3 сут постреанимационного периода наблюдалось снижение уровня кортикостероидных рецепторов в легких, а к концу 35-суточного мониторинга значительное нарастание уровня минералокортикоидных рецепторов. Высокую степень устойчивости к гипоксии отличает относительно низкая интенсивность свободнорадикального окисления, характеризующаяся только усилением липопероксидации. В раннем восстановительном периоде это сопровождается сохранением уровня кортикостероидных рецепторов, в позднем – существенным увеличением содержания глюкокортикоидных рецепторов.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Байбурина Г.А.

Сбор и обработка материала – Байбурина Г.А., Нургалеева Е.А., Самигуллина А.Ф., Аглетдинов Э.Ф.

Статистическая обработка – Байбурина Г.А., Нургалеева Е.А.

Написание текста – Байбурина Г.А., Самигуллина А.Ф.

Литература

1. Лукьянова Л.Д. Дизрегуляция аэробного энергетического обмена – типовой патологический процесс. В кн.: *Дизрегуляторная патология*. М.; Медицина; 2002. 188-215.
2. Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Свободные радикалы как участники регуляторных и патологических процессов. В кн.: *Фундаментальные науки – медицине: биофизические медицинские технологии*. М.; МАКС Пресс; 2015; Т. 1: 38-71.
3. Richardson R.V., Batchen E.J., Denvir M.A., Gray G.A., Chapman K.E. Cardiac GR and MR: from development to pathology. *Trends Endocrinol. Metab.* 2016; 27(1): 35–43. doi:10.1016/j.tem.2015.10.001.
4. Байбурина Г.А., Нургалеева Е.А., Шибкова Д.З. *Способ определения степени устойчивости к гипобарической гипоксии мелких лабораторных животных*: Патент 2563059, РФ; 2015.
5. Кorpачев В.Г., Лысенков С.П., Телль Л.З. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1982; 3: 78-80.
6. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). *Физиологические и клинико-биохимические аспекты*. СПб; Медицинская пресса; 2006.
7. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16-8.
8. Прохорова М.И. (ред.) Методы биохимических исследований. Л.; Изд-во Ленинградского университета; 1982.
9. Байбурина Г.А. Влияние свободнорадикального окисления на уровень кортикостероидных рецепторов в печени у животных в зависимости от исходной чувствительности к гипоксии в динамике постреанимационного периода. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2018; 2(67): 30-4.

10. Нургалеева Е.А., Еникеев Д.А., Фаршатова Е.Р., Нараева Л.В., Александров М.А. Роль эндотоксикоза постреанимационного периода, цитокинового профиля, уровня гликозаминогликанов в механизмах повреждения легочной ткани. *Астраханский медицинский журнал*. 2012; 7(3): 90-4.
11. Ratman D., Vanden Berghe W., Dejager L., Libert C., Tavernier J., Beck I.M. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013; 380(1–2): 41-54. doi: 10.1016/j.mce.2012.12.014
12. De Bosscher K., Beck I.M., Ratman D., Berghe W.V., Libert C. Activation of the Glucocorticoid Receptor in Acute Inflammation: the SEDIGRAM Concept. *Trends Pharmacol. Sci.* 2016; 37(1): 4–16. doi: 10.1016/j.tips.2015.09.002
13. Hostettler N., Bianchi P., Gennari-Moser C., Kassahn D., Schoonjans K., Corazza N. Local glucocorticoid production in the mouse lung is induced by immune cell stimulation. *Allergy*. 2012; 67(2): 227-34. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02749.x.
14. Hu A., Fatma S., Cao J., Grunstein J.S., Nino G., Grumbach Y. Th2 cytokine-induced upregulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 facilitates glucocorticoid suppression of proasthmatic airway smooth muscle function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2009; 296(5): L790-803. doi: 10.1152/ajplung.90572.2008.
15. Voelkel N.F., Mizuno S., Bogaard H.J. The role of hypoxia in pulmonary vascular diseases: a perspective. *J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2013; 304(7): L457-465.
16. Preston I.R., Sagliani K.D., Warburton R.R., Hill N.S., Fanburg B.L., Jaffe I.Z. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2013; 304(10): L678-L688. doi:10.1152/ajplung.00300.2012
17. Maron B.A., Oldham W.M., Chan S.Y., Vargas S.O., Arons E., Zhang Y.Y. Upregulation of steroidogenic acute regulatory protein by hypoxia stimulates aldosterone synthesis in pulmonary artery endothelial cells to promote pulmonary vascular fibrosis. *Circulation*. 2014; 130(2): 168-79. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007690.
18. Newfell B.G., Iyer L.K., Mohammad N.N., McGraw A.P., Ehsan A., Rosano G. Aldosterone regulates vascular gene transcription via oxidative stress-dependent and -independent pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31(8): 1871-80.

References

1. Luk'yanova L.D. Dysregulation of aerobic energy metabolism – a typical pathological process. In: *Dysregulation pathology [Dizregulyatsionnaya patologiya]*. Moscow; Meditsina; 2002; 188-215. (in Russian)
2. Proskurnina E.V., Vladimirov Yu.A. Free radicals as participants of regulatory and pathological processes. In: *Basic sciences – medicine: biophysical medical technologies [Fundamental'nye nauki – meditsine: biofizicheskie meditsinskie tekhnologii]*. Moscow; MAKS Press; 2015; т. 1: 38-71. (in Russian)
3. Richardson R.V., Batchen E.J., Denvir M.A., Gray G.A., Chapman K.E. Cardiac GR and MR: from development to pathology. *Trends Endocrinol. Metab.* 2016; 27(1): 35–43. doi:10.1016/j.tem.2015.10.001.
4. Bayburina G.A., Nurgaleeva E.A., Shibkova D.Z. *Method for determining the degree of resistance to hypobaric hypoxia of small laboratory animals: Patent 2563059, RF; 2015. [Sposob opredeleniya stepeni ustoychivosti k gipobaricheskoy gipoksii melkikh laboratornykh zhivotnykh: Patent 2563059, RF; 2015]*. (in Russian)
5. Korpachev V.G., Lysenkov S.P., Tell' L.Z. Modeling of clinical death and postresuscitation disease in rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 1982; 3: 78-80. (in Russian)

6. Dubinina E.E. *Products of oxygen metabolism in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinical-biochemical aspects. [Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noy aktivnosti kletok (zhizn' i smert', sozhdanie i razrushe-nie). Fiziologicheskie i kliniko-biokhimicheskie aspekty]*. Saint Petersburg; Meditsinskaya pressa; 2006. (in Russian)
7. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G. Method for determining catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16-8. (in Russian)
8. Prohorova M.I. (red.) *Biochemical research methods. [Metody biokhimicheskikh issledovaniy]*. Leningrad; Izdatelstvo Leningradskogo universiteta; 1982. (in Russian)
9. Bayburina G.A. Effect of free radical oxidation on the level of corticosteroid receptors in the liver in animals depending on the initial sensitivity to hypoxia in the dynamics of the post-resuscitation period. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*. 2018; 2(67): 30-4. (in Russian)
10. Nurgaleeva E.A., Enikeev D.A., Farshatova E.R., Nagaeva L.V., Aleksandrov M.A. The role of endotoxemia postoperative period, cytokine profile, levels of glycosaminoglycans in the mechanisms of damage to pulmonary tissue. *Astrahanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 7(3): 90-4. (in Russian)
11. Ratman D., Vanden Berghe W., Dejager L., Libert C., Tavernier J., Beck I.M. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2013; 380(1-2): 41-54. doi: 10.1016/j.mce.2012.12.014
12. De Bosscher K., Beck I.M., Ratman D., Berghe W.V., Libert C. Activation of the Glucocorticoid Receptor in Acute Inflammation: the SEDIGRAM Concept. *Trends Pharmacol. Sci*. 2016; 37(1): 4-16. doi: 10.1016/j.tips.2015.09.002
13. Hostettler N., Bianchi P., Gennari-Moser C., Kassahn D., Schoonjans K., Corazza N. Local glucocorticoid production in the mouse lung is induced by immune cell stimulation. *Allergy*. 2012; 67(2): 227-34. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02749.x.
14. Hu A., Fatma S., Cao J., Grunstein J.S., Nino G., Grumbach Y. Th2 cytokine-induced upregulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 facilitates glucocorticoid suppression of proasthmatic airway smooth muscle function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*. 2009; 296(5): L790-803. doi: 10.1152/ajplung.90572.2008.
15. Preston I.R., Sagliani K.D., Warburton R.R., Hill N.S., Fanburg B.L., Jaffe I.Z. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*. 2013; 304(10): L678-L688. doi:10.1152/ajplung.00300.2012
16. Voelkel N.F., Mizuno S., Bogaard H.J. The role of hypoxia in pulmonary vascular diseases: a perspective. *J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*. 2013; 304(7): L457-465.
17. Maron B.A., Oldham W.M., Chan S.Y., Vargas S.O., Arons E., Zhang Y.Y. Upregulation of steroidogenic acute regulatory protein by hypoxia stimulates aldosterone synthesis in pulmonary artery endothelial cells to promote pulmonary vascular fibrosis. *Circulation*. 2014; 130(2): 168-79. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007690.
18. Newfell B.G., Iyer L.K., Mohammad N.N., McGraw A.P., Ehsan A., Rosano G. et al. Aldosterone regulates vascular gene transcription via oxidative stress-dependent and -independent pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2011; 31(8): 1871-80.

Сведения об авторах:

Байбурина Гульнар Анузовна, канд. мед. наук, доцент, каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО БГМУ МЗ РФ, e-mail: gulnar.2014@mail.ru ;

Нургалева Елена Александровна, доктор мед. наук, проф., каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО БГМУ МЗ РФ;

Самигуллина Айгуль Фидратовна, канд. мед. наук, доцент, каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО БГМУ МЗ РФ;

Аглетдинов Эдуард Феликсович, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО БГМУ МЗ РФ.

© Коллектив авторов, 2019
УДК 613.25-08:591.111.1-035.82:57.084

Дроздова Г.А.¹, Линецкая О.И.², Нургалева Е.А.², Эткина Э.И.², Аглетдинов Э.Ф.²

Влияние синбиотика на биохимические параметры сыворотки крови, содержание лептина, грелина и их рецепторов в условиях избыточного потребления жиров в рационе крыс препубертатного возраста

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
117198, г. Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 8;

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России,
450008, г. Уфа, Россия, ул. Ленина, д. 3

Цель работы – изучить возможности патогенетической коррекции синбиотиком метаболических нарушений, вызванных чрезмерным потреблением жиров и оценить уровень лептина, грелина и их рецепторов.

Методика. В работе использовалось второе поколение лабораторных крыс линии Вистар препубертатного возраста, находившихся на диете с избыточным содержанием жиров (51% от общего рациона). В возрасте 5 нед. в рацион экспериментальной подгруппы включали синбиотик, по достижению 7-недельного возраста животных выводили из эксперимента декапитацией с последующим забором материала для бактериологических, биохимических и иммуноферментных исследований.

Результаты. Показано, что избыточное потребление жиров способствует росту условно-патогенной микробиоты, снижению содержания лакто- и бифидобактерий в толстом кишечнике и развитию дислипидемии. Наблюдается статистически значимое повышение уровня лептина в сыворотке крови на 49,9%. В жировой ткани отмечено увеличение количества рецепторов к лептину (в два раза) и грелину (на 28,2%). После коррекции синбиотиком положительная динамика отмечалась со стороны микробиоты, липидного профиля, снижался уровень лептина в сыворотке крови и рецепторов к грелину в жировой ткани.

Заключение: синбиотик способствует нормализации микробиоты желудочно-кишечного тракта, липидного профиля и уровня пептидных гормонов, ответственных за чувство голода и насыщения.

Ключевые слова: грелин, лептин, рецептор лептина, рецептор грелина, дислипидемия, микробиота, крысы.

Для цитирования: Дроздова Г.А., Линецкая О.И., Нургалева Е.А., Эткина Э.И., Аглетдинов Э.Ф. Влияние синбиотика на биохимические параметры сыворотки крови, содержание лептина, грелина и их рецепторов в условиях избыточного потребления жиров в рационе крыс препубертатного возраста. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 64-71.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.64-71

Для корреспонденции: Линецкая Ольга Игоревна, e-mail: Olineckaya@list.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 28.02.2019

Drozdova G.A.¹, Linetskaya O.I.², Nurgaleeva E.A.², Etkina E.I.², Agletdinov E.F.²

The effect of a synbiotic on blood biochemistry and concentrations of leptin, ghrelin, and their receptors in prepubertal rats consuming a diet containing excessive fat

¹Peoples' Friendship University of Russia,
Miklukho-Maklaya Str. 8, Moscow 117198;

²Bashkir State Medical University,
Lenina Str. 3, Ufa 450008

The aim of the study was to evaluate a possibility of using synbiotics for pathogenetic correction of metabolic disorders induced by excessive consumption of fat and to measure levels of leptin, ghrelin, and their receptors.

Methods. Experiments were conducted on the second generation of prepubertal Wistar rats consuming a diet with excessive fat (51% of diet). A synbiotic was included into the diet of a rat group aged 5 weeks. At age of 7 weeks, animals of the experimental and control groups were decapitated and samples were taken for bacteriological, biochemical, and enzyme immunoassay studies.

Results. Excessive fat consumption resulted in growth of conditionally pathogenic microbiota, decreased levels of lacto- and bifi-

dobacteria in the large intestine and feces, and development of dyslipidemia. Also, serum level of leptin was increased by 49.9%, ghrelin receptor density in adipose tissue was increased by 28.2%, and leptin receptors density in adipose tissue was increased twofold. The synbiotic treatment resulted in beneficial changes of the microbiota and lipid profile; serum level of leptin and ghrelin receptors density in adipose tissue decreased.

Conclusion: The synbiotic drug normalized the gastrointestinal microbiota, lipid profile, and peptide hormones responsible for feelings of hunger and satiety.

Keywords: ghrelin; leptin; leptin receptor; ghrelin receptor; dyslipidemia; microbiota; rats.

For citation: Drozdova G.A., Linetskaya O.I., Nurgaleeva E.A., Etkina E.I., Agletdinov E.F. The effect of a synbiotic on blood biochemistry and concentrations of leptin, ghrelin and their receptors in prepubertal rats consuming a diet containing excessive fat. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 64-71. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.64-71

For correspondence: *Olga I. Linetskaya*, assistant of the department of childhood diseases, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Bashkir State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; 3 Lenin Str., Ufa 450008, Russian Federation, e-mail: olineckaya@list.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 28.02.2019

Введение

Известно, что диет-индуцированные нарушения ведут к избыточному росту массы тела, что неблагоприятно влияет на все системы организма, вызывая серьезные расстройства. Следствием последних являются сердечно-сосудистые заболевания, включая гипертоническую болезнь, дислипидемию и атеросклероз, дисфункцию поджелудочной железы и печени, психоэмоциональный и социальный дискомфорт [1]. При этом проблема избыточной массы тела давно вышла за рамки низкой культуры питания и/или несбалансированности рациона, поскольку неуклонно увеличивается количество новорожденных и детей других возрастных групп с достаточно серьезными, требующими эффективных терапевтических решений, метаболическими нарушениями [2-4]. Детское ожирение является важным прогностическим фактором ожирения у взрослых [5].

В последние годы установлена роль гормонов лептина и грелина, а также их рецепторов в механизмах развития ожирения. У людей, страдающих ожирением, уровень циркулирующего лептина выше, что свидетельствует о формировании тканевой резистентности к гормону с ухудшением его физиологических функций и нарушением как липидного, так и углеводного обменов [6]. Однако, на сегодняшний день в научной литературе крайне мало сообщений о функционировании лептина и состоянии его рецепторов в условиях диетических нарушений. Другим гормоном, обеспечивающим накопление жировой ткани в организме, является секретруемый в желудке арексигенный гормон грелин, который активирует нейропептидные Y-экспрессирующие

нейроны в гипоталамусе, участвующие в контроле потребления пищи и массы тела [7].

К факторам, изменяющим метаболизм и способствующим ожирению, относится состояние микробиоты желудочно-кишечного тракта [7]. Известно влияние микробиоценоза кишечника на выработку лептина, в том числе посредством воздействия на сигнальные молекулы – глюкагоноподобный пептид (GLP-1), нейротрофический фактор мозга (Bdnf) и связанный с лептином цитокиновый сигнальный супрессор 3 (Socs3) [8]. Имеются данные о том, что рост *Bifidobacterium spp.* сопровождается увеличением секреции GLP-1 и пептидного гормона PYY в кишечнике, которые снижают резистентность к инсулину и увеличивают функциональную активность β-клеток поджелудочной железы [9]. Показано, что микробиота кишечника способна контролировать чувствительность к лептину у мышей с ожирением и сахарным диабетом 2-го типа [10].

Однако, несмотря на очевидную терапевтическую перспективность данного направления исследований, механизмы реализации благоприятного влияния модуляции микробиоты на метаболизм хозяина при диет-ассоциированных заболеваниях изучены недостаточно и сведения носят противоречивый характер. С одной стороны в ряде исследований на фоне диеты с высоким содержанием жира было установлено, что прием препарата пробиотического назначения способствовал снижению массы тела, улучшению гомеостаза глюкозы, инсулина и снижению стеатоза печени, в соответствии с другими подобного рода исследовани-

ями это связано с применением пробиотических штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [11, 12].

Предполагается, что на фоне приема *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus casei* снижается активность перекисного окисления липидов и улучшается работа желудочно-кишечного тракта у крыс с экспериментальным сахарным диабетом, однако без сопутствующего снижения уровня глюкозы в сыворотке крови [13].

С другой стороны высказано предположение, что *Bifidobacterium adolescentis* улучшает чувствительность к инсулину [14] путем увеличения продукции глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1) [15].

Цель исследования – изучение возможности патогенетической коррекции синбиотиком метаболических нарушений, вызванных чрезмерным потреблением жиров.

Методика

Исследования проводились в соответствии с требованиями правил проведения работ с экспериментальными животными, с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации. Работа одобрена этическим комитетом РУДН. Эксперимент выполнен на 2 поколениях животных: на половозрелых крысах Wistar ($n=44$) обоих полов, массой 250–300 г и их потомстве массой 45–58 г от рождения и до 7-недельного возраста. Для создания экспериментальной модели диеты с «семейным типом» жирового питания в питание самок добавляли свиное сало с таким расчетом, чтобы содержание жиров составляло 51% от общего рациона [16]. После появления потомства грудное вскармливание крысят продолжалось 14–16 сут молоком самок, находящихся на жировом типе питания. После отселения крысят от матери на фоне данного рациона были сформированы 2 подгруппы. В последующие 3 нед, до достижения 5-недельного возраста, крысята находились на жировой диете. Одна подгруппа дополнительно получала препарат синбиотического направления – «Нормобакт» (Россия, «Акрихин») в течение 2 нед. В состав препарата входили штаммы живых бактерий *Lactobacillus acidophilus* LA-5 и *Bifidobacterium* BB-12Y в соотношении 1:1 и пребиотик фруктоолигосахариды. Контрольная группа лабораторных крыс того же возрастного сегмента находилась на сбалансированном типе питания [17]. Каждая подгруппа состояла из 10 крыс.

В возрасте 7 нед (пубертат) животных декапитировали под эфирным наркозом с последующим забором крови, жировой ткани и ткани головного мозга.

Биохимические исследования плазмы крови проводились на автоматическом биохимическом анализаторе CA-400 (производство FURUNO ELECTRIC CO., LTD, Япония) с использованием жидких стабильных диагностических наборов (DiaSys Diagnostic Systems GMBH, Германия). Уровень лептина и грелина в сыворотке крови определяли сэндвич-методом и методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием набора ELISA Kit для крыс в соответствии с протоколом фирмы производителя «Cloud-Clone Corp.» (КНР).

Для определения уровня рецепторов к грелину и лептину в тканях головного мозга и жировой ткани применялись наборы «SEA083Ra для определения лептинового рецептора (LEPR)» и «SEC516Ra» для определения рецептора стимулятора секреции гормона роста (GHSR)» для крыс («Cloud-Clone Corp.», КНР). Перед проведением иммуноферментного анализа ткани гомогенизировали, обрабатывали ультразвуком Bioruptor UCD-200 (Diagenode, США), центрифугировали при 10 000 г и температуре 5 °С. Для постановки иммуноферментного анализа осуществлялась фотометрическая детекция на восьмиканальном микропланшетном ридере (Tecan infinite f50, Австрия).

Количественный и качественный состав пристеночного микробиоценоза толстого кишечника крыс определяли по методике Кафарской Л.И. и Коршунова В.М. [18] с использованием специальных питательных сред (бульон для бифидобактерий, бульон MRS для лактобактерий, хромогенный агар для грибов *Candida*, агар для клостридий, желточно-солевой агар для стафилококка).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Рассчитывали медиану (Me), межквартильные интервалы [25%, 75%]. Статистическую значимость межгрупповых различий средних величин оценивали, используя U-критерий Манна-Уитни. Для выявления взаимосвязи признаков использовали корреляционный анализ по Пирсону. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изменения липидного состава сыворотки крови представлены в табл. 1. При высоком содержании жира в рационе крыс выявлены существенные изменения в виде превышения уровня холестерина и триглицеридов в сравнении с контролем на 37,1% ($p \leq 0,001$) и 12% ($p \leq 0,001$) соответственно, снижения липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) на 12,9% ($p \leq 0,01$) (табл. 1).

Уровень аполипопротеина А1 (Апо-А1), белка, входящего в состав липопротеидов высокой плотности снижался на треть 33,4%, ($p \leq 0,05$), что указывает на увеличение риска атеросклеротических изменений. Уровень аполипопротеина В-1 (Апо-В1) статистически значимо не изменялся. В результате несбалансированного питания значения липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) превышали показатели контроля на 10,5% ($p \leq 0,001$).

После применения синбиотика уровень Апо-А1 повышался на 66,6% ($p \leq 0,05$), уровень общего холестерина не изменялся, показатели Апо-В1, ХС ЛПНП и триглицеридов ($p \leq 0,001$) достигали значений контрольной группы, отмечалась тенденция к росту содержания ХС ЛПВП.

Бактериологическое исследование микрофлоры толстого кишечника показало, что в группе крыс подросткового возраста с избыточным потреблением жиров отмечался активный рост *Staphylococcus spp.* и грибов рода *Candida spp.* (рис. 1), содержание *Bifidobacterium spp.* снижалось в 2 раза ($p = 0,0342$) и *Lactobacillus spp.* в 10,3 раза ($p = 0,0140$) в сравнении с группой контроля.

После коррекции синбиотиком условно-патогенная микрофлора (*Staphylococcus spp.*, *Clostridium spp.*, грибы рода *Candida spp.*) не выявлялась, содержание *Bifidobacterium spp.* повысилось в 3 раза ($p = 0,0211$). Наиболее существенно возросло содержание *Lactobacillus spp.* – их численность увеличилась в 300

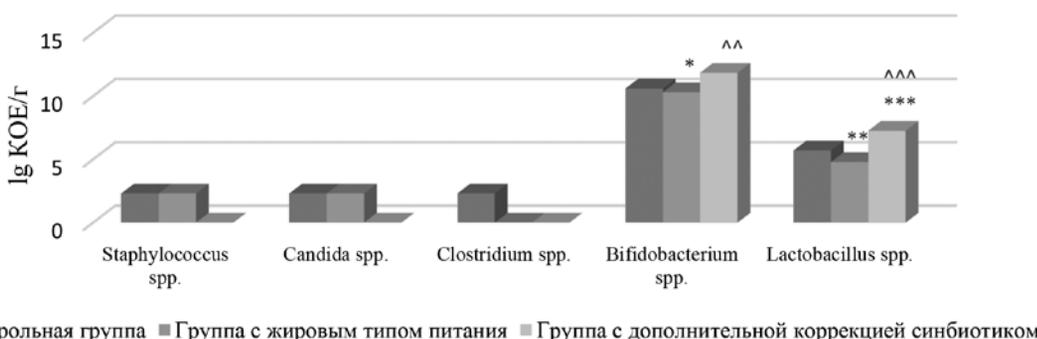


Рис. 1. Состояние микробиоты толстого кишечника крыс подросткового возраста при жировом типе питания и дополнительной коррекцией синбиотиком.

* статистическая значимость различий по показателям, в сравнении с группой контроля (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$); ^ статистическая значимость различий в группах «жиры», «коррекция синбиотиком» (^ $p \leq 0,05$; ^^ $p \leq 0,01$; ^^ ^ $p \leq 0,001$)

Таблица 1

Биохимические показатели сыворотки крови крыс с жировым типом питания и последующей коррекцией синбиотиком, Ме [25; 75]

Показатель	Контрольная группа	Группа с жировым типом питания	Группа дополнительно получавшая синбиотик	p^1	p^2	p^3
Холестерин, ммоль/л	1,75 [1,60-2,10]	2,40 [2,30-2,50]	2,39 [2,30-2,50]	0,0002	0,8798	0,0002
Триглицериды, ммоль/л	0,96 [0,92-0,97]	1,17 [1,05-1,25]	1,02 [1,00-1,10]	0,0001	0,0450	0,0001
Апо-А1-протеин	0,04 [0,04-0,05]	0,03 [0,01-0,03]	0,05 [0,04-0,05]	0,0376	0,0211	0,6231
Апо-В1-протеин	0,02 [0,02-0,02]	0,02 [0,01-0,03]	0,02 [0,01-0,02]	0,6501	0,9097	0,7054
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,01 [1,01-1,04]	0,88 [0,76-0,93]	0,97 [0,82 – 0,99]	0,0001	0,0451	0,0002
ХС ЛПНП, ммоль/л	0,66 [0,66-0,67]	0,73 [0,69-0,98]	0,65 [0,60-0,67]	0,0004	0,0013	0,7054

Примечание. * p^1 – статистическая значимость различий в группах контроль – жиры; ** p^2 – статистическая значимость различий по показателям в группах жиры – коррекция синбиотиком; *** p^3 – статистическая значимость различий по показателям в группах контроль – коррекция синбиотиком.

раз ($p = 0,0001$) в сравнении с группой потребления жиров без коррекции.

К механизмам, посредством которых осуществляется влияние микробиоты на метаболические процессы в организме, относится изменение уровня гормонов, регулирующих аппетит — грелина и лептина. Проведенное исследование показало, что уровень лептина в сыворотке крови крыс с повышенным потреблением жиров статистически значимо превышал показатели контрольной группы на 49,9% ($p = 0,0003$) (рис. 2, А).

В результате использования коррекционной методики уровень лептина снижался на 13,4% ($p = 0,0342$), хотя значения оставались выше показателей группы контроля. Корреляционный анализ выявил статистически значимую положительную корреляцию содержания лептина и уровня общего холестерина ($r = 0,6794$, $p = 0,031$), триглицеридов ($r = 0,77664$, $p = 0,010$) и глюкозы ($r = 0,8103$, $p = 0,004$). Отрицательная корреляция прослеживалась в отношении значений лептина и ХС ЛПВП ($r = - 0,7461$, $p = 0,013$). По-

лученные результаты указывают на участия лептина в патогенезе дислипидемии.

Изучение содержания рецепторов к лептину в жировой ткани на фоне высокожирового питания выявило статистически значимое двукратное их повышение в сравнении с контролем ($p = 0,0014$) (рис. 3, А). Коррекция синбиотиком не привела к статистически значимым изменениям уровня рецепторов, содержание которых по-прежнему оставалось высоким. Исследование плотности рецепторов к лептину в тканях головного мозга не выявило количественных различий, как при диетических нарушениях, так и на фоне проводимой коррекции (рис. 3, Б).

Корреляционный анализ содержания рецепторов к лептину в жировой ткани и уровня *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* толстого кишечника показал положительную корреляционную зависимость ($r = 0,7404$, $p = 0,014$; и $r = 0,8611$, $p = 0,001$ соответственно). В тканях головного мозга выявлена отрицательная корреляция содержания рецепторов к лептину в головном

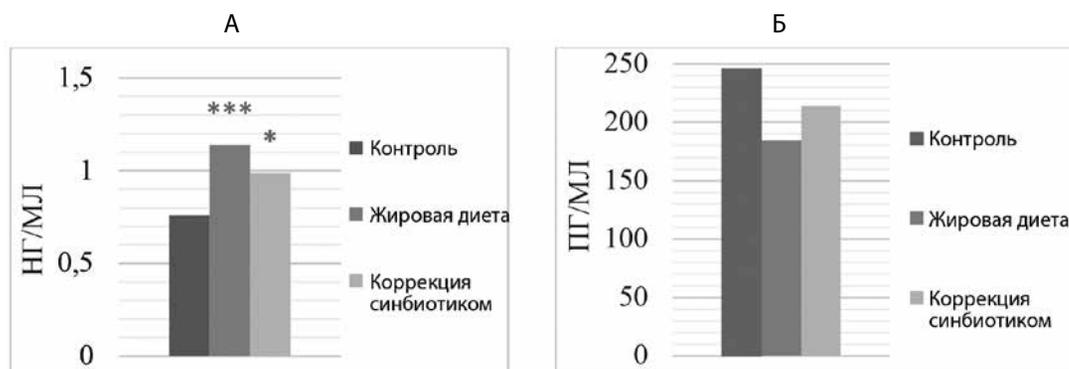


Рис. 2. Динамика показателей уровня лептина (нг/мл) (А) и грелина (пг/мл) (Б) в сыворотке крови при жировом типе питания. * статистическая значимость различий по показателям, в сравнении с группой контроля (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$); ^ статистическая значимость различий между группами «жир» и «коррекция синбиотиком» (^ $p \leq 0,05$; ^^ $p \leq 0,01$; ^^ ^ $p \leq 0,001$).



Рис. 3. Уровень рецепторов к лептину в жировой ткани (нг/мл) (А) и тканях головного мозга (Б). * статистическая значимость различий между показателями в сравнении с группой контроля (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$); ^ статистическая значимость различий между группами «жир» и «коррекция синбиотиком» (^ $p \leq 0,05$; ^^ $p \leq 0,01$; ^^ ^ $p \leq 0,001$).

мозге по отношению к уровню *Lactobacillus spp.* ($r = -0,6569$, $p = 0,039$) и положительная к *Bifidobacterium spp.* ($r = 0,9244$, $p = 0,000$).

На фоне высокожировой диеты показатели грелина в сыворотке крови крысят, напротив, имели тенденцию к снижению на 24,8% в сравнении с контрольной группой (рис. 2, Б). При добавлении синбиотика отмечалась тенденция к повышению уровня грелина на 15,8% относительно группы с преимущественным потреблением жиров без коррекции.

Корреляционный анализ содержания грелина и параметров липидного спектра крови выявил отрицательную корреляцию уровня глюкозы ($r = -0,8716$, $p = 0,001$) и триглицеридов ($r = -0,8053$, $p = 0,005$), положительная корреляция была установлена с ХС ЛПВП ($r = 0,8644$, $p = 0,001$). Между уровнями гормонов лептина и грелина и показателями содержания микробиоты желудочно-кишечного тракта значимых корреляционных взаимосвязей установлено не было.

Определение уровня рецепторов к грелину в жировой ткани показало, что на фоне высокожировой диеты отмечалось повышение плотности рецепторов на 28,2%, в сравнении с контролем (рис. 4, А). Прием синбиотика приводил к снижению содержания рецепторов к грелину на 14,3% ($p = 0,0101$) в сравнении с контрольной группой и снижению на 33,1% ($p = 0,0155$) относительно группы животных без коррекции.

В тканях головного мозга статистически значимых изменений в уровне рецепторов к грелину отмечено не было как при избыточном потреблении жиров, так и после применения коррекционной терапии (рис. 4, Б). В то же время корреляционный анализ выявил отрицательную корреляцию между содержанием рецепторов к грелину в головном мозге и уровнем *Lactobacillus spp.* толстого кишечника ($r = -0,6893$, $p = 0,027$).

Таким образом, при решении вопроса о роли диетических нарушений в изменении количественных характеристик содержания гормонов лептина и грелина было установлено статистически значимое повышение уровня лептина и тенденция к снижению уровня грелина. Наиболее выраженные изменения в содержании рецепторов гормонов были выявлены на периферии — в жировой ткани, что свидетельствует о важности периферических механизмов в реализации эффектов гормонов. Центральные рецепторные структуры мозга статистически значимо не менялись как на фоне высокожировой диеты, так и при коррекции синбиотиком.

В проведенном исследовании положительная динамика в отношении состава микробиоты кишечника сопровождалась улучшением показателей липидного профиля, уровня гормонов и их рецепторов, что согласуется с данными других авторов [19, 20].

Одним из возможных звеньев патогенетического воздействия микробиоты на показатели липидного обмена являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), которые являются конечным продуктом бактериальной ферментации неперевариваемых углеводов. Они влияют на энергетический обмен и метаболизм в целом посредством энтеро-эндокринной клеточной передачи сигналов [21]. Основными рецепторами для КЦЖК являются рецепторы свободных жирных кислот 2 и 3 (FFAR2, FFAR3), экспрессирующиеся в слизистой толстого кишечника, что в дальнейшем приводит к повышению продукции GLP-1, а также пептида YY(PYY) в L-клетках подвздошной и толстой кишок [22]. Исследования, проведенные Н. Lin и соавт., показали, что при введении мышам КЦЖК меняется синтез кишечных гормонов через FFAR2 и FFAR3 рецепторы, что способствует защите организма от индуцированного диет-

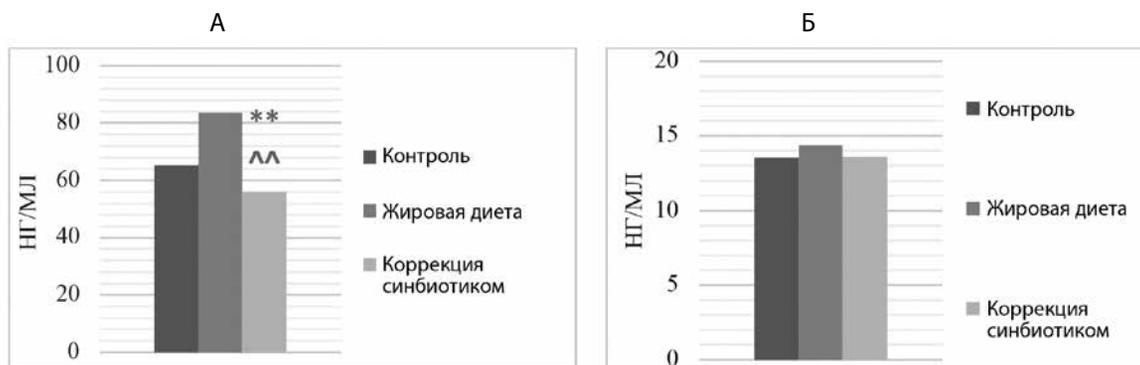


Рис. 4. Уровень рецепторов к грелину(нг/мл) в жировой ткани (А) и тканях головного мозга (Б). * статистическая значимость различий по показателям, в сравнении с группой контроля (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$); ^ статистическая значимость различий в группах жиры, коррекция синбиотиком (^ $p \leq 0,05$; ^^ $p \leq 0,01$; ^^ ^ $p \leq 0,001$).

той ожирения, а также инсулинорезистентности [23]. Повышение секреции пептидных гормонов GLP-1 и PYY возникает при добавлении в рацион пребиотической олигофруктозы [24].

Избыточное потребление жиров в эксперименте приводило к снижению количества *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* в толстом кишечнике, что, по всей видимости, способствовало падению уровня КЦЖК, снижению активации FFAR2 [25] и соответственно уменьшению продукции GLP-1 и (PYY), ведущих к нарушению синтеза лептина в адипоцитах [26]. В эксперименте также установлено, что на фоне высокожировой диеты плотность лептиновых рецепторов в гипоталамусе, посредством которых осуществляется передача сигнала от лептина к гипоталамусу, имела тенденцию к снижению, что ведет к повышению концентрации лептина в крови [27]. Высокие концентрации лептина вызывают развитие воспалительного процесса в структурах, содержащих лептиновые рецепторы, вследствие чего концентрация лептина в мозге падает [28].

Активация грелиновых рецепторов гипоталамуса, плотность которых в наших исследованиях несколько повышалась на фоне высокожировой диеты, по данным литературы может приводить к увеличению экспрессии нейропептида Y, препятствующего образованию проопиомеланокортина (ПОМК) [29]. Продуктами расщепления ПОМК является адренокортикотропный гормон (АКТГ) из которого образуется β-липотропин. Последний снижает липолиз в жировой ткани и тем самым увеличивает уровень холестерина. Прием синбиотика являлся в нашем эксперименте триггером, запускающим цепь метаболических изменений, нормализующих параметры липидного спектра, уровня пептидных гормонов и их рецепторов.

Таким образом, применение пре- и пробиотиков является патогенетически обоснованной и эффективной стратегией терапии при диет-индуцированных нарушениях питания.

Литература

17. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Б.В. *Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте.* Киев; Вища школа; 1983: 223-42.
18. Ефимов Б.А., Кафарская Л.И., Коршунов В.М. Современные методы оценки качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника и влагиалища. *Журнал микробиологии.* 2002; 4: 72-8.

References

1. Qiao Y., Zhang T., Liu H., Katzmarzyk P.T., Chaput J.P., Fogelholm M. et al. Joint association of birth weight and physical activity/sedentary behavior with obesity in children ages 9-11 years from

- 12 countries. *Obesity* (Silver Spring). 2017; 25(6): 1091-7. doi: 10.1002/oby.21792.
2. Koleva P.T., Kim J.S., Scott J.A., Kozyrskiy A.L. Microbial programming of health and disease starts during fetal life. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2015; 105(4): 265-77. doi: 10.1002/bdrc.21117.
3. Rutayisire E., Wu X., Huang K. Tao S., Chen Y., Tao F. Cesarean section may increase the risk of both overweight and obesity in pre-school children. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2016; 16: 338. doi: 10.1186/s12884-016-1131-5.
4. Tun H.M., Konya T., Takaro T.K., Brook J.R., Chari R., Field C.J., et al. Exposure to household furry pets influences the gut microbiota of infant at 3-4 months following various birth scenarios. *Microbiome.* 2017; 5(1): 40. doi: 10.1186/s40168-017-0254-x
5. Doak C.M., Visscher T.L.S., Renders C.M., Seidell J.C. The prevention of overweight and obesity in children and adolescents: a review of interventions and programmes. *Obes Rev.* 2006; 7(1): 111-36.
6. Leptin in the 21st Century, Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism.* 2015; 64(1): 35-46. doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.015.
7. Heimann E., Nyman M., Degerman E. Propionic acid and butyric acid inhibit lipolysis and de novo lipogenesis and increase insulin-stimulated glucose uptake in primary rat adipocytes. *Adipocyte.* 2015; 4: 81-8. doi: 10.4161/21623945.2014.960694.
8. Schele E., Grahnmemo L., Anesten F., Hallen A., Backhed F., Jansson J.O. The gut microbiota reduces leptin sensitivity and the expression of the obesity-suppressing neuropeptides proglucagon (Gcg) and brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) in the central nervous system. *Endocrinology.* 2013; 154: 3643-51. doi: 10.1210/en.2012-2151.
9. Monteagudo-Mera A., Arthur J.C., Jobin C., Keku T., Bruno-Barcena J.M., Azcarate-Peril M.A. High purity galacto-oligosaccharides enhance specific Bifidobacterium species and their metabolic activity in the mouse gut microbiome. *Benef Microbes.* 2016; 7(2): 247-64. doi: 10.3920/BM2015.0114.
10. Everard A. *Interactions between gut microbiota and intestinal epithelium functions in metabolic disorders associated with obesity.* Prom.: Cani, Patrice, (BIFA - Sciences biomédicales et pharmaceutiques). UCL, 2014.
11. Park C., Guallar E., Linton J.A., Lee D.C., Jang Y., Son D.K., et al. Fasting Glucose Level and the Risk of Incident Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Diabetes Care.* 2013; 36(7): 1988-93. doi: 10.2337/dc12-1577.
12. Zhang Q., Wu Y., Fei X. Effect of probiotics on body weight and body-mass index: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Int J Food Sci Nutr.* 2015; 67: 571-80.
13. Yadav H., Jain S., Sinha P.R. The Effect of Probiotic Dahi Containing Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei on Gastro-pathic Consequences in Diabetic Rats. *J. Med. Food.* 2008; 11: 62-8.
14. Chen J., Wang R., Li X.F., Wang R.L. Bifidobacterium adolescentis supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr.* 2012; 10: 1429-34.
15. Cani P.D., Daubioul C.A., Reusens B., Remacle C., Catillon G., Delzenne N.M. Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1 amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats. *J. Endocrinol.* 2005; 185: 457-65.
16. Lecomte V., Kaakoush N.O., Maloney C.A., Raipuria M., Huinao K.D., Mitchell H.M. et al. Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters. *PLoS One.* 2015; 10(5):e0126931. doi: 10.1371/journal.pone.0126931.

17. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zahariya B.V. *Laboratory animal. Breeding, keeping, use in the experiment [Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, sodержanie, ispol'zovanie v ehksperimente=Laboratory animals]*. Dilution, maintenance, use in the experiment. Kiev; Vishcha shkola; 1983: 223-42. (In Russian)
18. Efimov B.A., Kafarskaya L.I., Korshunov V.M. Modern methods for assessing the qualitative and quantitative indicators of the intestinal and vaginal microflora. *Zhurnal mikrobiologii*. 2002; 4: 72-8. (In Russian)
19. Karamali M., Dadkhah F., Sadrkhanlou M., Jamilian M., Ahmadi S., Tajabadi-Ebrahimi M. et al. Effects of probiotic supplementation on glycaemic control and lipid profiles in gestational diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Metab*. 2016; 42(4): 234-41. doi: 10.1016/j.diabet.2016.04.009.
20. Xiong Y., Miyamoto N., Shibata K., Valasek M.A., Motoike T., Kedzierski R.M., et al. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(4): 1045-50. doi: 10.1073/pnas.2637002100.
21. Pekmez C.T., Dragsted L.O., Brahe L.K. Gut microbiota alterations and dietary modulation in childhood malnutrition – The role of short chain fatty acids. *Clin Nutr*. 2018; S0261-5614(18): 30077-3. doi: 10.1016/j.clnu.2018.02.014.
22. Vangaveti V., Shashidhar V., Jarrod G., Baune B.T., Kennedy R.L. Free fatty acid receptors: emerging targets for treatment of diabetes and its complications. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2010; 1(4): 165-75. doi: 10.1177/2042018810381066.
23. Lin H.V., Frassetto A., Kowalik E.J. Jr., Nawrocki A.R., Lu M.M., Kosinski J.R. et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One*. 2012; 7(4): e35240. doi: 10.1371/journal.pone.0035240.
24. Parnell J.A., Reimer R.A. Prebiotic fibres dose -dependently increase satiety hormones and alter bacteroidetes and firmicutes in lean and obese JCR: LA-cp rats. *Br J Nutr*. 2012; 107: 601-13. doi: 10.1017/S0007114511003163.
25. Le Poul E., Loison C., Struyf S., Springael J.Y., Lannoy V., Decobecq M.E. et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem*. 2003; 278(28): 25481-9. doi: 10.1074/jbc.M301403200.
26. Xiong Y., Miyamoto N., Shibata K., Valasek M.A., Motoike T., Kedzierski R.M. et al. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(4): 1045-50. doi: 10.1073/pnas.2637002100.
27. Wang B., Chandrasekera P.C., Pippin J.J. Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2014; 10(2): 131-45.
28. Koga S., Kojima A., Ishikawa C., Kuwabara S., Arai K., Yoshiyama Y. Effects of diet-induced obesity and voluntary exercise in a tauopathy mouse model: implications of persistent hyperleptinemia and enhanced astrocytic leptin receptor expression. *Neurobiol Dis*. 2014; 71: 180-92. doi: 10.1016/j.nbd.2014.08.015.
29. Heijboer A.C., van den Hoek A.M., Parlevliet E.T., Havekes L.M., Romijn J.A., Pijl H. et al. Ghrelin differentially affects hepatic and peripheral insulin sensitivity in mice. *Diabetologia*. 2006; 49(4): 732-8.

Сведения об авторах:

Дроздова Галина Александровна, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии медицинского факультета ФГАОУ ВО РУДН;

Линецкая Ольга Игоревна, асс. каф. детских болезней ФГБОУ ВО БГМУ МЗ РФ, e-mail: Olineckaya@list.ru;

Нургалеева Елена Александровна, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО БГМУ МЗ РФ;

Эткина Эсфирь Исааковна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. детских болезней ФГБОУ ВО БГМУ МЗ РФ;

Аглетдинов Эдуард Феликсович, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО БГМУ МЗ РФ

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Маркелова Е.В., Овчинникова О.В., Хохлова А.С., Догадова Л.П., Костюшко А.В., Пнюхтина М.С.

Роль матричной металлопротеиназы-9 и ее ингибиторов в процессах рубцевания у больных с первичной открытоугольной глаукомой после оперативного лечения

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»,
690950, г. Владивосток, Россия, пр-т Острякова, д. 2

Оперативное вмешательство – один из основных методов лечения глаукомы. Однако развитие избыточного рубцевания созданных путей оттока определяет результат хирургического лечения в отдаленные сроки. Процессы рубцевания на данный момент недостаточно изучены.

Цель исследования – оценка роли матричной металлопротеиназы-9, ее ингибиторов в процессах рубцевания у больных с первичной открытоугольной глаукомой после оперативного лечения.

Методика. Для выявления возможных маркеров избыточного рубцевания методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли содержание матричных металлопротеиназ-9, тканевых ингибиторов металлопротеиназ 2 и -3 в слезной жидкости у 37 пациентов с активной стадией первичной открытоугольной глаукомы в динамике послеоперационного периода. Средний возраст пациентов составил 52,8 лет. В зависимости от исхода оперативного вмешательства все пациенты были разделены на 2 группы – с благоприятным исходом (без избыточного рубцевания) и с неблагоприятным исходом (с избыточным рубцеванием) на месте сформированных дополнительных путей оттока внутриглазной жидкости в послеоперационном периоде. Группа контроля включала 20 человек в возрасте от 50 до 66 лет без сопутствующей офтальмологической и соматической патологии в стадии обострения.

Результаты. В динамике показано изменение концентрации матричной металлопротеиназы-9 и ее ингибиторов в послеоперационном периоде. Анализ данных свидетельствует об обратной зависимости уровня матричной металлопротеиназы-9 и тканевых ингибиторов металлопротеиназы 2 и 3 типов с исходом операции – чем выше концентрация металлопротеиназы-9 и ниже концентрация тканевых ингибиторов металлопротеиназ 2, -3 в слезной жидкости, тем выше вероятность неблагоприятного исхода в виде рубцевания сформированных дополнительных путей оттока внутриглазной жидкости в послеоперационном периоде.

Заключение. Мониторинг уровня металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов после проведения хирургического лечения пациентов с первичной открытоугольной глаукомой позволяет прогнозировать раннее рубцевание, дает возможность разработки новых методов лечения как в раннем, так и в позднем послеоперационном периоде.

Ключевые слова: матричная металлопротеиназа-9; тканевые ингибиторы; глаукома; слезная жидкость; рубцевание.

Для цитирования: Маркелова Е.В., Овчинникова О.В., Хохлова А.С., Догадова Л.П., Костюшко А.В., Пнюхтина М.С. Роль матричной металлопротеиназы-9 и ее ингибиторов в процессах рубцевания у больных с первичной открытоугольной глаукомой после оперативного лечения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4):72-80.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.72-80

Для корреспонденции: Овчинникова Ольга Викторовна, e-mail: os.inferna@mail.ru

Финансирование. Работа не имеет финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.07.2019

Markelova E.V., Ovchinnikova O.V., Khokhlova A.S., Dogadova L.P., Kostyushko A.V., Pnyukhtina M.S.

The role of matrix metalloproteinase 9 and its inhibitors in scarring processes following surgery for primary open-angle glaucoma

Pacific State Medical University, Prospekt Ostryakova 2, Vladivostok 690950, Russia

Surgery is one of the major treatments for glaucoma; however excessive scarring of created outflow pathways affects the long-term outcome. At the present time, scarring processes are not sufficiently studied.

Aim. To evaluate the role of matrix metalloproteinase 9 and its inhibitors in scarring after surgical treatment of open-angle glaucoma.

Methods. Concentrations of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 2 and 3 were measured in tear fluid of 37 patients (mean age, 52.8) with active primary open-angle glaucoma in dynamics during the postoperative period to identify possible markers of excessive scarring. Based on the surgery outcome, all patients were divided into two groups, with a favorable outcome (without excessive scarring) and an unfavorable outcome (with excessive scarring) in the created additional

outflow pathways for the intraocular fluid in the postoperative period. The control group included 20 subjects aged 50-66 without eye disease or somatic disease at exacerbation stage.

Results. Analysis of changes in concentrations of matrix metalloproteinase 9 and its inhibitors in the postoperative period showed their inverse relationship with the surgery outcome. The higher was the metalloproteinase 9 level and the lower the level of tissue inhibitors of metalloproteinases 2 and 3 the higher was the probability of unfavorable outcome evident as excessive scarring of the formed additional pathways for tear fluid outflow in the postoperative period.

Conclusion. Postoperative monitoring of metalloproteinases and their tissue inhibitors allows to predict early scarring and to develop new treatments both in early and late postoperative periods.

Keywords: matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitors; glaucoma; lacrimal fluid; scarring.

For citation: Markelova E.V., Ovchinnikova O.V., Khokhlova A.S., Dogadova L.P., Kostushko A.V., Pnyukhtina M.S. The role of matrix metalloproteinase 9 and its inhibitors in scarring processes following surgery for primary open-angle glaucoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 72-80. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.72-80

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 14.07.2019

Введение

В настоящее время глаукомой в мире страдают около 70 млн людей, и около 1 млн из них живет в России. По данным статистики заболеваемость глаукомой постоянно растет, поскольку доля пожилых людей в общей численности населения планеты стремительно увеличивается, а риск развития болезни с возрастом (особенно после 45 лет) только повышается. По прогнозам специалистов в 2020 году заболеванием будут подвержены 80 миллионов людей. Глаукома занимает второе место в мировом рейтинге причин полной потери зрения: от 6 до 20% всех случаев заболевания заканчиваются слепотой. В нашей стране в ряде регионов роль глаукомы, как причины первичной инвалидности, возросла до 37% [1]. Именно поэтому раннему выявлению и лечению глаукомы уделяется все больше внимания.

Фармакотерапия глаукомы непрерывно совершенствуется, а арсенал местных гипотензивных средств пополняется действенными лекарственными препаратами, влияющими на продукцию и отток камерной влаги. Но, несмотря на широкий выбор гипотензивных препаратов и лазерного лечения, хирургический метод является наиболее эффективным для нормализации внутриглазного давления (ВГД) и сохранения зрительных функций. Результат хирургического вмешательства во многом зависит от выраженности иммунной реакции, особенностей послеоперационного периода, продолжительности и характера воспалительного ответа на операционную травму [2].

За последние 15 лет сделан существенный шаг в понимании механизма заживления раны на молекулярном уровне, благодаря чему появилась возможность контролировать процесс регенерации посредством терапевти-

ческих стратегий, «мишенью» для которых служат белки или клетки [3]. В настоящее время основную роль в регуляции функционирования соединительных тканей отводят их внеклеточному экстрацеллюлярному матриксу (ЭЦМ). Сбалансированность процессов биосинтеза и разрушения внеклеточных структур играет решающую роль в поддержании тканевого гомеостаза. При этом и разрушение, и форсированное новообразование тканевых элементов при заживлении может происходить только при повышенной активности металлопротеиназ [4]. В последние годы все более очевидным становится значение ЭЦМ в ремоделировании структур глаза, наиболее значимых для развития глаукомы (трабекулярной ткани, зоны увеосклерального пути оттока внутриглазной жидкости, тканей диска зрительного нерва) [1, 5].

Ведущим механизмом, определяющим скорость деградации внеклеточных структур, является протеолиз. В протеолизе принимают участие все классы протеиназ, однако главную роль играют металлопротеиназы. Именно они преобладают в межклеточном пространстве и способны расщеплять практически все типы коллагена и другие белки матрикса, включая протеогликаны. Матриксные металлопротеиназы (ММП) являются большим семейством содержащим цинк, Ca^{2+} -зависимые внеклеточные эндопептидазы, имеющие важное значение в деградации компонентов экстрацеллюлярного матрикса и тканевом ремоделировании. ММП осуществляют специфический гидролиз практически всех белков ЭЦМ и базальных мембран при нейтральных значениях pH. ММП подразделяют на коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, ММП мембранного типа и другие, неклассифицированные ММП [6, 7].

МПП-9 (желатиназа В) локализуется, большей частью, в макрофагах. Этот фермент отвечает за деградацию коллагенов IV и V внеклеточной матрицы. МПП играют важную роль в процессах повреждения ткани, воспалении, ангиогенезе опухолевой инвазии. В связи с этим высказано предположение, что при глаукоме они участвуют в ремоделировании решетчатой пластинки склеры и области диска зрительного нерва, активируют нейроглию [8].

В физиологических условиях каталитическая активность МПП подавляется специфическими тканевыми ингибиторами (ТИМР), которые представляют собой белки небольшого размера, способные формировать нековалентные комплексы (1:1) с многими представителями семейства матриксных металлопротеаз. Известно 4 типа ТИМР (ТИМР 1,2,3,4). Удаление ТИМР из комплекса вызывает активацию ММП. Считается, что в конечном итоге экстрацеллюлярная протеолитическая активность ММП определяется балансом между активной формой фермента и его специфическим ингибитором. Так, ТИМР-1 и ТИМР-2 растворимы и локализованы во внеклеточном пространстве, а ТИМР-3 связан с компонентами ЭЦМ. Имеются различия между ТИМР по специфичности их связи с ММП: считается, что ТИМР-2 значительно лучше ингибирует желатиназу А (ММП-2), а ТИМР-3 – как ММП-2, так и ММП-9.

Много работ посвящено роли металлопротеиназ в фильтрационной хирургии глаукомы, а именно их участию в рубцевании фильтрационной подушки (ФП), что является наиболее частой причиной неудачного исхода оперативного лечения. Раневой процесс после трабекулоэктомии имеет значительное сходство с кожной раной [9]. Заживление ФП происходит в несколько этапов. Гемостаз происходит в течение 1-х сут. В конце 1-й нед заканчивается активное аутоиммунное воспаление, миграция и пролиферация фибробластов и начинается продукция экстрацеллюлярного матрикса, который продолжается в течение 2 мес. Через 3-4 нед при сохраненном токе жидкости вокруг зоны операции формируется так называемое «стальное кольцо», ограничивающее зону ФП и приводящее к повышению ВГД в отдаленные сроки. Нормально функционирующая фильтрационная подушка формируется через 3-4 мес после операции. Хирургическая травма конъюнктивы, эписклеры, склеры и радужки способствует проникновению белков плазмы крови в зону фильтрации внутриглазной жидкости, запуску каскада реакций свертывания и активации комплемента. Эффекторными клетками в образовании субконъюнктивального рубца являются фибробласты. Тромбоциты встраиваются в сеть фибриновых волокон, образуя тромб, формирование которого обеспечивает гемостаз и предоставляет

временную основу для миграции воспалительных клеток и фибробластов. После разреза тканей белки плазмы и клетки крови образуют фибриновый сгусток в раневой области. Затем мигрируют нейтрофилы и макрофаги, которые растворяют сгусток, секретируя различные ферменты, в том числе ММП-9 [3, 10].

В последние годы вырос интерес ученых к определению локального уровня медиаторов, отражающих состояние межклеточного матрикса у пациентов с различными видами офтальмологической патологии, в том числе глаукомы. Минимальная инвазивность при сборе материала делает одним из самых удобных объектов для диагностики слезу. Показано, что в слезной жидкости резко повышается уровень металлопротеиназ, но роль последних в динамике заживления не ясна [1, 5, 9]. Важное значение имеет определение уровня цитокинов и ферментов деградации ЭЦМ в слезной жидкости для ранней диагностики и наблюдения за течением глаукомы. Выявлено значительное повышение концентрации ММП-9 (в 7 раз по сравнению с контролем) в слезной жидкости больных с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) [8]. Однако влияние металлопротеиназ и их ингибиторов на процессы заживления фильтрационной подушки в настоящее время изучено недостаточно.

Цель исследования – оценка роли матриксной металлопротеиназы-9, ее ингибиторов в процессах рубцевания у больных с первичной открытоугольной глаукомой после оперативного лечения.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Исследование проводилось на базе офтальмологического отделения для взрослых (микрохирургии глаза) ГБУЗ ККБ № 2 и было одобрено этическим комитетом ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 6.

Проведен анализ содержания металлопротеиназы 9 (ММП-9), тканевых ингибиторов 2 и 3 (ТИМР-2, ТИМР-3) в слезной жидкости (СЖ) у 37 пациентов, (средний возраст 53 года) с активной стадией первичной открытоугольной глаукомы в динамике после оперативного лечения с целью оценки их влияния на репаративные процессы. Диагноз «Первичная открытоугольная глаукома» был верифицирован на основании объективных и дополнительных методов обследования согласно Федеральным клиническим рекомендациям.

Критериями включения в исследование были: активная стадия ПОУГ с открытым углом передней камеры не менее 30°, подтвержденным методом гониоскопии. Критерии исключения – нормотензивная, закрытоугольная и псевдоэксfolлиативная глаукома; операции, травмы, воспалительные и аутоиммунные заболевания глаз в анамнезе; заболевания сетчатки и зрительного нерва; помутнение роговицы, затрудняющее осмотр глазного дна; аметропия средней и высокой степени; острые инфекционные заболевания и соматическая патология в фазе обострения.

Антиглаукомная операция состояла в глубокой проникающей склерэктомии. Забор материала (слеза) проводили атравматично в условиях перевязочного кабинета методом смыва с поверхности глазного яблока стерильным физиологическим раствором (1мл). Концентрацию ММП-9 и ее тканевых ингибиторов ТИМР 2-го и 3-го типа в СЖ исследовали в несколько этапов: до операции, на 5-е сут, 21-е сут и через 3 мес после оперативного вмешательства. Исследование проведено с помощью специфических реактивов фирмы «R&G diagnostic Inc.» (США), методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Multiscan (Финляндия). Рассчитывали коэффициент соотношения ММП-9 и ее ингибиторов. Клинически в послеоперационном периоде оценивалось состояние фильтрационной подушки при помощи биомикроскопии по критериям MBGS. В зависимости от исхода оперативного вмешательства все пациенты были разделены на 2 группы – с благоприятным исходом (без избыточного рубцевания) и с неблагоприятным исходом (с избыточным рубцеванием) на

месте сформированных дополнительных путей оттока внутриглазной жидкости. Группа контроля включала 20 человек в возрасте 50 - 66 лет без сопутствующей офтальмологической и острой соматической патологии.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы «Microsoft Excel», STATISTICA 10. Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики – среднюю арифметическую величину, среднеквадратическое отклонение. Использовали критерий Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В группе контроля среднестатистическая концентрация для ММП-9 составила $63,62 \pm 14,7$ нг/мл, для ингибиторов ТИМР-2 и ТИМР-3 – $47,8 \pm 20,7$ и $20,0 \pm 3,8$ нг/мл соответственно.

Как показали результаты исследования (рис. 1, 2) содержание ММП-9 ее ингибиторов 2-го и 3-го типа в СЖ до операции у больных с ПОУГ было существенно выше, чем в группе контроля. В динамике после оперативного вмешательства исследуемые показатели сохранялись выше уровня контроля на всех сроках наблюдения.

Показатели наличия или отсутствия избыточного рубцевания. В табл. 1 представлены признаки изменения фильтрационных подушек по классификации MBGS. На 5-е и 21-е сут после операции признаков повышенного рубцевания фильтрационных подушек не выявлено. Через 3 мес после оперативного вмешательства васкуляризация вне фильтрационной подушки (ФП) в группе избыточного рубцевания была более чем



Рис. 1. Уровень (нг/мл) ММП-9 в слезной жидкости больных ПОУГ до операции и в различные сроки после операции.

* - статистическая значимость различий с группой контроля: $p < 0,05$.

в 2 раза выше соответствующего показателя группы без избыточного рубцевания. Васкуляризация по краю и в центре ФП в группе с избыточным рубцеванием также статистически значимо (в 2-3 раза) превышала показатели при менее выраженном рубцевании. Существенно различались и морфологические параметры, так максимальная ширина подушки в группе без избыточного рубцевания более чем в 2 раза превышала аналогичный показатель группы с избыточным рубцеванием.

Показатели ММП-9 в зависимости от исхода операции. При ретроспективном анализе установлено, что со-

держание ММП-9 в СЖ до операции у больных с избыточным рубцеванием оказалось существенно выше, чем в группе без избыточного рубцевания (рис. 3). Максимальный уровень фермента определялся на 5-е сут после операции в обеих группах, но был существенно выше у пациентов с избыточным рубцеванием. На 21-е сут содержание ММП-9 несколько снижалось в обеих группах, но оставалось на высоком уровне, превышая показатели до операции и группы контроля. Через 3 мес содержание ММП-9 в обеих группах продолжало снижаться, достигая в группе без избыточного рубцевания практически

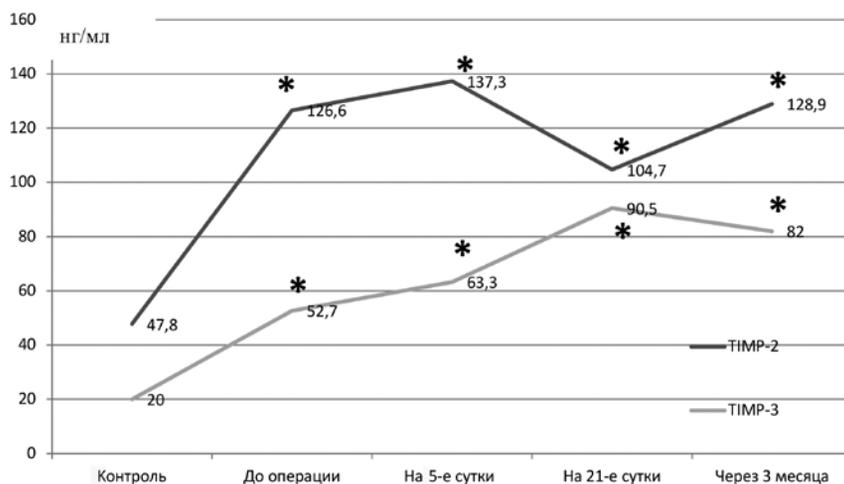


Рис. 2. Уровень (нг/мл) ТІМР-2, ТІМР-3 в слезной жидкости больных ПОУГ до операции и в различные сроки после операции. * - статистическая значимость различий с группой контроля: $p < 0,05$.

Таблица 1

Критерии оценки фильтрационных подушек по MBGS

Определение		Баллы		Норма
		Без избыточного рубцевания*	С избыточным рубцеванием*	
Васкуляризация				
Вне ФП	более 2 мм от края ФП	2,5±0,50	5,88±0,55	3
По краю ФП	2 мм от края или от границы демаркационной зоны	2,67±0,44	6,50±0,96	3
В центре ФП	центр ФП	1,67±0,49	7,06±0,95	3
Морфология				
Толщина стенки	тончайший участок стенки (l = мельчайшее видимое отверстие)	7,13±0,77	2,33±0,55	3
Высота ФП	по отношению к нормальной конъюнктиве	7,81±0,97	2,46±0,58	3
Диффузная зона	процент разлитой диффузной зоны по отношению к размеру демаркационной области	7,56±0,87 (%)	2,93±0,58 (%)	-
Ширина ФП	максимальная ширина ФП (мм)	7,50±0,89	3,04±0,48	-

Примечание. * $p < 0,05$.

исходного уровня, тогда как при избыточным рубцевании уровень ММП-9 оставался выше дооперационного на 20% (рис. 3).

Показатели ТИМР-2 в зависимости от исхода операции. Динамика изменения уровня ТИМР-2 представлена на рис. 4. Концентрация ТИМР-2 в СЖ до операции у больных с избыточным рубцеванием оказалась статистически значимо ниже, чем в группе без избы-

точного рубцевания. На 5-е сут зафиксировано значимое повышение количества ТИМР-2 в группе с избыточным рубцеванием, тогда как в группе без избыточного рубцевания показатель ТИМР-2 существенно не изменился. На 21-е сут уровень ТИМР-2 снижался в обеих группах и был несколько ниже по сравнению с уровнем до операции, но статистически значимо выше, чем в группе контроля. Через 3 мес выявлена раз-

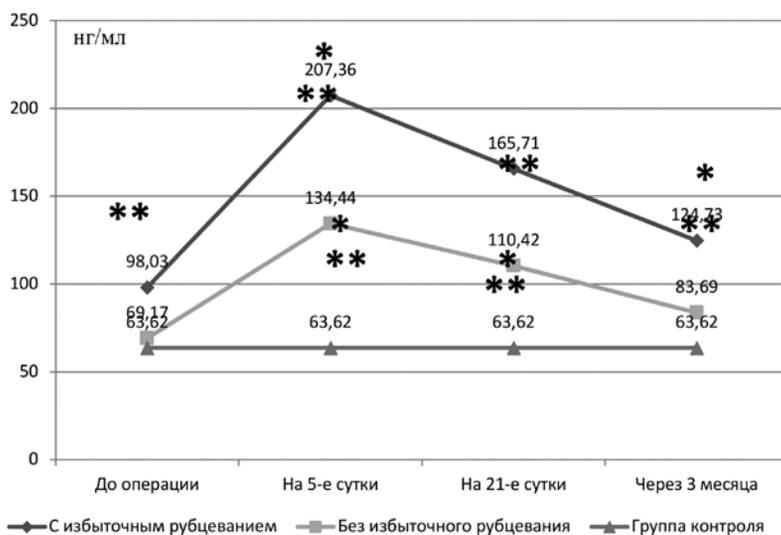


Рис. 3. Уровень (нг/мл) ММП-9 в слезной жидкости больных с ПОУГ в зависимости от исхода оперативного вмешательства в различные сроки после операции, нг/мл.

** - статистическая значимость различий с группой контроля $p < 0,05$; * -- между группами $p < 0,05$.

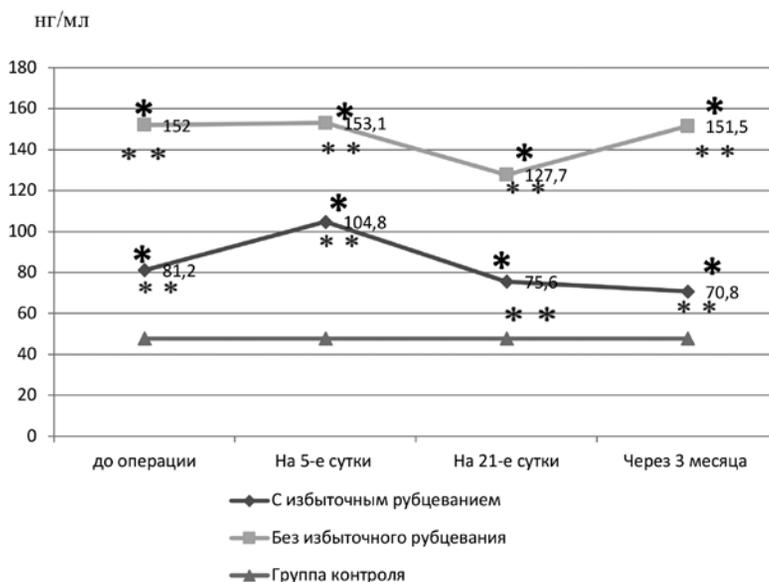


Рис. 4. Уровень (нг/мл) ТИМР-2 в слезной жидкости больных с ПОУГ в зависимости от исхода оперативного вмешательства в различные сроки после операции.

** - статистическая значимость различий с группой контроля $p < 0,05$; * -- между группами $p < 0,001$.

нонаправленная динамика показателя TIMP-2: в группе с избыточным рубцеванием его уровень продолжал снижаться, тогда как в группе без избыточного рубцевания, напротив, повышался. Значения TIMP-2 в каждой группе достигали дооперационного уровня, оставаясь значимо выше, чем в группе контроля.

Показатели TIMP-3 в зависимости от исхода операции. Полученные результаты представлены на рис. 5. Содержание TIMP-3 в СЖ до операции у больных с избыточным рубцеванием был значимо ниже, чем в группе без избыточного рубцевания. На 5-е сут уровень TIMP-3 практически не изменялся в группе с избыточным рубцеванием, тогда как в группе без избыточного рубцевания существенно повысился. На 21-е сут выявлена разнонаправленная динамика содержания TIMP-3: в группе с избыточным рубцеванием уровень повысился в 2 раза, тогда как в группе без избыточного рубцевания, напротив, понизился, но все же оставался статистически значимо выше, чем до операции и в группе контроля. Через 3 мес содержание TIMP-3 в группе с благоприятным исходом повышалось, в то время как в группе с избыточным рубцеванием снижалось, при этом оставаясь значимо выше, чем до операции и в группе контроля.

При расчете коэффициента соотношения MMP-9 и тканевых ее ингибиторов 2-го и 3-го типа было показано, что до операции коэффициент был статистически значимо выше в группе пациентов с избыточным рубцеванием, чем в группе с благоприятным исходом (0,98 и 0,29, соответственно, $p < 0,001$), что может иметь значение при дооперационном обследовании пациентов (табл. 2).

Выявленные изменения содержания MMP-9 и ее ингибиторов 2-го и 3-го типов свидетельствуют о вовлечении процессов повреждения внеклеточного матрикса в патогенез ПОУГ. Своеобразную динамику изменений уровней MMP-9 и ее ингибиторов можно объяснить тем, что согласно стадиям рубцевания на 5-е – 7-е сут после хирургического вмешательства начинается продукция компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Соответственно, MMP-9 в это время повышается, и к 21-м сут начинает постепенно снижаться вследствие запуска противовоспалительных реакций и вовлечения в процесс ингибиторов TIMP-2, TIMP-3, что подтверждается данными литературы [7].

Клинически в послеоперационном периоде оценивалось состояние фильтрационной подушки при помощи биомикроскопии по критериям MBGS, и в зависимости от исхода, выделяли благоприятный (без избыточного рубцевания) и неблагоприятный (с избыточным рубцеванием) исход операции. Благоприятный исход в отношении избыточного рубцевания был выявлен у 64,9% больных, из них стойкая гипотензия была отмечена у 21,6% пациентов, у 43,3% стабилизировать уровень ВГД удалось с помощью дополнительной местной гипотензивной терапии. Неблагоприятный исход, выразившийся в избыточном рубцевании и рецидиве повышения ВГД, выявлен у 35,1% пациентов через 3 мес после операции. При этом повторное оперативное лечение не проводилось, так как у всех пациентов офтальмотонус удалось стойко компенсировать с помощью местной терапии.

Фильтрационная подушка оценивалась по критериям MBGS: васкуляризация, высота и толщина. Отдель-

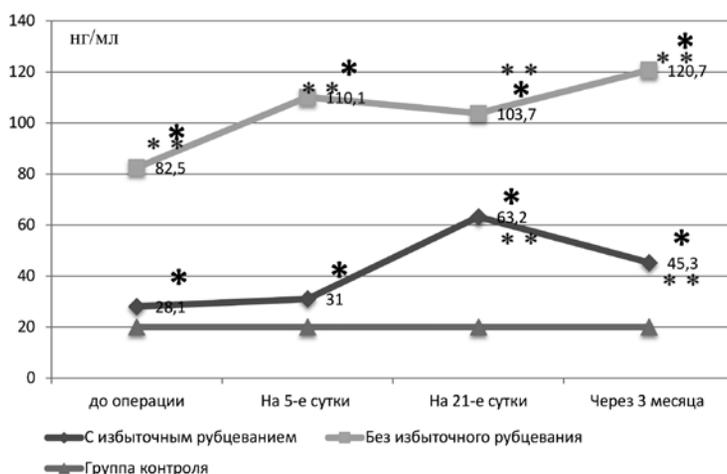


Рис. 5. Уровень (нг/мл) TIMP-3 в слезной жидкости больных с ПОУГ в зависимости от исхода оперативного вмешательства в различные сроки после операции.

** – статистическая значимость различий с группой контроля $p < 0,05$; * – между группами $p < 0,001$

ное внимание было уделено степени васкуляризации подушек. Оценивали гиперемию в центре подушке, по ее краю и в отдалении от подушки (табл. 1). Гиперемия фильтрационной подушки указывала на выраженность воспалительного компонента после хирургического вмешательства, а также возможность нарушения трофики тканей при наличии аваскулярных зон. Пространственные характеристики (ширина и высота) позволяли оценить фильтрационную подушку как проводник внутриглазной жидкости, наличие и характер рубцовых блокад и кистозных изменений в зоне хирургически сформированных путей оттока водянистой влаги. Перечисленные факторы оказывают существенное влияние на эффективность работы фильтрационной подушки, которая, в свою очередь, определяет дальнейшую тактику ведения пациента. Таким образом, именно комплексная оценка состояния гиперемии, ширины и высоты фильтрационной подушки позволяет охарактеризовать ее функциональное состояние.

Оценка состояния фильтрационных подушек проводилась на каждом этапе мониторинга. Послеоперационный период, в первые 5 сут и на 21-е сут, протекал благоприятно с формированием умеренно разлитой фильтрационной подушки и нормализацией офтальмотонуса, стабилизацией зрительных функций. Через 3 мес после операции все пациенты в зависимости от ее исхода были разделены на 2 группы на основании классификации MBGS: с избыточным рубцеванием и без избыточного рубцевания. При анализе данных выявлено, что обильная васкуляризация ФП, небольшая высота и отсутствие разлитой подушки являются факторами риска избыточного рубцевания. Диффузная зона и ширина ФП имели различные показатели в группе с благоприятным исходом (без избыточного рубцевания) и с неблагоприятным исходом (с избыточным рубцеванием).

После оценки ФП, ретроспективно в этих группах были проанализированы уровни ММП-9 и ее ткане-

вых ингибиторов 2-го и 3-го типа в зависимости от исхода операции.

Дооперационный уровень ММП-9, ТИМР-2, ТИМР-3 в СЖ у больных ПОУГ как с последующим благоприятным, так и неблагоприятным исходом хирургического лечения, был статистически значимо выше такового группы контроля. При этом повышенный уровень показателей был отмечен в 94,6% случаев. В группе с избыточным рубцеванием уровень ММП-9 был значительно выше, а количество ТИМР-2 и ТИМР-3 значимо ниже в сравнении с группой без избыточного рубцевания. Это еще раз подтверждает их важную роль в процессах развития глаукомы и участия провоспалительных компонентов в ее патогенезе.

Рассматривая сопряженность между исследуемыми показателями в группе с избыточным рубцеванием можно отметить, что на 5-е сут после оперативного вмешательства содержание ММП-9 повышалось, ТИМР-2 оставалось на прежнем уровне, а ТИМР-3 возрастало. Соответственно, можно предположить, что между ММП-9 и ТИМР-3 существует более значимое взаимодействие, чем с ТИМР-2, а именно: при повышении концентрации ММП-9 в местах оперативного вмешательства включается в процесс ингибитор 3-го типа, опосредуя предотвращение каскада воспалительных реакций. В группе без избыточного рубцевания установлены несколько иные закономерности: в то время как содержание ММП-9 на 5-е сут повышалась, между ТИМР-2 и ТИМР-3 наблюдалась разнонаправленная динамика. На следующем этапе мониторинга ТИМР-3 предположительно более сильно реагирует на продукцию ММП-9, сдерживая ее активность (ТИМР-2 в обеих группах снижался на 21-е сут, ТИМР-3 в группе с избыточным рубцеванием повышался, а в группе без избыточного рубцевания оставался на прежнем уровне). На последнем этапе наблюдения (через 3 мес после операции) определялась относительная недоста-

Таблица 2.

Коэффициент соотношения ММП-9 и тканевых ее ингибиторов 2 и 3 типа

Этапы мониторинга	Группа с избыточным рубцеванием	Группа без избыточного рубцевания	Группа контроля	Статистическая достоверность различий между группами
До операции	0,98±0,19**	0,29±0,28**	0,7±0,34	*p<0,001
На 5-е сутки	1,52±0,38***	0,51±0,15**	0,7±0,53	*p<0,001
На 21-е сутки	1,19±0,14***	0,47±0,12**	0,7±0,36	*p<0,001
Через 3 месяца	1,07±0,06***	0,3±0,07**	0,7±0,38	*p<0,001

Примечание. *Статистическая достоверность различий между группами - p<0,001.

**Статистическая достоверность различий с группой контроля - p<0,05.

***Статистическая достоверность различий с группой контроля - p<0,001.

точность продукции ММП-9, что в последующем может привести к избыточному рубцеванию на фоне повышения продукции ее тканевых ингибиторов. Но в другой группе (без избыточного рубцевания) прослеживается такая же взаимосвязь между исследуемыми показателями, поэтому можно предположить, что на продукцию ММП-9, участвующей в процессах воспаления и TIMP-2-го и 3-го типов, участвующих в процессах формирования рубцовой ткани влияют и другие медиаторы воспаления, в том числе TIMP -1.

Таким образом, доказана обратная зависимость между уровнем ММП-9 и ее тканевых ингибиторов, а также прослежена четкая связь с исходом операции: чем выше концентрация ММП-9 и ниже концентрация TIMP-2, TIMP-3 в СЖ, тем выше вероятность неблагоприятного исхода – рубцевания сформированных дополнительных путей оттока внутриглазной жидкости в послеоперационном периоде.

Мониторинг уровня металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов после проведения хирургического лечения пациентов с первичной открытоугольной глаукомой позволяет прогнозировать раннее рубцевание, дает возможность разработки новых методов лечения, как в раннем, так и в позднем послеоперационном периоде. Возможна разработка новых лекарственных препаратов, способных воздействовать на активность металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов.

Литература

1. Белецкая И.С., Астахов С.Ю. Роль матричных металлопротеиназ в патогенезе глаукомы. *Офтальмологические ведомости*. 2015; 3: 28-35.
2. Попова Е.В. Профилактика рубцевания операционной зоны при хирургии первичной открытоугольной глаукомы. *Практическая медицина*. 2016; 6: 141-4.
3. Петров С.Ю., Сафонова Д.М. Современная концепция избыточного рубцевания в хирургии глаукомы. *Офтальмология*. 2015; 4: 9-13.
4. Пальцын А.А. Матричные протеиназы при инсульте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(3): 110-7. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.110-117.
5. Соколов В.А., Леванова О.Н. Роль матричных металлопротеиназ в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы. *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова*. 2013; 2: 136-9.

6. Хохлова А.С., Маркелова Е.В., Филина Н.В., Овчинникова О.В., Ваева Т.Г., Кабиева А.А. Роль системы матричных металлопротеиназ в прогрессировании первичной открытоугольной глаукомы. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2017; 2: 32-4.
7. Маркелова Е.В., Здор В.В., Романчук А.Л., Бирко О.Н. Матричные металлопротеиназы: их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал. *Журнал иммунопатологии, аллергология, инфектология*. 2016; 2: 11-22.
8. Рукина Д.А., Кириенко А.В. Значение матричной металлопротеиназы в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2011; 3: 41-3.
9. Соколов В.А., Леванова О.Н., Никифоров А.А. Матричная металлопротеиназа-9 как биомаркер первичной открытоугольной глаукомы. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2013; 4: 139-41.
10. Shima I., Katsuda S., Ueda Y., Takahashi N., Sasaki H. Expression of matrix metalloproteinases in wound healing after glaucoma filtration surgery in rabbits. *Ophthalmic Res*. 2007; 39(6): 315-24.

References

1. Beletskaya I.S., Astakhov S.Y. The role of matrix metalloproteinases in glaucoma pathogenesis. *Oftalmologicheskie vedomosti*. 2015; 3: 28-35. (in Russian)
2. Popova E.V. Prophylaxis of operating zone scarring in the primary open-angle glaucoma surgery. *Prakticheskaya meditsina*. 2016; 6: 141-44.
3. Petrov S.Yu., Safonova D.M. The modern concept of wound healing in glaucoma surgery. *Oftalmologiya*. 2015; 4: 9-13.
4. Paltsyn A.A. Matrix metalloproteinases in stroke. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(3): 110-17. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.110-117.
5. Sokolov V.A., Levanova O.N. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of primary open angle glaucoma. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2013; 2: 136-9.
6. Khokhlova A.S., Markelova E.V., Filina N.V., Ovchinnikova O.V., Vaeva T.G., Kabieva A.A. The role of matrix metalloproteinase system in the primary open angle glaucoma patient. *Tihookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 2: 32-4.
7. Markelova E.V., Zdor V.V., Romanchuk A.L., Birko O.N. Matrix metalloproteinases: relationship with cytokines system, diagnostic and prognostic potential. *Zhurnal immunopatologiya, allergologiya, infekctologiya*. 2016; 2: 11-22.
8. Rukina D.A., Kirienko A.V. Importance of matrix metalloproteinase in the pathogenesis of primary open angle glaucoma. *Tihookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 3: 41-3.
9. Sokolov V.A., Levanova O.N., Nikiforov A.A. Matrix metalloproteinase-9 as a biomarker of primary open angle glaucoma. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2013; 4: 139-41.
10. Shima I., Katsuda S., Ueda Y., Takahashi N., Sasaki H. Expression of matrix metalloproteinases in wound healing after glaucoma filtration surgery in rabbits. *Ophthalmic Res*. 2007; 39(6): 315-24.

Сведения об авторах:

Маркелова Елена Владимировна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нормальной и патологической физиологии;
Овчинникова Ольга Викторовна, аспирант каф. нормальной и патологической физиологии, E-mail: os.inferna@mail.ru;
Хохлова Анна Сергеевна, аспирант каф. нормальной и патологической физиологии;
Догадова Людмила Петровна, канд. мед. наук, гл. офтальмолог ДВФО, доцент каф. офтальмологии и оториноларингологии;
Костюшко Анна Валерьевна, канд. мед. наук, доцент каф. нормальной и патологической физиологии;
Плюхтина Мария Сергеевна, клинический ординатор каф. офтальмологии и оториноларингологии.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Дерюгина А.В.¹, Жемарина Н.В.², Иващенко М.Н.³, Самоделкин А.Г.³, Игнатьев П.С.⁴, Воронина Л.А.¹, Шабалин М.А.¹, Грачева Е.А.¹

Коррекция состояния организма низкоинтенсивным лазерным излучением при моделировании адреналовой токсемии у крыс

¹Институт биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», 603950, г. Нижний Новгород, Россия, пр. Гагарина, д. 23;

²Центральная научно-исследовательская лаборатория ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России, 603081, г. Нижний Новгород, Россия, пр. Гагарина, д. 70;

³ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Министерства сельского хозяйства РФ, 603107, Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 97;

⁴АО «Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод имени Э.С. Яламова», 620100, г. Екатеринбург, Россия, ул. Восточная, д. 33Б

Срыв адаптационных возможностей организма может стать патогенетической основой различных заболеваний. Длительный выброс адреналина в кровь вызывает кататоксические эффекты, что делает актуальным поиск эффективных средств и методов коррекции гипердреналинемии. Цель работы – изучение влияния низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) на электрофоретическую подвижность эритроцитов, процессы липопероксидации и структуру надпочечников при адреналовой токсемии у крыс.

Методика. Адреналовую токсемию моделировали внутрибрюшинным введением адреналина-гидрохлорида (0,1 мг/кг). Животным 1-й группы вводили только адреналин, животных 2-й – через 30 мин после введения адреналина облучали НИЛИ, крысы 3-й группы получали только воздействие НИЛИ, контролем служили интактные животные (4-я группа). Воздействие НИЛИ проводилось на затылочную область в течение 10 мин. В качестве источника излучения применяли аппарат лазерный терапевтический «Успех» (ГП «Восход»), основанный на низкоинтенсивном импульсном излучении (длина волны – 0,89±0,05 мкм, частота импульсов 415 Гц, плотность средней мощности излучения – 193 мкВт/см², площадь облучаемой поверхности 20 см²). Забор крови производили через 1 ч, 24 ч и 1 нед после начала эксперимента. Определяли уровень малонового диальдегида по реакции с тиобарбитуровой кислотой; электрофоретическую подвижность эритроцитов изучали методом микроэлектрофореза. Структуру надпочечников изучали морфологическими методами.

Результаты. Показано, что НИЛИ на фоне адреналина (2-я группа) через 1 нед нивелировало снижение электрофоретической подвижности эритроцитов, восстанавливало уровень малонового диальдегида до значений интактной группы. Морфологическая картина надпочечников в этой группе не отличалась от таковой у интактных животных, тогда как при действии адреналина (1-я группа) не происходило восстановления исследуемых показателей до физиологической нормы.

Заключение. Полученные в ходе эксперимента данные свидетельствуют о корригирующем действии низкоинтенсивного лазерного излучения при адреналовой токсемии у животных. Механизм действия низкоинтенсивного лазерного излучения, вероятно, носит системный характер и связан с воздействием на стресс-реализующие системы организма.

Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное излучение; стресс; перекисное окисление липидов; надпочечники; адаптация.

Для цитирования: Дерюгина А.В., Жемарина Н.В., Иващенко М.Н., Самоделкин А.Г., Игнатьев П.С., Воронина Л.А., Шабалин М.А., Грачева Е.А. Коррекция состояния организма низкоинтенсивным лазерным излучением при моделировании адреналовой токсемии у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(4): 81-87.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.81-87

Для корреспонденции: Иващенко Марина Николаевна, e-mail: mi11207@rambler.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00195.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 10.07.2018

Deryugina A.V.¹, Zhemarina N.V.², Ivashchenko M.N.³, Samodelkin A.G.³, Ignatyev P.S.⁴, Voronina L.A.¹, Shabalin M.A.¹, Gracheva E.A.¹

CORRECTION OF THE BODY STATE WITH LOW-INTENSITY LASER IRRADIATION IN MODELING ADRENAL TOXEMIA IN RATS

¹Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod National Research State University, Prospekt Gagarina 23, Nizhny Novgorod 603950, Russia;

²Central Research Laboratory, Department of Morphology, Nizhny Novgorod State Medical Academy, Prospekt Gagarina 70, Nizhny Novgorod 603081, Russia;

³Department of Animal Physiology and Biochemistry, Nizhny Novgorod State Agricultural Academy, Prospekt Gagarina 97, Nizhny Novgorod 603107, Russia;

⁴AO «Production association E.S. Yalamov Ural Optic and Mechanical Plant», Vostochnaya Str. 33B, Ekaterinburg 620100, Russia

Maladaptation results in the third stage of stress, exhaustion, and, thus, may underlie many diseases. Prolonged release of epinephrine into blood exerts catatoxic effects; therefore, searching for effective methods for correction of **hyperadrenalinemia** is relevant. Presently, low-intensity laser therapy (LILT) is commonly used in medicine. However, the introduction of LILT to clinical practice is largely empirical. The aim of this study was to analyze the effect of LILT on electrokinetic potential of red blood cells (RBC), lipid peroxidation (LPO), and the morphology of adrenal glands in adrenal toxemia in rats. **Methods.** Adrenal toxemia was modeled by intraperitoneal administration of epinephrine hydrochloride (0.1 mg/kg) to rats. Animals of group 1 received epinephrine alone; animals of group 2 received LILT 30 min prior to epinephrine administration; rats of group 3 received LILT alone; and intact rats of group 4 were used as control. Blood was withdrawn at one hour, 24 h, and one week of the experiment onset. The RBC zeta potential, which characterizes the morpho-functional state of membranes, was determined by measuring the effect of low-intensity laser therapy on RBC electrophoretic mobility using microelectrophoresis. LPO as an indicator of cell membrane injury was determined by concentration of malonic dialdehyde (MDA). The structure of adrenal glands was studied histologically. **Results.** LILT combined with epinephrine (group 2) alleviated the decrease in RBC electrophoretic mobility and restored the MDA level to values of the intact group at one week. Morphological structure of adrenal glands in group 2 did not differ from that in control whereas epinephrine (group 1) did not restore the study parameters to physiologically normal values. **Conclusion.** The study showed that LILT exerted a correcting effect in experimental adrenal toxemia. The mechanism of this effect is likely systemic and related with the effect on stress systems of the body.

Keywords: low-intensity laser radiation, stress, lipid peroxidation, adrenal glands, adaptation.

For citation: Deryugina A.V., Zhemarina N.V., Ivashchenko M.N., Samodelkin A.G., Ignatyev P.S., Voronina L.A., Shabalin M.A., Gracheva E.A. Correction of the body state with low-intensity laser irradiation in modeling adrenal toxemia in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 81-87. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.81-87

For correspondence: Marina N. Ivashchenko, e-mail: mi11207@rambler.ru

Acknowledgments. The study was performed with financial support RFBR, research project № 18-016-00195.

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

Received 10.07.2108

Введение

В настоящее время все большую актуальность приобретает проблема стресса, поскольку хронический стресс может стать патогенетической основой различных заболеваний. Ведущими стресс-реализующими системами организма являются симпато-адреналовая и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая системы [1]. Если живая система не адаптируется к действию стрессора (из-за его силы, продолжительности действия или качественного своеобразия, препятствующего полноценной адаптации) процесс неизбежно вступает в 3-ю стадию стресса – истощения [2, 3]. При этом длительный выброс адреналина в кровь приводит к истощению коры надпочечников, вызывает кататоксические эффек-

ты (гиперкоагуляцию, активацию окислительного стресса) [4]. Активация симпатоадреналовой системы усугубляет течение ишемической болезни сердца, а повышенный уровень катехоламинов служит фактором риска развития повторного инфаркта миокарда и внезапной смерти [5]. При этом анафилактические состояния в медицине корректируются введением больших доз адреналина, что так же может сопровождаться развитием адреналовой интоксикации. Поэтому поиск эффективных средств и методов коррекции гиперадреналинемии актуален.

На сегодняшний день широкое применение в медицине получило лазерное излучение, что обусловле-

но его корректирующим действием на важнейшие регуляторные системы организма. До настоящего времени не раскрыт полностью механизм возникновения биологической реакции на низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ). Внедрение НИЛИ в клиническую практику идет преимущественно эмпирическим путем. Одной из особенностей действия излучения является сильная зависимость величины и даже знака эффекта от дозы облучения и функционального состояния биологического объекта. Позитивное, стимулирующее действие проявляется, как правило, в узком интервале доз облучения, а затем исчезает или даже сменяется угнетающим действием [6].

Цель исследования – изучение влияния НИЛИ на электрофоретическую подвижность эритроцитов (ЭФПЭ), процессы липопероксидации и морфофункциональное состояние надпочечников при развитии адреналовой токсемии у крыс.

Методика

Исследование проведено на 40 нелинейных белых половозрелых крысах массой 180 – 200 г. Животных содержали в виварии, оборудованной согласно требованиям «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» № 1045-73. Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях от 18 марта 1986 г., ФЗ РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 и а также согласно Приказу Минздрава России № 119н от 01.04.16 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Работа одобрена локальным этическим комитетом.

Адреналиновую токсемию моделировали внутрибрюшинным введением адреналина-гидрохлорида (0,1 мг/кг) [7]. Было сформировано 4 группы: животным 1-й группы вводили адреналин, 2-й группе вводили адреналин и через 30 мин облучали НИЛИ, 3-я группа животных подвергалась только воздействию НИЛИ, контролем служили интактные животные (4-я группа).

Воздействию НИЛИ подвергалась затылочная область головы крыс, помещенных в открытую камеру с расстоянием 2-5 мм от аппликаторов в течение 10 мин. Выбор времени воздействия связан с интервалом проведения стандартной физиологической процедуры. С целью исключения дополнительного стрессирования животных волосяной покров не удалялся. В качестве источника излучения применяли аппарат лазерный терапевтический «Успех» (ГП «Восход»), основанный на низкоинтенсивном импульсном излучении от 10 лазерных диодов, длина волны излучения $0,89 \pm 0,05$ мкм, частотой импульсов 415 Гц, значение плотности средней мощности излучения в плоскости выходного окна аппликатора составляло 193 мкВт/см^2 . Площадь облучаемой поверхности 20 см^2 .

Для оценки срочных и отдаленных эффектов НИЛИ на организм забор крови производили через 1 ч, 24 ч и 1 нед после начала эксперимента. При этом электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) позволяет оценить электрокинетический потенциал эритроцитов, следовательно, морфофункциональное состояние мембран, и является маркером гомеостаза организма в целом, характеризуя степень вовлечения стресс-реализующих систем [8, 9]. ЭФПЭ исследовали методом микроэлектрофореза [10]. Концентрация МДА отражает активность ПОЛ и степень деструкции клеточных мембран. Концентрацию малонового диальдегида определяли по реакции с тиобарбитуровой

Таблица

Электрофоретическая подвижность эритроцитов и концентрация малонового диальдегида исследуемых групп, ($M \pm m$)

Показатель	Время после введения адреналина	Интактные	НИЛИ	Адреналин	Адреналин+ НИЛИ
ЭФПЭ, мкм см $V^{-1}c^{-1}$	1 ч	$1,23 \pm 0,06$	$1,59 \pm 0,08^{*}\#$	$1,12 \pm 0,04^{*}$	$1,15 \pm 0,08^{*}$
	24 ч	$1,32 \pm 0,06$	$1,46 \pm 0,07\#$	$1,10 \pm 0,06^{*}$	$1,41 \pm 0,02\#$
	1 нед	$1,22 \pm 0,07$	$1,54 \pm 0,05^{*}\#$	$1,07 \pm 0,05^{*}$	$1,36 \pm 0,09\#$
МДА, нМоль/мл	1 час	$1,29 \pm 0,22$	$0,48 \pm 0,61^{*}\#$	$4,14 \pm 0,75^{*}$	$4,45 \pm 0,37^{*}$
	24 часа	$1,49 \pm 0,44$	$1,64 \pm 0,26\#$	$3,41 \pm 0,81^{*}$	$3,04 \pm 0,19^{*}$
	1 неделя	$2,09 \pm 0,53$	$1,69 \pm 0,67\#$	$3,61 \pm 0,28^{*}$	$2,79 \pm 0,25\#$

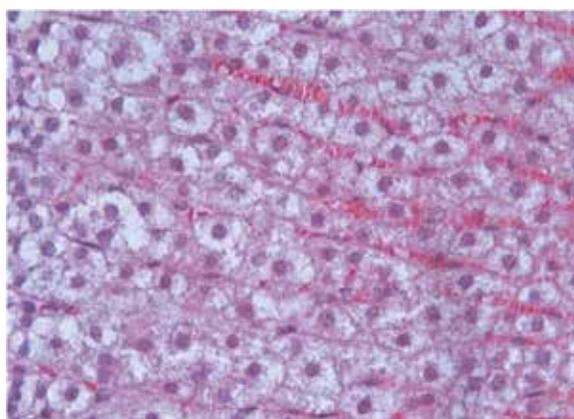
кислотой [11]. Морфо-функциональное состояние надпочечников оценивали на гистологических препаратах. Надпочечники извлекали у декапитированных под наркозом (тиопентал натрия 100 мг/кг) крыс (по 4 животных в указанные временные интервалы) и изучали в те же временные промежутки. Статистическую обработку результатов проводили в программе BIOSTAT с применением методов дисперсионного анализа. Различия считали значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

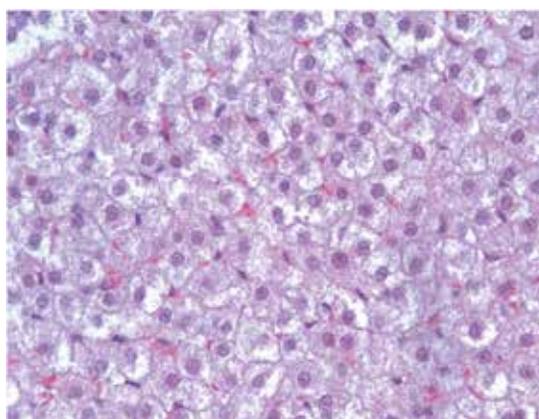
При введении адреналина наблюдалось снижение ЭФПЭ на протяжении всего исследования. Действие НИЛИ на фоне введения адреналина нивелировало реакцию снижения ЭФПЭ с 1-го ч эксперимента, а с 1-х

сут имело место увеличение ЭФПЭ относительно контроля. Влияние НИЛИ на интактных животных уже с 1-го ч исследования вызывало рост ЭФПЭ (табл.).

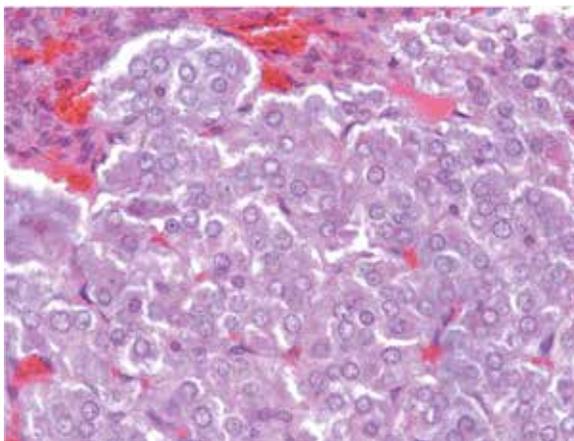
Следует отметить, что увеличение ЭФПЭ при действии НИЛИ, по всей видимости, связано с активацией гипофизарно-надпочечниковой системы. Это доказано нами ранее в эксперименте на крысах. Изменение ЭФПЭ у крыс при стрессовых воздействиях носит однотипный двухфазный характер: первоначальное снижение с последующим увеличением по мере устранения стрессорного воздействия [12]. Снижение ЭФПЭ (1-я фаза) связана с активацией выброса эндогенных катехоламинов. Повышение ЭФПЭ (2-я фаза) определяется нарастанием в крови уровня гормонов коры надпочечников. В свою очередь, механизм изменения ЭФПЭ под влиянием стресс-реализующих гормонов осуществляется че-



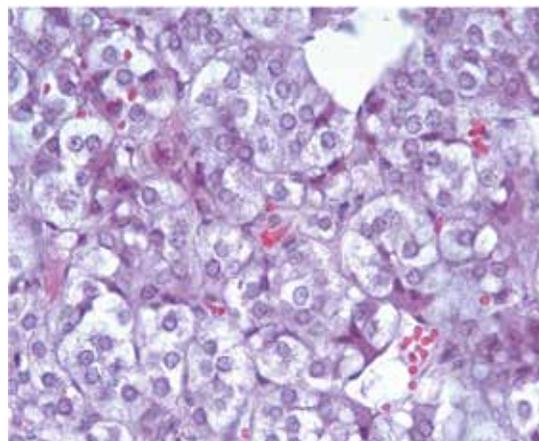
А



Б



В



Г

Влияние НИЛИ на структуру надпочечников через 1 сут после введения адреналина.

Структура пучковой зоны коркового вещества (А, Б) и мозгового вещества (В, Г) надпочечников. А, В – через 1 сут после введения адреналина. Б, Г – через 1 сут после введения адреналина и воздействия НИЛИ. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. × 400.

рез их непосредственное воздействие на эритроцит. Стереотипная реакция организма проявляется интенсификацией процессов свободнорадикального окисления [13]. Эти процессы реализуются по механизму перекисного окисления липидов [14] и традиционно оцениваются по уровню малонового диальдегида (МДА) [15].

Установлено, что НИЛИ снижает концентрацию МДА через 1 ч и 1 нед после воздействия. Использование НИЛИ на фоне адреналина восстанавливало данный показатель до уровня контроля. Данный факт согласуется с многочисленными исследованиями, свидетельствующими об интенсификации процессов ПОЛ при стрессе [12]. При действии НИЛИ проявляется снижение процессов липопероксидации.

Учитывая, что активация симпатoadреналовой системы сопровождается усилением образования активных форм кислорода при аутоокислении адреналина [16], можно предположить, что рост концентрации МДА в эритроцитах при адреналовой токсемии определяется повышением содержания адреналина в периферической крови. НИЛИ активирует факторы антиоксидантной защиты [17], увеличивает активность каталазы, супероксиддисмутазы (СОД) и других природных антиоксидантов вследствие взаимодействия лазерного луча с их активными центрами [18]. Кроме того, повышение ЭФПЭ при действии НИЛИ свидетельствует об ограничении стрессовой реакции, развивающейся на фоне введения адреналина [19, 20].

Поскольку стресс реализуется через изменение функциональной активности надпочечников, в работе был проведен сравнительный анализ структурной перестройки надпочечников при адреналиновом стрессе и воздействии НИЛИ.

Через 1 ч после введения адреналина в надпочечниках обеих опытных групп по сравнению с контрольной группой не наблюдалось существенных морфологических изменений.

Через 1 сут после введения адреналина в надпочечниках наблюдалось полнокровие, расширение гемокпиллярров. Отмечалась вакуолизация эндокриноцитов клубочковой и пучковой зоны, а также мозгового вещества (рис. А-Б). Полнокровие и очаговая вакуолизация эндокриноцитов сохранялись и через 1 нед наблюдения.

Несколько иная тенденция изменений надпочечников отмечена в группе животных, подвергнутых действию НИЛИ. Изменения в надпочечниках через 1 сут были менее выражены (рис. В-Г) и полностью нивелировались через 1 нед.

Заключение

Таким образом, данные, полученные в ходе эксперимента, свидетельствуют о корригирующем действии НИЛИ в динамике стресс-реакции при адреналовой токсемии животных. Механизм реализации действия НИЛИ носит системный характер и связан с действием на стресс-реализующие системы организма.

Литература

1. Барабой В. А. *Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы*. Киев; Фитосоцицентр; 2006.
2. Селье Г. *Очерки об адапционном синдроме*. М.; Медгиз; 1960.
3. Меерсон Ф.З. *Адаптация, стресс и профилактика*. М.; Наука; 1981.
4. Горячева А.А., Морозов В.Н., Пальцева Е.М., Хадарцев А.А., Хетагурова А.К. Возможности предупреждения неблагоприятных эффектов адреналина. *Вестник новых медицинских технологий*. 2007; 3: 30-2.
5. Тапбергенов С.О., Советов Б.С., Тапбергенов А.Т., Ганн Э. Метаболические эффекты сочетанного введения комплекса аденозин и аденозинмонофосфат при гиперадреналинемии. *Наука и здравоохранение*. 2017; 2: 92-104.
6. Давлеткильдеев Н. А., Трушников Г. С. Влияние излучения НИЛИ на эритроциты человека. *Вестник Омского университета*. 2008; 4: 45-8.
7. Андреев С.В. *Моделирование заболеваний*. М.; 1973.
8. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Константинова А.И. Электрофоретическая подвижность и активность Na,K-АТФазы эритроцитов у крыс при стрессе. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2014; 11: 1297-302.
9. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Плескова С.Н. Электрофоретическая подвижность и морфометрия эритроцитов крыс при стрессовых воздействиях. *Современные медицинские технологии*. 2010; 4: 23-7.
10. Дерюгина А.В., Мартусевич А.А., Веселова Т.А. Молекулярно-клеточные механизмы реализации стресс-реакции организма. *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2015; 3: 58-63.
11. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. М.; Наука; 1972.
12. Бизенкова М.Н., Романцева М.Г., Чеснокова Н.П. Метаболические эффекты антиоксидантов в условиях острой гипоксической гипоксии. *Фундаментальные исследования*. 2006; 1: 17-21.
13. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты. *Вестник РАМН*. 1998; 7: 43-51.
14. Весельский И.Ш., Саник А.В. Микроциркуляция, реологические свойства крови, их коррекция при ишемических нарушениях мозгового кровообращения. *Журнал невропатологии и психиатрии*. 1991; 1: 62-5.
15. Кирпатовский В.И. Использование эмульсии а-токоферола для антиоксидантной защиты ишемизированных и консервированных почек. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1996; 5: 499-502.
16. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Кайгородова Е.В., Часовских Н.Ю., Старикова Е.Г. Митогенактивированные протеинкина-

- зы JNK и p38 — редокс зависимые молекулярные мишени и нарушения апоптоза при окислительном стрессе. *Успехи физиологических наук*. 2009; 2: 3-11.
17. Золотарева Т.А., Олешко А.Я., Олешко Т.И. Экспериментальное исследование антиоксидантного действия низкоинтенсивного лазерного излучения инфракрасного диапазона. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры*. 2001; 3: 3-5.
 18. Кожура В.М., Дворецкий С.В., Новодержкина И.С. Влияние внутрисосудистого гелийнеонового лазерного облучения крови на состояние компенсаторных процессов в остром периоде геморрагического шока и после реанимации. *Анестезиология и реаниматология*. 1993; 4: 43-8.
 19. Дерюгина А.В., Крылова Е.В., Лукьянова Л.Д. Влияние убихинона-10 и янтарной кислоты на функциональные характеристики эритроцитов крыс при адреналовой токсемии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2006; 4: 397-99.
 20. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Антипенко Е.А. Электрофоретическая подвижность эритроцитов как способ оценки функции коры надпочечников при стрессовых и патологических состояниях организма. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2013; 2: 39-42.
- ### References
1. Baraboj V.A. *Stress: nature, biological role, mechanisms, outcomes [Stress: priroda, biologicheskaya rol', mekhanizmy, iskhody]*. Kiev; Phytosociocenter; 2006. (in Russian)
 2. Sel'e G. *Essays on adaptation syndrome [Ocherki ob adaptatsionnom sindrome]*. Moscow; Medgiz; 1960. (in Russian)
 3. Meerson F.Z. *Adaptation, stress and prevention Adaptatsiya, stress i profilaktika*. Moscow; Science; 1981. (in Russian)
 4. Goryacheva A.A., Morozov V.N., Pal'ceva E.M., Hadarcev A.A., Hetagurova A.K. Possibilities of prevention of adverse effects of adrenaline. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2007; 3: 30-2. (in Russian)
 5. Tapbergenov S.O., Sovetov B.S., Tapbergenov A.T., Gann E.H. Metabolic effects of combined administration of adenosine and adenosine monophosphate complex in hyperadrenalemia. *Nauka i zdorovoohranenie*. 2017; 2: 92-104. (in Russian)
 6. Davletkil'deev N.A., Trushnikov G.S. Effect of NILI radiation on human erythrocytes. *Vestnik Omskogo universiteta*. 2008; 4: 45-8. (in Russian)
 7. Andreev S.V. *Disease modeling. [Modelirovanie zabolevaniy]*. Moscow; 1973. (in Russian)
 8. Krylov V.N., Deryugina A.V., Konstantinova A.I. Electrophoretic mobility and activity of Na, K-ATPase of erythrocytes in rats under stress. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2014; 11: 1297-1302. (in Russian)
 9. Krylov V.N., Deryugina A.V., Pleskova S.N. Electrophoretic mobility and morphometry of the rat erythrocytes under stress conditions. *Sovremennye meditsinskie tekhnologii*. 2010; 4: 23-7. (in Russian)
 10. Deryugina A.V., Martusevich A.A., Veselova T.A. Molecular and cellular mechanisms of stress response realization. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2015; 3: 58-63. (in Russian)
 11. Vladimirov Y.A., Archakov A.I. Lipid peroxidation in biological membranes. [*Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranakh, realizatsii stress-reaktsii organizma*]. Moscow; Science; 1972. (in Russian)
 12. Bizenkova M.N., Romanceva M.G., Chesnokova N.P. Metabolic effects of antioxidants in the conditions of acute hypoxic hypoxia. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2006; 1: 17-21. (in Russian)
 13. Vladimirov Y.A. Free radicals and antioxidants. *Vestnik RAMN*. 1998; 7: 43-51. (in Russian)
 14. Vesel'skiy I.S., Sanik A.V. Microcirculation, rheological properties of blood, their correction in ischemic disorders of cerebral circulation. *Zhurnal nevropatologii i psichiatrii*. 1991; 1: 62-5. (in Russian)
 15. Kirpatovskiy V.I. Use of a-tocopherol emulsion for antioxidant protection of ischemic and preserved kidneys. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1996; 5: 499-502. (in Russian)
 16. Ryazanceva N.V., Novickiy V.V., Kaygorodova E.V., Chasovskikh N.Yu., Starikova E.G. Mitogenactivated protein kinases JNK and P38-redox dependent molecular targets and apoptosis disorders under oxidative stress. *Uspexhi fiziologicheskikh nauk*. 2009; 2: 3-11. (in Russian)
 17. Zolotareva T.A., Oleshko A.Ya., Oleshko T.I. Experimental study of antioxidant effect of low-intensity infrared laser radiation in infrarange. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizkul'tury*. 2001; 3: 3-5. (in Russian)
 18. Kozhura V.M., Dvoreckij S.V., Novoderzhkina I.S. Effect of intravascular helium-neon laser irradiation of blood on the state of compensatory processes in the acute period of hemorrhagic shock and after resuscitation. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 1993; 4: 43-8. (in Russian)
 19. Deryugina A.V., Krylova E.V., Luk'yanova L.D. Effect of ubiquinone-10 and succinic acid on functional characteristics of rat erythrocytes in adrenal toxemia. *Bulletin' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2006; 4: 397-99. (in Russian)
 20. Krylov V.N., Deryugina A.V., Antipenko E.A. Electrophoretic mobility of erythrocytes as a way to assess the function of the adrenal cortex in stress and pathological conditions of the body patologicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova. 2013; 2: 39-42. (in Russian)

Сведения об авторах:

Дерюгина Анна Вячеславовна, доктор биол. наук, доцент, зав. каф. физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;

Жемарина Наталья Валерьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела морфологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава РФ;

Иващенко Марина Николаевна, канд. биол. наук, доцент каф. физиологии и биохимии животных ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Минсельхоза РФ, E-mail: mi11207@rambler.ru;

Самоделкин Александр Геннадьевич, доктор биол. наук, проф., зав. каф. физиологии и биохимии животных ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Минсельхоза РФ;

Игнатьев Павел Сергеевич, канд. физ.-мат. наук, конструктор ЗАО «Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова»;

Воронина Любовь Алексеевна, студентка каф. физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;

Шабалин Михаил Александрович, ассистент каф. физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;

Грачева Елена Александровна, аспирант каф. физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Айзман Р.И.¹, Козлова А.П.¹, Гордеева Е.И.¹, Головин М.С.¹, Корощенко Г.А.¹, Недовесова С.А.¹, Ломовский И.О.²

Влияние куркумы длинной и галеги восточной на функцию почек крыс при экспериментальном сахарном диабете и острой почечной недостаточности

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации,

630126, г. Новосибирск, Россия, ул. Виллюйская, д. 28;

²ФГБУН «Институт химии твердого тела и механохимии» СО РАН,

630128, г. Новосибирск, Россия, ул. Кутателадзе, д. 18

Цель – исследование влияния куркумы длинной и галеги восточной на осмо- и ионорегулирующую функции почек крыс при аллоксан-индуцированном сахарном диабете и острой почечной недостаточности в эксперименте.

Методика. Эксперименты выполнены на самцах крыс Wistar ($n=70$) с моделью сахарного диабета (1-я серия) и острой почечной недостаточности (2-я серия). В обеих сериях животные были поделены на 3 группы: крыс 1-й группы содержали на стандартном корме, крысам остальных групп в корм добавляли куркуму (2-я группа) или галегу (3-я группа) (2% от массы корма). На 7-е сут эксперимента проводили исследование диуретической и ионоуретической функций почек натошак и после 5% водной нагрузки. Концентрацию ионов в моче и плазме определяли методом пламенной фотометрии; осмотическую концентрацию биологических жидкостей – методом криоскопии; биохимические показатели крови – колориметрическим методом.

Результаты. У животных с сахарным диабетом фоновый диурез, а также экскреция натрия и калия были статистически значимо выше, чем у контрольных животных. При острой почечной недостаточности наблюдался более низкий уровень диуреза и ионоуреза, особенно после водной нагрузки. Прием куркумы и галеги вызывал улучшение осмо- и ионорегулирующей функции почек у крыс с сахарным диабетом, и практически не влиял на эти функции почек при острой почечной недостаточности.

Заключение. При сахарном диабете оба фитопрепарата вызывали понижение концентрации глюкозы, креатинина, мочевины и улучшение ионно-осмотических показателей плазмы крови, при этом эффект куркумы был выражен отчетливее. При острой почечной недостаточности эти фитопрепараты не давали описанного эффекта.

Ключевые слова: сахарный диабет; острая почечная недостаточность; крыса; фитопрепарат; куркума; галега; осмо- и ионорегулирующая функции почек.

Для цитирования: Айзман Р.И., Козлова А.П., Гордеева Е.И., Головин М.С., Корощенко Г.А., Недовесова С.А., Ломовский И.О. Влияние куркумы длинной и галеги восточной на функцию почек крыс при экспериментальном сахарном диабете и острой почечной недостаточности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(4): 88-95.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.88-95

Для корреспонденции: Роман Иделевич Айзман, зав. каф. анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО НГПУ, доктор биол. наук, проф., e-mail: aizman.roman@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №16-13-10200).

Поступила 09.07.2019

Aizman R.I.¹, Kozlova A.P.¹, Gordeeva E.I.¹, Golovin M.S.¹, Koroshchenko G.A.¹, Nedovesova S.A.¹, Lomovsky I.O.²

Effect of *Curcuma longa* and *Galega orientalis* on renal function in rats with experimental diabetes mellitus and acute renal failure

¹Novosibirsk State Pedagogical University,
Vilyuiskaya Str. 28, Novosibirsk 630126, Russian Federation;

²Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry, Siberian Branch of the RAS,
Kutateladze Str. 18, Novosibirsk 2630128, Russian Federation

Aim. To study effects of the phytomedicines, *Curcuma longa* and *Galega orientalis*, on osmosis- and ion-regulating renal functions in rats with experimental diabetes mellitus (DM) and acute renal failure (ARF).

Methods. Experiments were performed in two series on Wistar male rats ($n=70$) with modeled diabetes mellitus (series 1) and acute renal failure (series 2). In each series, the animals were divided into 3 groups, 1) rats of group 1 receiving a standard diet; 2)

rats of groups 2 and 3 receiving a standard diet supplemented with turmeric or galega (2% of food weight), respectively. On the 7th day of the experiment, the diuretic and ionuretic renal function was studied in fasting state and after 5% water loading. Concentrations of ions in urine and plasma were determined by flame photometry; osmotic concentrations of biological fluids were measured by cryoscopy; blood biochemical parameters were measured by colorimetry.

Results. In diabetic rats, background diuresis and sodium and potassium excretion were significantly higher than in the control animals. In rats with acute renal failure, diuresis and ionuresis were significantly lower, particularly after the water loading. Turmeric and galega supplementation improved the osmotic and ion-regulating renal function in diabetic rats and left practically unchanged these functions in rats with acute renal failure.

Conclusion. In rats with diabetes mellitus, both herbal remedies reduced concentrations of glucose, creatinine, and urea and improved ion-osmotic parameters of blood plasma with a more pronounced effect of turmeric. In acute renal failure, these phyto-medicines did not produce the described effects.

Keywords: diabetes mellitus; acute renal failure; rat; phytomedicines; *Curcuma*; *Galega*, osmo- and ion-regulating renal functions.

For citation: Aizman R.I., Kozlova A.P., Gordeeva E.I., Golovin M.S., Koroshchenko G.A., Nedovesova S.A., Lomovsky I.O. Effect of *Curcuma longa* and *Galega orientalis* on renal function in rats with experimental diabetes mellitus and acute renal failure. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 88-95. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.88-95

For correspondence: **Aizman Roman Idelevich**, Head of the Department of Anatomy, Physiology and Life Safety FSBEI HPE "Novosibirsk State Pedagogical University"; Doct. of Biol. Sci., Professor. Novosibirsk, Russian Federation, e-mail: aizman.roman@yandex.ru

Information about authors:

Aizman R.I., <https://orcid.org/0000-0002-7776-4768>

Kozlova A.P., <https://orcid.org/0000-0003-4819-5911>

Gordeeva E.I., <https://orcid.org/0000-0002-3288-5259>

Golovin M.S., <https://orcid.org/0000-0002-8573-856X>

Koroshchenko G.A., <https://orcid.org/0000-0002-8357-8283>

Nedovesova S.A., <https://orcid.org/0000-0002-2402-1792>

Lomovsky I.O., <https://orcid.org/0000-0001-8269-033X>

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

Acknowledgments. The research was supported by the Russian Science Foundation (Grant No16-13-10200).

Received 09.07.2019

Введение

Во всем мире ежегодно отмечается увеличение количества пациентов, страдающих почечной патологией. За последнее десятилетие количество больных с заболеваниями почек и мочевыводящих путей в РФ увеличилось на 30% [1, 2].

Одной из причин, приводящих к развитию почечной недостаточности, является сахарный диабет (СД). Несмотря на богатую историю его изучения и успехи в лечении, СД представляет интерес для исследователей из-за прогрессирующего роста числа больных СД как 1-го, так и 2-го типов [3]. Согласно прогнозам, к 2040 г. число людей, страдающих диабетом в возрасте 20-79 лет, увеличится до 642 млн [4]. Наибольшая опасность СД, безусловно, связана с его осложнениями [5]. Важное место в этом ряду занимает диабетическая нефропатия, которая развивается приблизительно у 20,1% пациентов с СД 1-го типа и 6,3% пациентов с СД 2-го типа [5].

Исходя из сложности и высокой затратности лечения рассмотренных выше заболеваний и их осложне-

ний, ведущим направлением остаются профилактика и разработка доступных методов корригирующей и восстановительной терапии. Перспективным подходом в этом направлении считается использование средств растительного происхождения [6, 7].

Лекарственные средства растительного происхождения оказывают разностороннее комплексное воздействие на течение патологического процесса, дают возможность длительного применения без выраженных побочных эффектов, они относительно недороги, что имеет несомненные преимущества [8]. Особого внимания заслуживают растения с широким биологическим действием, содержащие в своем составе полифенолы [9], например, такие как куркума длинная (*Curcuma longa*) [10] и галега восточная (*Galega orientalis*) [11]. Механизмы действия этих фитопрепаратов на разные звенья регуляции водно-минерального и углеводного баланса в норме и патологии не изучались (галега) или изучены недостаточно (куркума) [10].

Цель исследования – изучение влияния куркумы длинной и галеги восточной на осмо- и ионнорегулирующую функции почек крыс при аллоксан-индуцированном сахарном диабете и экспериментально вызванной острой почечной недостаточности.

Методика

Все эксперименты проводили в соответствии с Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных, принятыми Международным советом научных обществ (СИОМС) в 1985 г., ст. XI Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964 г.) и правилами лабораторной практики в РФ (Приказ МЗ РФ от 19.06. 2003, № 267). Работа одобрена этическим комитетом НГПУ.

Эксперименты выполнены в 2 сериях на взрослых самцах крыс Wistar ($n=70$) массой 250-300 г. В 1-й серии у животных моделировали СД, для чего крысам однократно вводили в межлопаточную область 10% раствор аллоксана (0,1 мл/100 г) [12]. У животных 2-й серии воспроизводили острую почечную недостаточность (ОПН) однократным введением в бедренные мышцы конечностей 50%-го раствора глицерина (1 мл/100 г) [13]. Животные каждой серии были разделены на 3 группы: 1-я группа каждой серии получала стандартный корм, животным 2-й группы в корм добавляли порошок куркумы, 3-й – галеги (по 2 % от массы корма). Контролем служили интактные животные, содержащиеся на стандартном рационе. Каждая группа состояла из 10 животных.

Растительные препараты для пищевых добавок получали путем механохимической обработки на базе ФГБНУ ИХТТМ СО РАН: порошок куркумы длинной – из корневища растения, а галеги – из надземной части. Все животные имели свободный доступ к воде и пище.

На 7-е сут исследовали функции почек: анализировали фоновые пробы мочи, собранные в обменных клетках за 3-5 ч наблюдения, оценивали реакцию почек на водную нагрузку (5% от массы тела перорально через зонд). Пробы мочи после водной нагрузки собирали в течение 3 ч. В конце эксперимента у животных под эфирным наркозом из нижней полой вены брали по 5 мл крови в охлажденные, обработанные безнатриевым гепарином пробирки для последующего физикохимического анализа плазмы.

Содержание основных метаболитов в плазме крови, отражающих функциональное состояние почек (креатинин, мочевины), определяли колориметрическим методом (анализатор «BS-200E», Китай); глюко-

зу – электрохимическим методом («Super GL», Dr. Muller, Германия); концентрацию электролитов в моче и плазме (Na^+ , K^+) – методом пламенной фотометрии (BWB-XPFL Flame Photometer, Великобритания); осмолярность этих биологических жидкостей – методом криоскопии (миллиосмометр «Osmomat», Германия).

Расчет водо- и ионовывделительной функций почек проводили по общепринятым формулам [14]. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием стандартных программ пакета Excel 2010. Статистическую значимость различий оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона-Манна-Уитни для независимых выборок и t-критерию Стьюдента для зависимых величин при уровне значимости $\leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе были проанализированы биохимические показатели крови у крыс (модели СД и ОПН) в условиях покоя утром натощак и после 7-суточного потребления куркумы и галеги. Как видно из рисунка 1, у животных обеих серий концентрация креатинина в плазме (основной индикатор функционального состояния почек) статистически значимо возростала по сравнению с контролем. Куркума и галега вызвали статистически значимое снижение концентрации данного метаболита при СД, но не оказывали влияния на концентрацию креатинина при ОПН. На это же указывали данные о концентрации мочевины у животных в разных группах.

Определение концентрации глюкозы в крови животных с аллоксан-индуцированным СД выявило статистически значимый гипогликемический эффект куркумы и галеги, что чрезвычайно важно для дальнейшего изучения механизма их действия. Таким образом, оба фитопрепарата снижали концентрацию глюкозы, креатинина, мочевины и осмолярности плазмы (**рис. 1**). Показатели концентрации натрия и калия (**табл. 1**) нормализовались при СД, причем, эффект куркумы был выражен в большей степени. При ОПН оба фитопрепарата практически не были эффективны.

Таким образом, прием фитопрепаратов крысами с СД способствовал нормализации большинства указанных показателей и уменьшению концентрации глюкозы, особенно после приема куркумы. При ОПН концентрационные сдвиги в плазме были выражены в меньшей степени, и касались в основном повышения осмолярности.

Полученные данные о повышении концентрации креатинина в плазме крови при обеих моделях нару-

шений диктовали необходимость оценки осмо- и ионорегулирующей функций почек при СД и ОПН. Поскольку наиболее отчетливо резервные возможности органа выявляются в условиях водно-солевых нагрузочных проб [15], мы проанализировали парциальные функции почек крыс не только в условиях покоя натощак, но и после 5%-й водной нагрузки (рис. 2 и 3).

Анализ фоновых показателей диуретической функции почек выявил, что крысы с СД имеют ста-

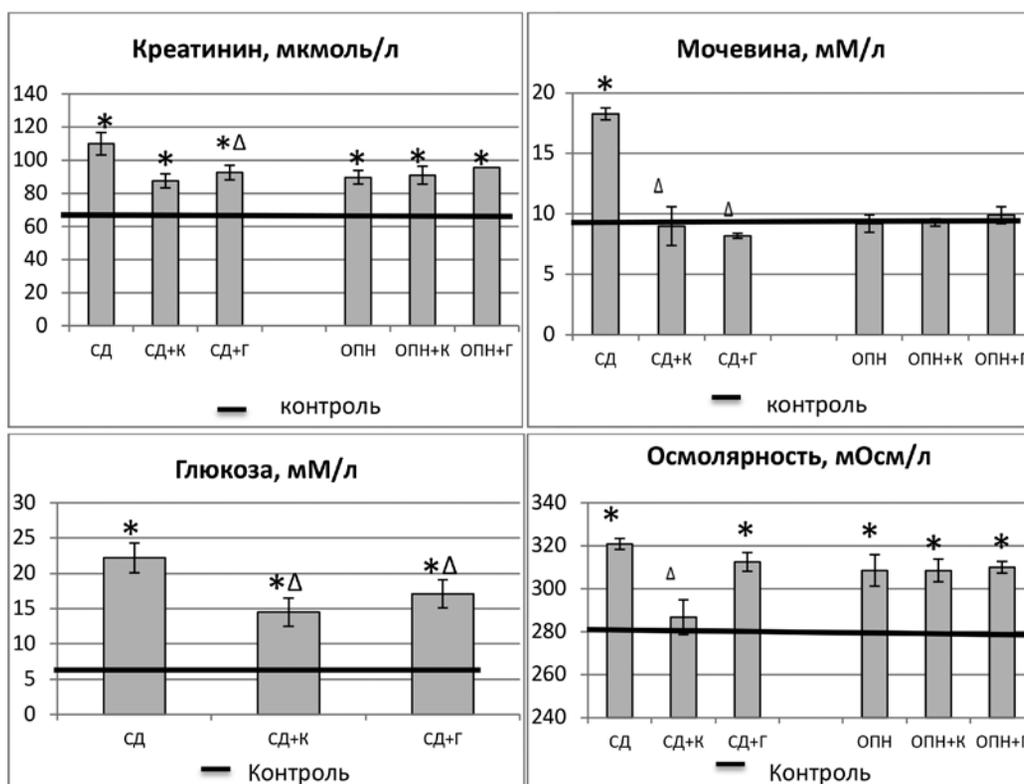
тистически значимо более высокий уровень мочеотделения, чем здоровые животные, за счет сниженной реабсорбции жидкости. Параллельно более высокому уровню мочеотделения увеличивалось выведение натрия и калия, что повышало осмотический клиренс. Это было обусловлено снижением реабсорбции электролитов в почечных канальцах, о чем свидетельствовало статистически значимое повышение экскретируемой фракции катионов. При-

Таблица

Концентрация натрия и калия в плазме крови крыс, мМ/л ($M \pm m$)

Группа	Контроль	СД (1-я гр.)	СД+Куркума (2-я гр.)	СД+Галега (3-я гр.)	ОПН (1-я гр.)	ОПН+ Куркума (2-я гр.)	ОПН+ Галега (3-я гр.)
Натрий	146,4±2,5	127,8±3,4*	135,0±1,7* ^Δ	139,3±3,9 ^Δ	150,5±2,9	148,8±1,6	153,5±1,1
Калий	5,9±0,4	5,0±0,7	5,6±0,1	4,8±0,4*	6,1±0,6	6,1±0,7	5,4±0,5

Примечание. * – статистически значимые отличия от аналогичных показателей контрольной группы ($p < 0,05$); Δ – статистически значимые различия между 2, 3-й и 1-й экспериментальными группами в каждой серии ($p < 0,05$).

Рис. 1. Биохимические показатели плазмы крови крыс ($M \pm m$).

* – статистически значимые отличия от аналогичных показателей контрольной группы ($p < 0,05$); Δ – статистически значимые различия между 2, 3-й и 1-й экспериментальными группами в каждой серии ($p < 0,05$).

Прямая линия – одноименные показатели интактных животных.

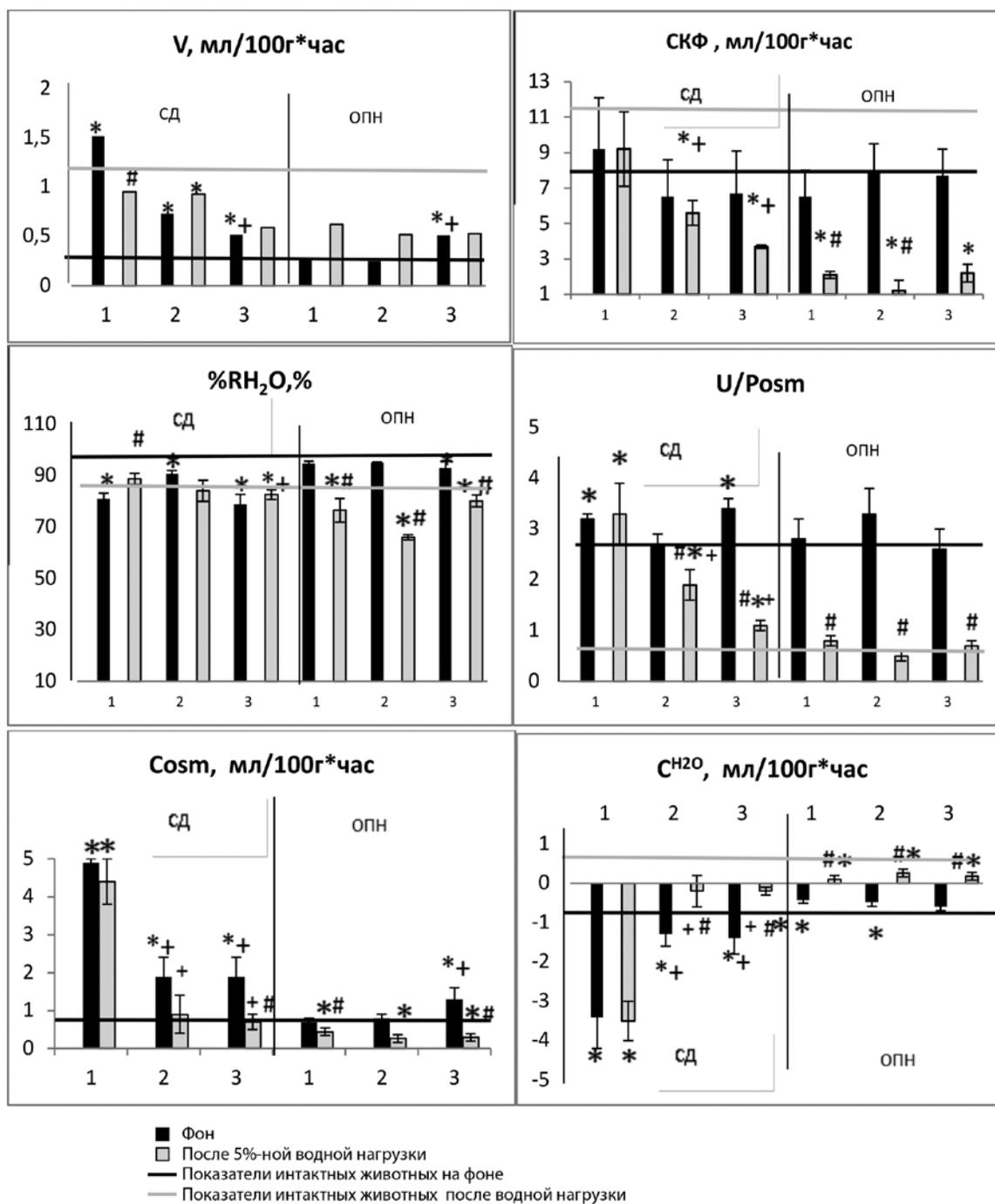


Рис. 2. Диуретическая функция почек у крыс с СД и ОПН после приема фитопрепаратов *Curcuma longa* и *Galega officinalis* на фоне спонтанного мочеотделения (фон) и после 5%-й водной нагрузки.

Здесь и в рис. 3:

- 1 – показатель животных с моделью СД или ОПН, находящихся на стандартном корме;
- 2 – показатель животных с моделью СД или ОПН, потреблявших с кормом куркуму; 3 – показатель животных с моделью СД или ОПН, потреблявших с кормом галегу;
- # - достоверные отличия от фона; + - достоверные отличия от 1 группы СД или ОПН;
- * - достоверные отличия от контроля; V – диурез; СКФ – скорость клубочковой фильтрации; %R_{H2O} – относительная реабсорбция жидкости; U/Posm – концентрационный индекс осмотически активных веществ; Cosm – клиренс осмотически активных веществ; C^{H2O} – клиренс осмотически свободной воды;
- U_{Na}V – экскреция натрия; EF_{Na} – экскретируемая фракция натрия;
- U_KV – экскреция калия; EF_K – экскретируемая фракция калия.

ем фитопрепаратов способствовал улучшению почечных функций, особенно после приема куркумы по сравнению с галегой.

Меньшие гомеостатические сдвиги в плазме крови у крыс при СД после приема фитопрепаратов, несомненно, были обусловлены частичной нормализацией функций почек.

После водной нагрузки выявились меньшие резервные возможности осмо- и ионорегулирующих механизмов у животных с СД по сравнению с контролем. Если у интактных крыс развивалась выраженная диуретическая реакция с экскрецией осмотически свободной жидкости (C^{H_2O} становилась положительной) и более выраженным торможением ее реабсорбции ($\%R_{H_2O}$ достигал 88,1%), то при СД отмечалась парадоксальная реакция – снижение по сравнению с фоном диу-

реза и повышение реабсорбции жидкости без существенных изменений осморегулирующих процессов. В контроле в ответ на прием жидкости выведение натрия снижалось, а калия – возрастало, тогда как при СД отмечалось уменьшение экскреции обоих катионов.

Следовательно куркума и, в меньшей степени, галега в условиях покоя способствовали уменьшению нарушений осмо- и ионорегулирующей функций почек при СД, однако при напряжении функционирования органа после водной нагрузки эти эффекты фитопрепаратов были выражены значительно слабее, что может быть обусловлено недостаточностью резервных механизмов, необходимых для нормализации почечного ответа.

Для обоснования этой гипотезы и проверки эффективности фитопрепаратов на следующем этапе мы

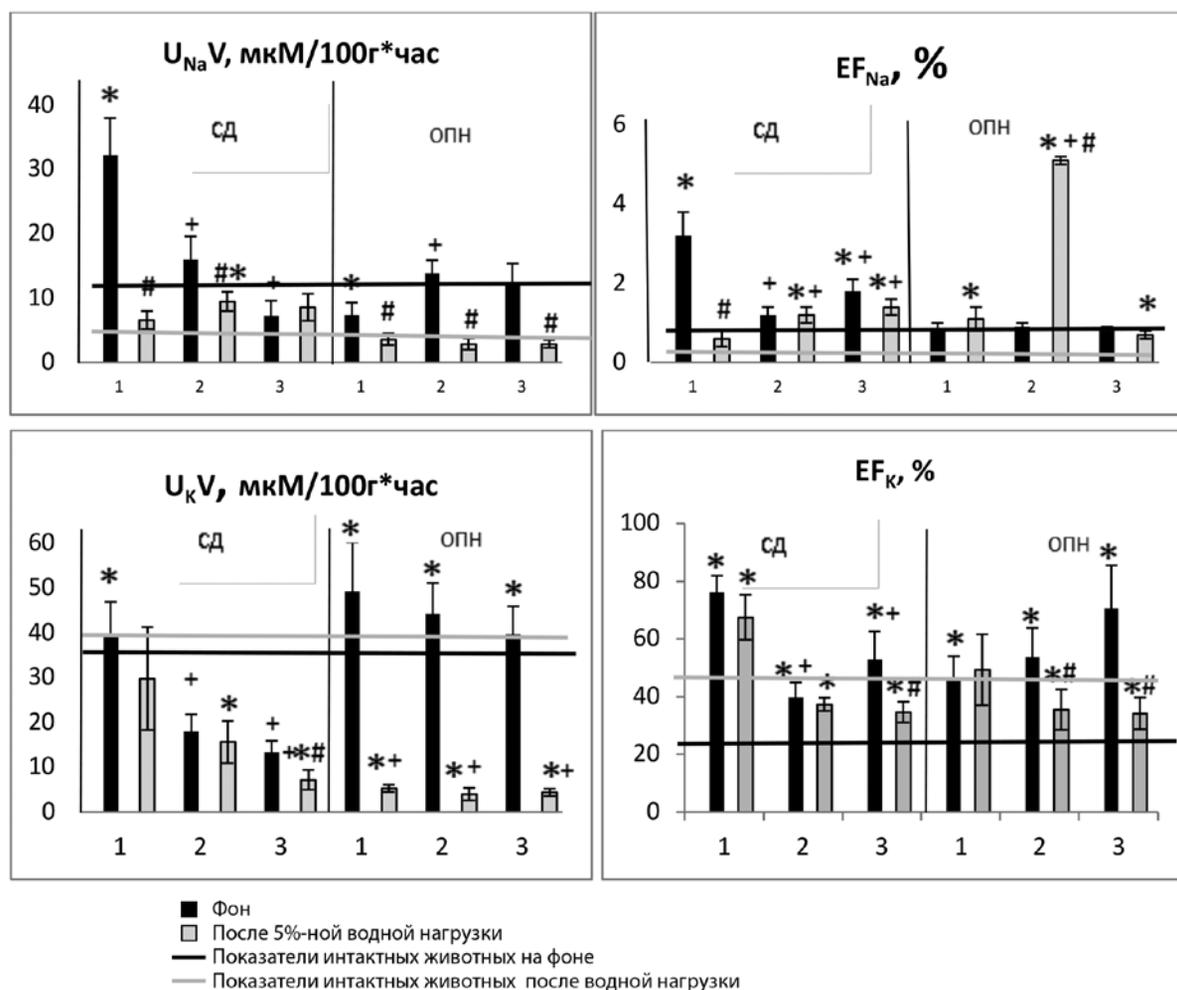


Рис. 3. Ионоретическая функция почек у крыс с моделями СД и ОПН после приема фитопрепаратов *Curcuma longa* и *Galega officinalis* на фоне спонтанного мочеотделения (фон) и после 5%-й водной нагрузки. Все обозначения см. рис. 2.

исследовали функции почек при ОПН (рис. 2, 3), когда часть нефронов уже не функционирует, и таким образом изначально уже снижены резервные возможности органа. Как видно, у крыс с ОПН в фоновых пробах мочи не отмечалось выраженных различий в диуретической и ионоуретической функций почек по сравнению с контролем, можно только отметить тенденцию к снижению скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и реабсорбции жидкости, а также статистически значимое увеличение экскреции осмотически свободной жидкости и калия.

На этом фоне фитопрепараты практически не вызвали каких-либо изменений функции почек по сравнению с ОПН. После водной нагрузки уровень мочеотделения возрастал у всех животных с ОПН, однако в экспериментальных группах крыс он был статистически значимо меньше, чем в контроле, что свидетельствовало о снижении функциональных резервов диуретической функции почек. Причем, СКФ была даже ниже, чем на фоне, но происходило большее угнетение $\%R_{H_2O}$ и повышение выведения осмотически свободной жидкости. Это сопровождалось уменьшением экскреции ионов натрия, калия и осмотически активных веществ, что важно для сохранения осмотического гомеостаза при снижении диуретической функции. Однако наблюдаемое повышение осмолярности плазмы при ОПН (рис. 1) указывало на функциональную недостаточность почечной реакции крыс для сохранения этого параметра. На фоне уменьшения функциональных резервов почек при ОПН фитопрепараты практически не оказывали эффекта на осмо- и ионорегулирующую функции почек, что приводило к осмотическим сдвигам в плазме.

Заключение

Таким образом, анализ полученного материала позволил заключить, что фитопрепараты *Curcuma longa* и *Galega orientalis* при СД способствовали уменьшению концентрации глюкозы в крови и нормализации гомеостатических показателей плазмы, благодаря улучшению функционального состояния почек. Этот эффект был лучше выражен после приема куркумы и особенно проявлялся в условиях фона. При ОПН вследствие морфофункциональных нарушений и снижения резервных возможностей почек, эти фитопрепараты практически не оказывали влияния на осмо- и ионорегулирующие реакции, что отражалось в отсутствии изменений показателей почечной реакции в покое на фоне и парадоксальном почечном ответе после водной нагрузки.

Литература

1. Герасимова О.Ю., Семченко Л.Н., Ременец С.С. Эпидемиология хронических болезней почек и организация медицинской помощи больным при хронической почечной недостаточности (обзор литературы). *Южно-Уральский медицинский журнал*. 2016; 4: 4-9.
2. Куприенко Н.Б., Светлова З.В., Смирнова Н.Н. Метаболические основы профилактики инфекции мочевой системы у детей. *Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова*. 2017; 24(1): 22-7.
3. *International Diabetes Federation (2015). IDF Diabetes Atlas Eighth Edition Available at: <http://www.diabetesatlas.org> (accessed 9 Decemder 2018).*
4. Ogurtsova K., da Rocha Fernandes J.D, Huang Y., et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017; 128: 40-50.
5. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клиничко-статистический анализ по данным регистра сахарного диабета. *Сахарный диабет*. 2017; 20(1): 13-41.
6. Николаев С.М., Матханов И.Э., Корсун В.Ф. Системное действие растительных лекарственных препаратов при заболеваниях. *Практическая фитотерапия*. 2017; (2): 29-33.
7. Саватеева-Любимова Т.Н., Сивак К.В. Сравнительная оценка токсического действия лекарственных средств на интактных животных и в условиях моделирования патологических состояний. *Биомедицина*. 2012; (4): 76-9.
8. Ткачук В.Н., Аль-Шукри С.Х., Аммо Ризан. Опыт применения фитотерапии у больных нефролитиазом после дистанционной ударноволновой литотрипсии. *Урология*. 2011; (5): 8-10.
9. Ермоленко Т.И. Перспективы применения фитопрепаратов в лечении мочекаменной болезни. *Научные ведомости. Медицина. Фармация*. 2014; 18(189): 205-11.
10. Козлова А.П., Корошенко Г.А., Ломовский И.О., Головин М.С. Гордеева Е.И., Недовесова С.А. и др. Профилактика и коррекция нарушений углеводного обмена при сахарном диабете как медико-социальная проблема формирования здорового образа жизни: экспериментальное обоснование. *Science for Education Today*. 2019; 9(1): 208-25.
11. Якимова Т.В., Ухова Т.М., Буркова В.Н., Арбузов А.Г., Мозжелина Т.К., Саратиков А.С. Гипогликемическое действие экстракта из *Galega officinalis* (Fabaceae), культивируемой на Алтае. *Растительные ресурсы*. 2005; 41: 134-8.
12. Можейко Л.А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета. Часть I. Аллоксановый диабет. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2013; 3(43): 26-9.
13. Shustin L., Wald H., Popovtzer M.M. Role of down-regulated CHIF mRNA in pathophysiology of hyperkalemia of acute tubular necrosis. *American Journal Kidney Diseases*. 1998; 32: 600-4.
14. Наточин Ю.В. *Физиология почки: Формулы и расчеты*. Л.; Изд-во Наука, 1974.
15. Айзман Р.И., Великанова Л.К. Оценка водно-солевого обмена и функции почек с помощью нагрузочных проб. В кн.: *Новые методы научных исследований в клинической и экспериментальной медицине*, Новосибирск: НГМИ. 1980; 5-13.

References

1. Gerasimova O.Yu., Semchenko L.N., Remenec S.S. Epidemiology of chronic kidney disease and organization of medical care for patients with chronic renal failure (literature review). *Yuzhno-Uralskiy meditsinskiy zhurnal*. 2016; 4: 4-9. (in Russian)
2. Kuprienko N.B., Svetlova Z.V., Smirnova N.N. Metabolic bases of prevention of urinary system infection in children. *Uchenye zapiski Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta imeni akademika I.P. Pavlova*. 2017; 24(1): 22-7. (in Russian)
3. *International Diabetes Federation (2015). IDF Diabetes Atlas Eighth Edition Available at: <http://www.diabetesatlas.org> (accessed 9 Decemder 2018)*
4. Ogurtsova K., da Rocha Fernandes J.D, Huang Y., et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017; 128: 40-50.
5. Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulova O.K. Epidemiology of diabetes in the Russian Federation: clinical and statistical analysis according to the register of diabetes. *Saharnyy diabet*. 2017; 20(1): 13-41. (in Russian)
6. Nikolaev S.M., Matkhanov I.E., Korsun V.F. Systemic action of herbal medicines for diseases. *Prakticheskaya fitoterapiya*. 2017; 2: 29-33. (in Russian)
7. Savateeva-Lyubimova T.N., Sivak K.V. Comparative assessment of the toxic effects of drugs on intact animals and in conditions of modeling pathological conditions. *Biomeditsina*. 2012; 4: 76-9. (in Russian)
8. Tkachuk V.N., Al'-SHukri S.H., Ammo Rizan. Experience with the use of herbal medicine in patients with nephrolithiasis after extracorporeal shock wave lithotripsy. *Urologiya*. 2011; 5: 8-10. (in Russian)
9. Ermolenko T.I. Prospects for the use of phytopreparations in the treatment of urolithiasis. *Nauchnye vedomosti. Meditsina. Farmatsiya*. 2014; 18(189), issue 27: 205-11. (in Russian)
10. Kozlova A.P., Koroshchenko G.A., Lomovsky I.O., Golovin MS, Gordeeva E.I., Nedovesova S.A. et al. Prevention and correction of carbohydrate metabolism disorders in diabetes mellitus as a medical and social problem of the formation of a healthy lifestyle: an experimental rationale. *Science for Education Today*. 2019; 9 (1): 208-25. (in Russian)
11. Yakimova T.V. Uhova T.M., Burkova V.N., Arbuzov A.G., Mozzhelina T.K., Saratikov A.S. Hypoglycemic effect of the extract from Galega officinalis (Fabaceae), cultivated in the Altai. *Rastitel'nye resursy*. 2005; 41(2): 134-8. (in Russian)
12. Mozheiko L.A. Experimental models for the study of diabetes. Part I. Alloxan diabetes. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2013; 3(43): 26-9. (in Russian)
13. Shustin L., Wald H., Popovtzer M.M. Role of down-regulated CHIF mRNA in pathophysiology of hyperkalemia of acute tubular necrosis. *American Journal Kidney Diseases*. 1998; 32: 600-4.
14. Natochin Yu.V. *Physiology of the kidney: Formulas and calculations. [Fiziologiya pochki: Formuly i raschety]*. Leningrad; Publishing House Science, 1974. (in Russian)
15. Aizman R.I., Velikanova L.K. Evaluation of water-salt metabolism and kidney function using loading tests. In: *New Methods of Scientific Research in Clinical and Experimental Medicine. [Otsenka vodno-solevogo obmena i funktsii pochek s pomoshch'yu nagruzochnykh prob. V kn.: Novye metody nauchnykh issledovaniy v klinicheskoy i eksperimental'noy meditsine]*. Novosibirsk; NSMI. 1980; 5-13. (in Russian)

Сведения об авторах:

Айзман Роман Иделевич, доктор биол. наук, проф., зав. каф. анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО НГПУ, e-mail: aizman.roman@yandex.ru;

Козлова Анна Павловна, канд. биол. наук, доцент каф. анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО НГПУ, e-mail: anna-gajdarova@yandex.ru;

Гордеева Елизавета Игоревна, аспирант каф. анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО НГПУ, e-mail: liz5772@mail.ru;

Головин Михаил Сергеевич, канд. биол. наук, доцент каф. анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО НГПУ, e-mail: golovin593@mail.ru;

Корощенко Галина Анатольевна, канд. биол. наук, доцент каф. анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО НГПУ, e-mail: svyatashg@mail.ru;

Недovesова Светлана Анатольевна, аспирант каф. анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО НГПУ, e-mail: nedovesovasweta@mail.ru;

Ломовский Игорь Олегович, канд. хим. наук, И.О. зав. лаб. химии твердого тела Института химии твердого тела и механохимии СО РАН, e-mail: lomovsky@solid.nsc.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-002.77

Гонтарь И.П.¹, Емельянова О.И.¹, Русанова О.А.¹, Маслакова Л.А.¹, Зборовская И.А.^{1,2}, Шилова Л.Н.²

Антитела к ферментам антиоксидантной системы как патогенетический фактор развития анемии при ревматоидном артрите

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», 400138, г. Волгоград, Россия, ул. Землячки, д. 76;

²Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, г. Волгоград, Россия, пл. Павших борцов, д. 1

Цель исследования – изучение антителообразования к супероксиддисмутазе, глутатионредуктазе, каталазе у больных ревматоидным артритом и выяснение их роли в патогенезе сопутствующей анемии.

Методика. Проведено обследование 104 больных ревматоидным артритом с различной степенью активности процесса, формой и характером течения. Диагноз ревматоидного артрита ставился на основании клинико-лабораторного и инструментального обследования больных согласно системе диагностических критериев Американской ревматологической ассоциации, предложенной в 2010 году (ACR / EULAR). Выраженность анемии оценивали по уровню гемоглобина и количеству эритроцитов. Определение уровня антител проводили методом непрямого иммуноферментного анализа [ELISA тест] с использованием иммобилизованных магнитосорбентов, представляющих собой полиакриламидные гранулы, содержащие магнитный материал и перечисленные ферменты в качестве антигена. В качестве антигенов использовались коммерческие отечественные препараты: супероксиддисмутазы из эритроцитов человека (активность 30 Ед/мг), в исследованиях использовали фермент в рабочем разведении по белку – 100 мкг/мл, глутатионредуктаза (активность 340 Ед/мг) – 200 мкг/мл по белку, каталаза (активность 380 Ед/мг) – 1,4 мкг/мл по белку. Учитывая достаточную относительную молекулярную массу глутатионредуктазы и каталазы, иммобилизацию проводили методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота с включением магнитного материала. В связи с небольшой относительной молекулярной массой эритроцитарной фиксации супероксиддисмутазы иммобилизацию фермента проводили путем пришивки его молекулы глутаровым альдегидом к инертной полиакриламидной грануле, содержащей магнитный материал. «Чистые» антитела к ферментам получали с помощью соответствующего антигенного иммуносорбента. Источником специфических иммуноглобулинов служили сыворотки больных ревматоидным артритом с заранее определенным высоким титром антител (экстинция >0,2). После инкубации антигенного иммуносорбента и растворимой формы фермента с полученными антителами был проведен анализ изменения активности энзима. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программных пакетов Statistica 6.0, Excel 5.0, Statgraphics 3.0, SPSS 12.0.

Результаты. Выявлена зависимость между уровнем антител к супероксиддисмутазе, глутатионредуктазе и каталазе и активностью, течением и формой болезни. Полученные результаты свидетельствуют о повышении антителогенеза к этим ферментам по мере активизации патологического процесса. Выявленное снижение активности энзимов, связанное с выработкой антител к ним, происходит, очевидно, вследствие блокирования специфическими иммуноглобулинами активного центра фермента, являющегося одновременно и антигенной детерминантой. Об участии антител к ферментам в патогенезе анемии у больных ревматоидным артритом свидетельствует обратная корреляция между содержанием антител и уровнем гемоглобина. У больных ревматоидным артритом с умеренно выраженной анемией содержание антител было значимо выше, чем у пациентов без анемии, но ниже, чем у пациентов с тяжелой формой анемии.

Заключение. Антитела к супероксиддисмутазе, глутатионредуктазе и каталазе являются одним из патогенетических факторов развития анемии и могут служить критерием тяжести заболевания.

Ключевые слова: супероксиддисмутазы; глутатионредуктаза; каталаза; антитела; ревматоидный артрит.

Для цитирования: Гонтарь И.П., Емельянова О.И., Русанова О.А., Маслакова Л.А., Зборовская И.А., Шилова Л.Н. Антитела к ферментам антиоксидантной системы как патогенетический фактор развития анемии при ревматоидном артритом.

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2019; 63(4): 96-100.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.96-100

Для корреспонденции: Емельянова Ольга Ивановна, e-mail: emelyanova.vlg@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 26.03.2018

Gontar I.P.¹, Emelianova O.I.¹, Rusanova O.A.¹, Maslakova L.A.¹, Zborovskaia I.A.^{1,2}, Shilova L.N.²

Antibodies to enzymes of antioxidant system as a pathogenetic component of anemia in rheumatoid arthritis

¹FSBI Research Institute for Clinical and Experimental Rheumatology,
76 Zemlyachki str., Volgograd, 400138, Russia;

²Volgograd State Medical University,
Volgograd, Russia

The aim was to study formation of antibodies to superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), and catalase (CAT) in patients with rheumatoid arthritis (RA) and to elucidate the role of the antibodies in development of anemia.

Methods. The antibodies were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized magnetic sorbents, polyacrylamide granules containing a magnetic substance and the enzymes (SOD, GR, CAT) as antigens. Antibody concentration was expressed in absorbance units. Rheumatoid arthritis was diagnosed based on clinical and instrumental evaluation of patients according to the criteria of the American College of Rheumatology (ACR/EULAR, 2010). Statistical analysis was performed using variation statistics, and results were expressed as mean±SEM. Central tendencies were compared using the Student's test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. ELISA was performed on blood serum from 104 rheumatoid arthritis patients with different disease activity. The following commercial reagents (Russia) were used as antigens: superoxide dismutase from human RBCs (30 U/mg), which was used in the study in a working protein dilution of 100 mcg/ml; glutathione reductase (340 U/mg) which was used in the study at a protein concentration of 200 mg/ml; and catalase (380 U/mg), which was used in the study at a protein concentration of 1.4 mg/ml. Since the relative molecular weights of glutathione reductase and catalase were sufficient, immobilization was performed by emulsion polymerization in a flow of gaseous nitrogen including a magnetic material. Due to a low relative molecular weight of SOD from RBCs this enzyme was immobilized by coupling to an inert polyacrylamide granule containing a magnetic material, using glutaric aldehyde. «Pure» antibodies to the enzymes were obtained using a respective antigen immunosorbent. Specific immunoglobulins were obtained from blood serum of rheumatoid arthritis patients with a known high antibody titer (extinction > 0.2). Enzymatic activity was analyzed following incubation of the antigen immunosorbent and soluble enzyme with the obtained antibodies.

Results. Production of antibodies to the studied enzymes increased with increasing severity of the disease. The decrease in enzymatic activity associated with production of respective enzyme antibodies is apparently due to inhibition by specific immunoglobulins of the active center, which is also the antigenic determinant.

Conclusion. Antibodies to SOD, GR, and CAT are pathogenetic factors in the development of anemia; they may serve as a criterion for disease severity.

Keywords: superoxide dismutase; glutathione reductase; catalase; antibodies; rheumatoid arthritis.

For citation: Gontar I.P.¹, Emelianova O.I.¹, Rusanova O.A.¹, Maslakova L.A.¹, Zborovskaia I.A.^{1,2}, Shilova L.N.² Antibodies to enzymes of antioxidant system as a pathogenetic component of anemia in rheumatoid arthritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4):96-100.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.96-100

For correspondence: **Emelianova O.I.**, Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher) Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy», 76 Zemlyachki str., Volgograd, 400138, Russia; E-mail: emelianova.vlg@mail.ru

Information about authors:

Gontar I.P., <http://orcid.org/0000-0001-9920-1360>

Emelianova O.I., <http://orcid.org/0000-0003-3951-8985>

Rusanova O.A., <http://orcid.org/0000-0002-7080-2442>

Maslakova L.A., <http://orcid.org/0000-0003-4718-732X>

Zborovskaia I.A., <http://orcid.org/0000-0002-8824-0409>

Shilova L.N., <http://orcid.org/0000-0002-0438-8554>

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

Received 26.03.2018

Введение

Согласно данным литературы, анемия развивается у 30-70% больных ревматоидным артритом (РА) [1, 2]. Одни авторы рассматривают анемию как осложнение РА, другие считают анемию симптомом заболевания [3, 4].

В патогенезе анемии при РА могут играть роль различные факторы, в том числе образование антител к ферментам антиоксидантной системы (АОС) [5].

К ферментам, обладающим антиоксидантным действием, относятся марганец-медьсодержащий фермент – супероксиддисмутаза (СОД), глутатионредуктаза (ГР), каталаза (КАТ), глутатионпероксидаза (ГП), церулоплазмин (ЦП), пероксидаза, цитохромоксидаза, некоторые медь-содержащие оксидазы и протеолитические ферменты клетки.

Учитывая характерные иммунологические нарушения, наблюдаемые при РА, логично предположить, что снижение активности этих ферментов может происходить как в результате участия их в дезактивации активных форм кислорода (АФК), так и вследствие гиперпродукции антител к этим ферментам.

Цель исследования – изучение антителообразования к супероксиддисмутазе, глутатионредуктазе, каталазе у больных ревматоидным артритом и выяснение роли антител в патогенезе сопутствующей анемии.

Методика

В исследовании приняли участие 104 больных ревматоидным артритом и 30 – здоровых лиц, которые дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации [6]. Работа одобрена региональным этическим комитетом. Диагноз РА ставился на основании клинико-лабораторного и инструментального обследования больных согласно системе диагностических критериев Американской ревматологической ассоциации, предложенной в 2010 г. (ACR / EULAR). Выраженность анемии оценивали по уровню гемоглобина и количеству эритроцитов в крови обследуемых. Антитела к СОД, ГР определяли непрямым твердофазным иммуноферментным методом с использованием иммобилизованных гранулированных антигенных препаратов с магнитными свойствами [7], концентрацию антител выражали в единицах оптической плотности (е.о.п). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программных пакетов Statistica 6.0, Excel 5.0, Statgraphics 3.0, SPSS 12.0. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

В качестве антигенов использовали коммерческие отечественные препараты: СОД из эритроцитов человека (активность 30 Ед/мг) в рабочем разведении по белку – 100 мкг/мл; ГР (активность 340 Ед/мг) – 200 мкг/мл по белку; КАТ (активность 380 Ед/мг) – с концентрацией 1,4 мкг/мл по белку. Учитывая достаточную относительную молекулярную массу ГР и КАТ, иммобилизацию проводили методом эмульсионной

полимеризации в модификации И.П. Гонтьаря с соавт. (1990) в потоке газообразного азота с включением магнитного материала¹. В связи с небольшой относительной молекулярной массой эритроцитарной СОД фиксацию фермента проводили путем пришивки его молекулы глутаровым альдегидом к инертной полиакриламидной грануле, содержащей магнитный материал. «Чистые» антитела к ферментам получали с помощью соответствующего антигенного иммуносорбента.

Источником специфических иммуноглобулинов служили сыворотки больных РА с высоким титром антител (экстинция $> 0,2$). После инкубации антигенного иммуносорбента и растворимой формы фермента с полученными антителами был проведен анализ изменения активности фермента. Активность СОД определяли по методу С. Чевари и соавт. (1985) [8], а активность ГР по методу Hosoda и Nakamura, описанному М.А. Шифриным (1977) [9].

Результаты и обсуждение

Определяя ферментативную активность иммобилизованной формы СОД после предварительного взаимодействия с чистыми антителами к СОД, было обнаружено статистически значимое снижение активности фермента на 99% по сравнению с контролем. Это происходит, очевидно, вследствие блокирования антителами активного центра фермента являющегося одновременно и антигенной детерминантой. При определении активности растворимой формы СОД после взаимодействия со специфическими антителами выявлено снижение активности фермента на 65%. Полученные результаты показывают, что растворимая форма СОД после взаимодействия со специфическими антителами сохраняет более высокую активность фермента, чем при его иммобилизации. Это объясняется вероятно тем, что при образовании комплекса антиген – СОД-антитело проявляется СОД-активность, свойственная, по данным литературы, иммунному комплексу [10]. Поэтому было решено определять возможную активность СОД-ЦИК именно в плазме больных РА. Сохранение активности растворимой формы КАТ после взаимодействия со специфическими АТ, может быть объяснено известным фактом неполного совпадения антигенного и активного центров изучаемого фермента, что позволяет последнему в фермент-

¹ Гонтьарь И.П., Зборовский А.Б., Левкин С.В., Сычева Г.Ф. Способ получения магнитных полиакриламидных гранул. Патент на изобретение РФ № 1582657-1993г.

Содержание АТ к СОД, ГР, КАТ у больных РА с различным уровнем Нв.

Контингент обследуемых	N	Антитела к СОД	Антитела к ГР	Антитела к КАТ
Здоровые	30	0,060	0,057	6,72±0,32
Больные РА без анемии	67	0,112±0,021**	0,101±0,048**	10,42±0,63*
Больные РА с 90г/л<Нв<115г/л	21	0,179±0,028***	0,150±0,063***	13,86±1,03**
Больные РА с Нв<90г/л	16	0,229±0,051***	0,210±0,047***	15,64±1,80***

Примечание. *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$.

антиферментном комплексе оставаться доступным для низкомолекулярного субстрата [11].

В сыворотках больных РА обнаружены повышенные значения уровня антител к СОД ($0,135 \pm 0,006$, в контрольной группе (здоровые лица) – $0,06 \pm 0,004$, $p < 0,001$). Выявлена статистически значимая зависимость между уровнем антител к ферментам и активностью заболевания (АТ к СОД при I ст. активности – $0,102 \pm 0,011$, при II – $0,135 \pm 0,006$, при III – $0,229 \pm 0,051$; АТ к ГР при I ст. активности – $0,101 \pm 0,01$, при II – $0,15 \pm 0,01$, при III – $0,21 \pm 0,04$; АТ к КАТ при I ст. активности – $8,86 \pm 0,47$, при II – $11,92 \pm 0,53$, при III – $14,53 \pm 1,02$) $p < 0,001$. Показатели уровня антител к СОД, ГР и КАТ статистически значимо зависели и от характера течения заболевания.

Отмечается более высокий уровень антител к этим ферментам при быстро прогрессирующем процессе по сравнению с медленно прогрессирующим. Это позволяет рассматривать уровень антител к СОД, ГР и КАТ как критерии тяжести заболевания. (АТ к СОД – $r = -0,20$, $p = 0,07$; АТ к ГР – $r = -0,20$, $p = 0,07$). Об участии антител к ферментам – антиоксидантам в патогенезе анемии у больных РА говорит выявленная статистически значимая обратная корреляционная зависимость между уровнем антител и величиной гемоглобина, а также количеством эритроцитов в крови больных. Содержание антител к антиоксидантным ферментам статистически значимо возрастало по мере падения уровня гемоглобина и числа эритроцитов в крови, то есть выраженности анемии (табл.).

У больных РА отмечается также увеличение выработки АФК, продуктов ПОЛ в мембранах эритроцитов. Активные метаболиты кислорода повреждают клеточную мембрану путем изменения наиболее лабильных компонентов с образованием перекисных соединений. Повреждения мембран снижают продолжительность жизни эритроцитов, усиливая их адгезию к эндотелию.

Одним из звеньев антиоксидантной защиты эритроцитов являются СОД, ГР и КАТ. Поэтому ингибирование ферментов специфическими иммуноглобулинами возможно является одним из факторов, способствующих развитию анемии у больных РА. Об этом говорят и полученные нами данные о снижении уровня гемоглобина, эритроцитов в группах с повышенным содержанием антител к СОД, ГР, КАТ.

В нормальных условиях после взаимодействия иммунных комплексов с рецепторами комплемента, находящимися на мембранах эритроцита утрачивается способность их фиксироваться в тканях организма, а уменьшение количества эритроцитов, наблюдаемое при различных патологических состояниях, может способствовать снижению клиренса ЦИК и отложению их в тканях, приводя к усилению иммунокомплексных повреждений.

Заключение

Таким образом, антитела к СОД, ГР и КАТ являются одним из патогенетических факторов развития анемии при РА, а динамика нарастания уровня антител может служить критерием тяжести заболевания.

Литература

1. Фоломеева О.М., Эрдес Ш.Ф., Насонова В.А. Ревматические заболевания у населения Российской Федерации в начале XXI века. *Терапевтический архив*. 2007; 12: 5-12.
2. Bloxham E. Anaemia in rheumatoid arthritis: can we afford to ignore it? *Postgrad Med J*. 2011; 87: 596-4.
3. Ватутин Н.Т., Смирнова А.С., Калинин Н.В., Шевелев А.Н. Анемия у больных РА: особенности патогенеза, диагностики и лечения. *РМЖ*. 2013; 21: 1069.
4. Blake D.R., Hall N.D., Bacon P.A., Dieppe P.A., Halliwell B, Gutteridge J.M. The importance of iron in rheumatoid disease. *Lancet*. 1981; 2: 1142-2.
5. Носков С.М., Козлов Г.С., Широкова Л.Ю. Своднорадикальные реакции при ревматоидном артрите. *Ревматология*. 1988; (4): 72-4.

6. Weijer C. Bioethics for clinicians: 10 Research ethics. *CMAJ*. 1997; 156: 1153-7.
7. Гонтарь И.П., Сычева Г.Ф., Александров А.В., Шилова Л.Н., Симакова Е.С., Емельянов Н.Н. и соавт. Эмульсионная полимеризация как метод, модифицирующий ферменты с сохранением биологических свойств их наноструктур. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010; 12: 715-4.
8. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. *Лабораторное дело*. 1985; (11): 678-3.
9. Шифрин М.А., Заикин В.Н., Гармаш В.Я. Изменение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в крови при неспецифических воспалительных заболеваниях легких. *Терапевтический архив*. 1977; 49(12): 50-5.
10. Азаренок К.С., Генералов И.И. Новые функции антител. *Терапевтический архив*. 1990; (5): 149-4.
11. Диксон М., Уэбб Э. *Ферменты*: пер. с англ. М.; Мир. 1982; 2: 515.
4. Blake D.R., Hall N.D., Bacon P.A., Dieppe P.A., Halliwell B., Gutteridge J.M. The importance of iron in rheumatoid disease. *Lancet*. 1981; 2: 1142-2.
5. Noskov S.M., Kozlov G.S., SHirokova L.Yu. Summary radical reactions in rheumatoid arthritis. *Revmatologiya*. 1988; (4): 72-4. (in Russian)
6. Weijer C. Bioethics for clinicians: 10 Research ethics. *CMAJ*. 1997; 156: 1153-7.
7. Gontar' I.P., Sycheva G.F., Aleksandrov A.V., Shilova L.N., Simakova E.S., Emel'yanov N.N. et al. Emulsion polymerization as a method of modifying enzymes preserving the biological properties of their nanostructures. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2010; 12: 715-4. (in Russian)
8. Chevare S., Chaba I., Sekey J. The role of superoxide dismutase in oxidative processes of cells and the method of its determination in biological materials. *Laboratornoe delo*. 1985; (11): 678-3. (in Russian)
9. Shifrin M.A., Zaikin V.N., Garmash V.Ya. Changes in the activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase in the blood in non-specific inflammatory lung diseases. *Terapevticheskiy arkhiv*. 1977; 49(12): 50-5. (in Russian)
10. Azarenok K.S., Generalov I.I. New antibody functions. *Terapevticheskiy arkhiv*. 1990; (5): 149-4. (in Russian)
11. Dikson M., Uehbb E. *Enzymes: English lane*. Moscow; Mir. 1982; 2: 515. (in Russian)

References

1. Folomeeva O.M., Erdes Sh.F., Nasonova V.A. Rheumatic diseases in the population of the Russian Federation at the beginning of the XXI century. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2007; 12: 5-12. (in Russian)
2. Bloxham E. Anaemia in rheumatoid arthritis: can we afford to ignore it. *Postgrad Med J*. 2011; 87: 596-600.
3. Vatutin N.T., Smirnova A.S., Kalinkina N.V., Shevelek A.N. 2. Anemia in patients with rheumatoid arthritis: specifics of its

Сведения об авторах:

Гонтарь Илья Петрович, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. клинической иммунологии ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского». Волгоград, e-mail: i.p.gontar@mail.ru;

Емельянова Ольга Ивановна, вед. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», e-mail: emelyanova.vlg@mail.ru;

Русанова Ольга Александровна, мл. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», e-mail: olga-rusanova28@rambler.ru;

Маслакова Лариса Александровна, вед. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», e-mail: lar_mas73@mail.ru;

Зборовская Ирина Александровна, директор ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», доктор мед. наук, проф., e-mail: nauka@pebma.ru;

Шилова Людмила Николаевна, доктор мед. наук, зав. каф. госпитальной терапии Волгоградского государственного медицинского университета, e-mail: nauka@pebma.ru;

Вклад авторов в подготовку материалов и текста:

- Гонтарь И.П. – 40%,
- Емельянова О.И. – 30%,
- Русанова О.А. – 15%,
- Маслакова Л.А. – 5%,
- Зборовская И.А. – 5%,
- Шилова Л.Н. – 5%.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Мороз А.С.¹, Семенникова С.В.³, Копылова С.В.¹, Строганов А.Б.²

Активность окислительных процессов при эндометрите у крыс

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского» Минобрнауки России,

603950, г. Нижний Новгород, Россия, пр. Гагарина, д. 23;

²ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России, 603950, ГСП-470, г. Нижний Новгород, Россия, пл. Минина и Пожарского, д.10/1;

³ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА РФ, 603109, г. Нижний Новгород, Россия, ул. Ильинская, д. 14

Введение. Проблема лечения эндометрита связана в первую очередь с трудностями своевременной дифференциальной диагностики и отсутствием четких клинико-лабораторных критериев. Женщины с хроническим эндометритом в анамнезе даже при условии прегравидарной подготовки составляют группу высокого риска по развитию акушерских и перинатальных осложнений, причиной которых является внутриматочная инфекция. Возбудителями являются прежде всего микроорганизмы, поражающие цилиндрический эпителий канала шейки матки: гонококки и хламидии, мико- и уреоплазмы, которые снижают защитные свойства ееечной слизи, что облегчает распространение восходящей инфекции.

Цель исследования -- поиск значимых лабораторных критериев диагностики эндометрита в эксперименте.

Методика. Опыты проведены на крысах Wistar, массой 180-200 г. Эндометрит моделировали путем ретроградного введения взвеси аутокалла в полость матки с помощью спринцевания. Маркерами окислительных процессов в организме были выбраны показатели перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков. Активность перекисного окисления липидов оценивали по содержанию в плазме крови диеновых и триеновых конъюгатов и оснований Шиффа. Уровень окислительной модификации белков изучали в реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков плазмы с 2,4-динитро-фенилгидразином с образованием альдегид- и кетондинитрофенилгидразонов основного и нейтрального характера, которые регистрировали спектрофотометрически.

Результаты. Показано, что у крыс с эндометритом возрастало количество инициальных и конечных продуктов перекисного окисления липидов. При оценке активности окислительной модификации белков в плазме крови показано повышение концентрации карбонильных производных окисленных белков нейтрального и основного характера.

Заключение. Выявленный эффект может быть опосредован повышенным уровнем активных форм кислорода, образующихся при действии бактериальной флоры, а также защитной реакцией нейтрофилов, реагирующих на появление антигенных агентов. Можно полагать, что под воздействием продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков происходит повреждение мембран клеток эндометрия, что может быть одной из причин расстройства репродукции, синдрома хронической тазовой боли и развития бесплодия. Данные могут быть использованы для объективизации критериев и ранней лабораторной диагностики эндометрита.

Ключевые слова: эндометрий; эндометрит; перекисное окисление липидов; окислительная модификация белка.

Для цитирования: Мороз А.С., Семенникова С.В., Копылова С.В., Строганов А.Б. Изучение активности окислительных процессов при экспериментальном моделировании эндометрита у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 101-104.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.101-104

Для корреспонденции: Копылова Светлана Вячеславовна, e-mail: gorelaya@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.04.2018

Moroz A.S.¹, Semennikova S.V.³, Kopylova S.V.¹, Stroganov A.B.²

Activity of oxidative processes in rat endometritis

¹N.I. Lobachevsky Research State University of Nizhny Novgorod, Prospekt Gagarina 23, Nizhny Novgorod 603950, Russia;

²Nizhny Novgorod State Medical Academy, Ploshchad Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

³Privolzhsky District Medical Center, Iljinskaya Str. 14, Nizhny Novgorod 603109, Russia

Summary. The challenge of treating endometritis is associated primarily with the difficulty of timely differential diagnosis and the absence of distinct clinical and laboratory criteria. Women with a history of chronic endometritis, even with a pregravid preparation, constitute a high-risk group for the development of obstetric and perinatal complications caused by intrauterine infection. The pathogens are primarily microorganisms that affect the cylindrical epithelium of cervical canal, gonococci, chlamydia, myco- and ureaplasmas, which impair protective properties of the cervical mucus and facilitate the spread of ascending infection. **The aim** of the study was experimental searching for significant and reliable laboratory criteria for the diagnosis of endometritis. **Methods.** Experiments were performed on Wistar female rats weighing 180-200 g. Animals were divided into the groups of intact animals and experimental animals with endometritis induced by retrograde injection of auto feces suspension into the uterine cavity by douching. Markers of oxidative processes included products of lipid peroxidation (LP) (triene and diene conjugates and Schiff bases) and protein oxidation (protein carbonyls) in rat plasma. **Results.** Plasma concentrations of initial and final LP products as well as of neutral and basic carbonylated proteins were increased in rats with experimental endometritis. **Conclusion.** The observed effect of experimental endometritis was apparently due to increased production of reactive oxygen species by the bacterial flora administered into the rat uterine cavity. In addition, this effect could result from the protective response of neutrophils to antigenic agents. Apparently, both LP products and oxidation-modified proteins damage cell membranes including endometrial membranes, which may cause reproductive disorders, chronic pelvic pain, and infertility. In future, after clinical studies, these indexes could be used to enhance objective and early laboratory diagnosis of endometritis.

Key words: endometrium; endometritis; lipid peroxidation; oxidative modification of proteins.

For citation: Moroz A.S., Cherkunova O.S., Khlyuneva T.Yu., Kilberger K.A., Semennikova S.V., Kopylova S.V., Stroganov A.B. Activity of oxidative processes in rat endometritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 101-104. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.101-104

For correspondence: Svetlana V. Kopylova, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Physiology, Institute of Biology and Biomedicine, UNN; 23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation, e-mail: gorelaya@mail.ru

Information about authors:

Moroz A.S., <http://orcid.org/0000-0002-5028-2486>

Semennikova S.V., <http://orcid.org/0000-0002-6466-0020>

Kopylova S.V., <http://orcid.org/0000-0002-5527-9075>

Stroganov A.B. <http://orcid.org/0000-0002-7106-4760>

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 27.04.2018

Введение

Проблема лечения эндометрита, связана в первую очередь с трудностями своевременной дифференциальной диагностики и отсутствием четких клинико-лабораторных критериев. Женщины с хроническим эндометритом в анамнезе даже при условии прегравидарной подготовки составляют группу высокого риска по развитию акушерских и перинатальных осложнений, причиной которых является внутриматочная инфекция. Беременность у женщин с эндометритом статистически значимо чаще осложняется угрозой прерывания (28%) и хронической плацентарной недостаточностью (25%). При этом лишь у 16% пациенток диагностируются какие-либо значимые воспалительные изменения в общем анализе крови, не связанные с экстрагенитальной патологией [1]. Особенностью эндометрита является частый переход восходящей инфекции на маточные

трубы. Возбудителями являются прежде всего микроорганизмы, поражающие цилиндрический эпителий канала шейки матки: гонококки и хламидии, мико- и уреоплазмы, которые снижают защитные свойства шеечной слизи, что распространение восходящей инфекции [2]. Цель исследования – поиск значимых лабораторных критериев диагностики эндометрита в условиях эксперимента.

Методика

Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к Приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.77), Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. и ФЗ РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997. Работа одобрена локальным этическим

комитетом. В задачи работы входило изучение активности окислительных процессов при моделировании эндометрита у крыс. Для исследования использовано 40 половозрелых крыс-самок Wistar массой 0,18-0,2 кг из питомника лабораторных животных филиала «Андреевка» ФГБУН БМТ ФМБА России, Московская область. Животных содержали в виварии, оборудованном согласно требованиям «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» № 1045-73. Крысы находились в одинаковых пластиковых клетках с поилками, получали полноценный экструдированный комбикорм и свободный доступ к воде.

Животные были разделены на 2 группы: интактные (контроль) и животные, у которых воспроизводили эндометрит (опыт) по модифицированной нами методике К.Ю. Тихаевой и соавт. [3]. Эндометрит моделировали ретроградным введением взвеси аутокалла в полость матки с помощью спринцевания. Активность процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию в плазме крови диеновых и триеновых конъюгатов и оснований Шиффа [5]. Уровень окислительного модифицирования белков (ОМБ) изучали в реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков плазмы крови крыс с 2,4-динитро-фенилгидразином (2,4-ДФГ) с образованием альдегид- и кетондинитрофенилгидразонов основного и нейтрального характера ($\text{АДНФГ}_{\text{нейтр}}$, $\text{АДНФГ}_{\text{осн}}$, $\text{КДНФГ}_{\text{нейтр}}$, $\text{КДНФГ}_{\text{осн}}$), которые регистрировали спектрофотометрически при длинах волн от 230 до 535 нм. Для проведения измерений экстинкций в тестах использовался спектрофотометр СФ-2000 (Санкт-Петербург, Россия). С целью определения степени выраженности и стадии окислительного стресса вычисляли площадь под кривой спектра окислительной модификации белков [6]. Полученное значение площади под кривой делили на содержание общего белка плазмы крови крыс (г/л) и окончательное значение выражали в единицах оптической плотности/грамм белка (ед. $\text{ОП}_{\text{нм}}/\text{г}$ белка).

Забор крови производили из подъязычной вены на 10 сут после моделирования эндометрита. Уровень физиологической нормы определяли у интактных животных. Полученные данные обработаны с помощью пакетов прикладных программ BIOSTAT и Microsoft Excel с использованием t-критерия Стьюдента, результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$ [7].

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного эксперимента показали, что в плазме крови у крыс группы «опыт» статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивалось количество инициальных и конечных продуктов ПОЛ — диеновых и триеновых конъюгатов на 18% и 53%, соответственно и оснований Шиффа в 2,8 раза по сравнению с интактными животными. Интенсификация процессов ПОЛ подтверждалась повышением соотношения «основания Шиффа/диеновые конъюгаты» в 2,4 раза. Подъем уровня диеновых и триеновых конъюгатов свидетельствовал об инициации процессов окисления, а увеличение концентрации оснований Шиффа — о дестабилизации мембран, в том числе, и мембран клеток эндометрия.

Помимо активации процессов ПОЛ наблюдалось увеличение интенсивности окислительной модификации белков, которая статистически значимо усиливалась в 2,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «интактные животные».

Содержание первичных маркеров окислительного стресса в нашем эксперименте составило 8,03 ед. $\text{ОП}_{\text{нм}}/\text{грамм}$ белка, содержание вторичных маркеров составило 3,10 ед. $\text{ОП}_{\text{нм}}/\text{грамм}$ белка, что превышало интактные значения более чем в 2 раза.

При сопоставлении между собой изучаемых показателей (таблица) оказалось, что у опытных животных концентрации $\text{АДНФГ}_{\text{нейтр}}$ и $\text{КДНФГ}_{\text{нейтр}}$ возросла в 2 и 2,5 раза соответственно, а $\text{АДНФГ}_{\text{осн}}$ и $\text{КДНФГ}_{\text{осн}}$ — в 4 раза относительно интактных животных.

Таблица

Влияние экспериментального эндометрита на интенсивность окислительной модификации белков (ед. $\text{ОП}_{\text{нм}}/\text{грамм}$ белка) в плазме крыс

	АДНФГ		КДНФГ		ОМБ
	Нейтральные	Основные	Нейтральные	Основные	
Интактные	3,23±0,31	0,3±0,04	1,09±0,30	0,01±0,00	4,63±0,67
Эндометрит	6,83±1,51*	1,2±0,34*	2,7±0,7*	0,04±0,01*	10,77±1,05*

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «интактные животные».

Изменения, выявленные в плазме крови экспериментальных животных, свидетельствуют об увеличении интенсивности окислительного стресса в организме. В процессе ПОЛ равновесие смещается в направлении образования конечных продуктов липопероксидации, таких как основания Шиффа, что может привести к образованию цитотоксических веществ и создать потенциальную угрозу организму. Можно полагать, что в результате ОМБ усиливается как фрагментация, так и агрегация белковых молекул. Наиболее важным следствием этого может являться ингибирование ферментов [8].

Заключение

Таким образом, под воздействием как продуктов перекисного окисления липидов, так и окислительной модификации белков, происходит деградация мембран клеток эндометрия, что может являться одной из причин расстройства репродукции, синдрома хронической тазовой боли и развития бесплодия. После клинической части исследования в перспективе, возможно использование данных показателей с целью объективизации критериев и ранней лабораторной диагностики эндометрита.

Литература

1. Долгушина В.Ф., Курносенко И.В., Спиридонова К.С., Хитрова М.Н. Особенности течения беременности, родов, послеродового периода у женщин с хроническим эндометритом в анамнезе. *Кремлевская медицина. Клинический вестник*. 2014; 3: 65-8.
2. Agraval V., Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2012; 17(1): 12-9.
3. Тихаева К.Ю., Ткаченко Л.В., Рогова Л.Н., Куркин Д.В. Метод моделирования хронического воспаления эндометрия и его патогенетическое обоснование. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2015; 45(1): 31-4.
4. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии*. 1989; 1: 127-1

Сведения об авторах:

Мороз Анастасия Сергеевна, аспирант каф. физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского; (25%)

Семенникова Софья Владимировна, канд. мед. наук, зав. физиотерапевтическим отделением ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России, (25%)

Копылова Светлана Вячеславовна, канд. биол. наук, доцент каф. биохимии и физиологии Института биологии и биомедицины, e-mail: gorelaya@mail.ru (25%)

Строганов Андрей Борисович, доктор мед. наук, доцент, доц. каф. урологии им. Е.В. Шахова ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России (25%)

5. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порогов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопросы медицинской химии*. 1995; 1: 24-6.
6. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. Окислительная модификация белков и активность катепсина Н тимомитов крыс в условиях in vitro модулирования синтеза оксида азота (II). *Казанский медицинский журнал*. 2014; 95(4): 553-7.
7. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.; Практика; 1998.
8. Обухова Л.М., Ерлыкина Е.И., Копытова Т.В. Белки плазмы крови и свободнорадикальная активность при злокачественных новообразованиях эпителиальных тканей. *Вестник удмуртского университета*. 2017; 27(3): 380-5.

References

1. Dolgushina V.F., Kurnosenko I.V., Spiridonova K.S., Khitrova M.N. Features of the course of pregnancy, childbirth, the postpartum period in women with a chronic history of endometritis. *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik*. 2014; 3: 65-8. (in Russian)
2. Agraval V., Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2012; 17(1): 12-9.
3. Tikhayeva K.Yu., Tkachenko L.V., Rogova L.N., Kurkin D.V. The method of modeling chronic inflammation of the endometrium and its pathogenetic justification. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2015; 45(1): 31-4. (in Russian)
4. Volchegorsky I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G., Lifshits R.I. Comparison of different approaches to the definition of LPO products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1989; 1: 127-31. (in Russian)
5. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porogov I.G. Oxidative modification of human serum proteins, method of its determination. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1995; 1: 24-6. (in Russian)
6. Abaleniikhina Yu.V., Fomina M.A. Protein oxidative modification and cathepsin H activity in rats' thymocytes at nitrogen oxide (II) synthesis modulation in vitro. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 95(4): 553-7. (in Russian)
7. Glanz S. *Medico-biological statistics. [Mediko-biologicheskaya statistika]*. Moscow; Praktika; 1998. (in Russian)
8. Obukhova L.M., Erlykina E.I., Kopytova T.V. Blood plasma proteins and free radical activity of neoplasm tumors of epithelial tissues. *Vestnik udmurtskogo universiteta*. 2017; 27(3): 380-5. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.379-008.64-02:612.616]-053.31]-092.9

Брюхин Г.В., Антонов С.Д.

Характеристика клеток Лейдига у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа в ранний неонатальный период

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 454092, г. Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64

Цель исследования – анализ содержания и субпопуляционного состава клеток Лейдига у потомства самок крыс «Вистар» экспериментальным сахарным диабетом 1 типа в период новорожденности.

Методика. Исследования выполнены на белых крысах – самках «Вистар» и их потомстве в возрасте 1 сут. У взрослых половозрелых самок моделировали стрептозотоциновый сахарный диабет 1 типа. Изучены морфофункциональные особенности эндокринных клеток семенников у потомства самок крыс с экспериментальным диабетом 1 типа в ранний неонатальный период.

Определяли площадь интерстициальной соединительной ткани семенников, число активных и неактивных эндокриноцитов, вычисляли индекс активности клеток Лейдига, рассчитывали коэффициент, отражающий отношение числа клеток Лейдига к суммарному содержанию сперматогенных клеток, а также коэффициент, отражающий отношение суммарного количества интерстициальных glanduloцитов к содержанию sustentocитов.

Результаты. Показано, что у подопытных крысят снижена абсолютная масса семенника и его весовой индекс, увеличена площадь стромы, изменено количество клеток Лейдига и их субпопуляционный состав и, как следствие, изменен индекс активности этих клеток. Выявлено существенное снижение у подопытных животных отношения числа клеток Лейдига к содержанию клеток Сертоли, между которыми существуют определенные паракрынные взаимоотношения.

Заключение. Выявленные изменения могут являться одной из возможных причин нарушения сперматогенного цикла у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа.

Ключевые слова: сахарный диабет, потомство, семенники, клетки Лейдига, крысы.

Для цитирования: Брюхин Г.В., Антонов С.Д. Характеристика клеток Лейдига у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа в ранний неонатальный период. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 105-109.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.105-109

Для корреспонденции: Антонов Сергей Дмитриевич, e-mail: s.d.antonov@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.06.2019

Bryukhin G.V., Antonov S.D.

Characteristic of leydig cells from newborn offspring of female rats with experimental type 1 diabetes

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

Numerous clinical observations have shown that maternal diabetes adversely affects pregnancy and childbirth as well as the development and condition of the fetus. These women often give birth to children with signs of diabetic fetopathy. However, the effect of type 1 diabetes mellitus on morphology and function of the male offspring reproductive system is still understudied.

The aim of the study was evaluating morpho-functional characteristics of Leydig cells in newborn offspring of female rats with experimental type 1 diabetes.

Methods. Experiments were performed on Wistar female rats and their one-day offspring. Type 1 diabetes mellitus was modelled in adult, sexually mature females using streptozotocin. Morpho-functional features of testicular endocrine cells were studied in the offspring of female rats with experimental type 1 diabetes in the early neonatal period. The following indexes were determined: area of testicular interstitial tissue; number of active and inactive endocrinocytes; Leydig cell activity index; the ratio of Leydig cells number to the total number of spermatogenic cells; and the ratio of total number of interstitial glandulocytes to the number of sustentocytes.

Results. The offspring of experimental rats had a decreased absolute testis weight and testis weight index; an increased area of interstitial tissue; changes in the count of Leydig cells and their subpopulation composition and resultant changes in the Leydig

cell activity index. The ratio of Leydig cell number to Sertoli cell number, which are characterized with paracrine interrelations, was decreased.

Conclusion. The found changes may underlie disorders of the spermatogenic cycle in the offspring of female rats with experimental type 1 diabetes.

Keywords: diabetes; offspring; testes; Leydig cells; rats.

For citation: Bryukhin G.V., Antonov S.D. Characteristic of Leydig cells from newborn offspring of female rats with experimental type 1 diabetes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4):105-109. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.105-109

For correspondence: *Sergei D. Antonov*, aspirant of the Department of Histology, Cytology and Embriology Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "South-Ural State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 64 Vorovskogo Str., Chelyabinsk 454092, e-mail: s.d.antonov@mail.ru

Information about authors:

Bryukhin G.V., <https://orcid.org/0000-0002-3898-766X>

Antonov S.D., <https://orcid.org/0000-0002-3166-5270>

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 12.06.2019

Введение

В настоящее время отмечается рост заболеваемости сахарным диабетом, в том числе среди женщин фертильного возраста [1]. Многочисленные клинические наблюдения подтверждают тот факт, что сахарный диабет матери оказывает неблагоприятное влияние на течение беременности и родов, а также на развитие и состояние плода. У женщин с диабетом часто рождаются дети с признаками диабетической фетопатии. Диабетологи считают, что гипергликемия уже на ранних стадиях беременности обуславливает нарушение формирования органов плода: в 5 раз чаще рождаются дети с пороками сердца, нередко с поражениями почек, мозга и кишечными аномалиями. Кроме того у таких женщин чаще отмечается перинатальная гибель плода [2, 3]. На сегодняшний день недостаточно изучено влияние сахарного диабета 1 типа матери на морфофункциональное становление мужской репродуктивной системы потомства.

Цель исследования – анализ содержания и субпопуляционного состава клеток Лейдига у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа в период новорожденности.

Методика

Работа с лабораторными животными осуществлялась в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986. Эвтаназия животных проводилась методом декапитации под эфирным наркозом. Работа одобрена этическим локальным комитетом.

Исследования проведены на белых лабораторных крысах самках «Вистар» и их потомстве в ранний неонатальный период. У взрослых половозрелых самок воспроизводили стрептозотоциновый сахарный диабет 1 типа [4]. Препарат вводили до беременности трижды с интервалом 7 сут по 20-25 мг/кг массы. За весь курс животные получали по 17 мг стрептозотацина. О развитие сахарного диабета свидетельствовал повышенный уровень содержания глюкозы в крови ($32,56 \pm 2,44$ ммоль/л), сохранявшийся длительное время (более 3 мес). Через 1 нед после последней инъекции самок подсаживали к интактным самцам.

Объектом исследования было потомство самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа в 1-е сут постнатальной жизни. Эту группу составили 12 крысят из 12 пометов, а группу сравнения (контрольная группа) составили 10 новорожденных крысят из 8 пометов. Проводили определение абсолютной и относительной (весовой индекс) массы семенников. На серийных гистологических срезах семенников, окрашенных гематоксилином и эозином, при помощи морфометрической установки МОТИС ВА 400 (Германия) проводили определение площади паренхимы и интерстициальной ткани семенников, производили подсчет суммарного содержания эндокриноцитов, среди которых определяли число активных и неактивных клеток [5]. Клетки Лейдига подсчитывали в 30 полях зрения из расчёта на условную единицу площади (593300 мкм²). Индекс активности клеток Лейдига определяли как отношение суммарного числа активных клеток к неактивным, подсчитанных в 30 полях

зрения [6]. Расчитывали коэффициент (K_1), отражающий отношение числа клеток Лейдига к суммарному содержанию сперматогенных клеток из расчета на один семенной извитой каналец. Кроме того определял коэффициент (K_2), отражающий отношение суммарного количества интерстициальных гландулоцитов к числу sustentocитов [5, 7].

Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica v.6 (Stasoft, Inc.) и представлены в виде медианы с интерквартильным размахом. Учитывая небольшую выборку животных, значимость результатов определяли непараметрическим методом Манна-Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что у подопытных крысят статистически значимо снижалась абсолютная масса семенника (г) и его весового индекса (%) (соответственно 0,004 [0,003–0,005] и 0,052 [0,045–0,055]) по сравнению с контролем (соответственно 0,0065 [0,006–0,008] г и 0,1 [0,09–0,12]). Различия в массе правого и левого семенника отсутствовали. У подопытных животных имело место увеличение площади интерстициальной ткани семенников – 15454 [15147–19120] μm^2 по сравнению с группой контроля 14695 [13382–15240] μm^2 . При этом площадь паренхимы семенника оказалась сниженной 20066 [16400–20373] μm^2 по сравнению с интактной группой 20825 [20280–22138] μm^2 , что обусловило и снижение коэффициента, отражающего отношение площади паренхимы к площади стромы 1,3 [0,86–1,35] по сравнению с контролем 1,42 [1,33–1,65]. Анализ суммарного содержания клеток Лейдига в семеннике подопытных крысят не выявил статистически значимого снижения исследуемого показателя (таблица).

Наибольший интерес представляет цитологический анализ эндокриноцитов. Как видно из таблицы,

у подопытных животных имеет место изменение субпопуляционного состава эндокриноцитов: снижение содержания активных клеток Лейдига при увеличении числа неактивных клеток, что обусловило снижение индекса активности клеток Лейдига. Увеличивался коэффициент (K_1), отражающий отношение суммарного содержания клеток Лейдига к общему числу сперматогенных клеток из расчета на один семенной извитой каналец.

Учитывая, что между эндокриноцитами и sustentocитами существуют выраженные паракринные взаимоотношения [8, 9], особый интерес представляет коэффициент, отражающий отношение суммарного количества клеток Лейдига к числу клеток Сертоли из расчета на один семенной извитой каналец (K_2). Прежде всего, необходимо отметить, что содержание клеток Сертоли в семенниках крысят обеих экспериментальных групп практически не отличалось и у подопытных животных составило 4,2 [3,7–4,4], а в группе сравнения 4,1 [4,0–4,2] на один извитой семенной каналец. Как видно из таблицы, исследуемый коэффициент у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа оказался существенно сниженным по сравнению с группой контроля.

Таким образом, у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа имеет место снижение в семенниках содержания эндокриноцитов, продуцирующих тестостерон, необходимый для нормального сперматогенеза. Эти данные согласуются с результатами, указывающими на снижение фракции активных клеток Лейдига за счет увеличения числа неактивных эндокриноцитов. Обращает на себя внимание и существенное снижение у подопытных животных коэффициента, отражающего отношение суммарного содержания клеток Лейдига к числу клеток Сертоли, между которыми существуют выраженные паракринные взаимоотношения [10]. Исходя из выше-

Таблица

Характеристика клеток Лейдига экспериментальных животных, Me [Q₁ – Q₃].

Экспериментальная группа	Сперматогенные клетки	Клетки Лейдига	Активные клетки Лейдига	Неактивные клетки Лейдига	Индекс активности	K1	K2
Контроль	10,1 [9,9 – 11,7]	34,3 [33,8 – 36,7]	11,4 [10,0 – 12,1]	23,87 [23,7 – 23,9]	0,49 [0,42 – 0,5]	3,42 [2,93 – 3,72]	8,36 [8,15 – 9,0]
			33,1 [29,4 – 33,3] %	67,0 [66,7 – 70,6] %			
Опыт	7,7 [7,2 – 8,1]*	34,0 [32,3 – 34,3]	8,9 [7,4 – 9,3]*	25,0 [24,9 – 25,2]*	0,35 [0,3 – 0,37]*	4,44 [4,0 – 4,49]*	7,97 [7,84 – 8,62]*
			26,0 [23,0 – 27,2] %*	74,0 [72,8 – 77,0] %*			

Примечание. * – результаты статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$).

изложенного, можно предположить, что выявленные нарушения соотношения между клетками Лейдига и sustentocитами в перспективе могут стать одной из возможных причин изменения сперматогенного цикла у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Логично предположить, что выявленные изменения морфофункционального состояния клеток Лейдига семенников потомства самок крыс первоначально обусловлены, прежде всего, гипергликемией, которой отводится иницирующая роль в развитии осложнений сахарного диабета. Согласно данной литературы, при гипергликемии матери, глюкоза в избытке попадает через плаценту в кровь плода [11], вызывает гиперплазию бета-клеток островков Лангерганса. Развивающийся гиперинсулинизм плода, в конечном итоге, приводит к развитию гипогликемии, являющейся одним из наиболее серьезных осложнений антенатального периода. Кроме того, известно, что сахарный диабет сопровождается накоплением в организме матери кетоновых тел, которые свободно проходят через плацентарный барьер. Можно предположить, что именно гипогликемия и гиперкетонемия нарушают условия антенатального развития и могут явиться основными патогенетическими факторами нарушения процессов гистогенеза, в том числе пролиферации и дифференцировки тканевых элементов семенников у потомства.

Заключение

Полученные результаты научно обосновывают вероятность нарушения мужской репродуктивной функции у потомства матерей с сахарным диабетом. В связи с этим представляется чрезвычайно перспективным проведение дальнейших исследований особенностей морфофункционального становления генеративной и эндокринной функции яичек у потомства от матерей с сахарным диабетом в условиях клиники и эксперимента. Эти данные могут быть использованы при разработке мер профилактики и оптимизации методов лечения дисфункции мужской репродуктивной системы пациентов.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Брюхин Г.В.

Сбор и обработка материала — Брюхин Г.В., Антонов С.Д.

Статистическая обработка — Брюхин Г.В., Антонов С.Д.

Написание текста — Брюхин Г.В., Антонов С.Д.

Редактирование — Брюхин Г.В.

Литература

1. Кожевникова С.А., Будневский А.В., Овсянников Е.С., Малыш Е.Ю., Белов В.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких и сахарный диабет: взгляд на эпидемиологию, патогенетические механизмы, лечение. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 4: 122-7.
2. Питер-Хармел Э., Матур Р. *Сахарный диабет: диагностика и лечение*. М.; Практика; 2008.
3. Шестакова М.В., Северина А.С., Дедов И.И. *Гипергликемия как фактор риска сосудистых осложнений диабета. В кн.: Сахарный диабет: острые и хронические осложнения*. М.; ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2011: 59-81.
4. Закирьянов А.Р., Плахотный М.А., Онищенко Н.А., Володина А.В., Клименко Е.Д., Кобозева Л.П. и др. Диабетические осложнения у крыс при длительных сроках моделирования сахарного диабета 1-го типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2007; 4: 21-5.
5. Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1983; 3: 66-72.
6. Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л. Характеристика клеток Лейдига у новорожденного потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 1: 80-3.
7. Иванов Ю.В. Цитологические критерии состояния сперматогенеза в токсиколого-гигиенических исследованиях. *Гигиена и санитария*. 1986; 4: 52-4.
8. Шевлюк Н.Н., Стадников А.А. *Клетки Лейдига семенников позвоночных (онтогенез, ультраструктура, цитофизиология, факторы и механизмы регуляции)*. Оренбург; издательство ОрГМА; 2010.
9. Дедов В.И. Ультраструктура клеток Сертоли и Лейдига у крыс в норме и в условиях длительного внутреннего облучения. *Цитология*. 1980; 10: 1153-6.
10. Захидов С.Т., Маршак Т.Л. Экспериментальные доказательства пролиферации и размножения высокодифференцированных клеток Сертоли. *Известия РАН. Серия биологическая*. 2015; 4: 350-60.
11. Капустин Р.В., Оноприйчук А.Р., Аржанова О.Н. Патология плаценты и плода при сахарном диабете. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2018; 67 (6): 79-92.

References

1. Kozhevnikova S.A., Budnevskiy A.V., Ovsyannikov E.S., Malyshev E.Yu., Belov V.N. Chronic obstructive pulmonary disease and diabetes: a look at the epidemiology, pathogenesis mechanisms, treatment. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 4: 122-7. (in Russian)
2. Piter-Kharmel E., Matur R. *Diabetes mellitus: diagnosis and treatment. [Sakharnyy diabet: diagnostika i lechenie]*. Moscow: Praktika; 2008. (in Russian)
3. Shestakova M.V., Severina A.S., Dedov I.I. *Hyperglycemia as a risk factor for vascular complications of diabetes. In.: Diabetes mellitus: acute and chronic complications. [Sakharnyy diabet: ostrye i khronicheskie oslozheniya]*. Moscow; ООО «Izdatel'stvo «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo»; 2011: 59-81. (in Russian)
4. Zakirianov A.R., Plakhotnyy M.A., Onischenko N.A., Volodina A.V., Klimenko E.D., Kobozeva L.P. et al. Diabetic complications in rats in long-term modeling of type I diabetes. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2007; 4: 21-5. (in Russian)

5. Ukhov Yu.I., Astrakhantsev A.F. Morphometric methods in assessing the functional state of the testes. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*. 1983; 3: 66-72. (in Russian)
6. Bryukhin G.V., Sizonenko M.L. Characteristics of Leydig cells in the newborn posterity of female rats with chronic injury of the hepatobiliary system of various genesis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2015; 1: 80-3. (in Russian)
7. Ivanov Yu.V. Cytological criteria for spermatogenesis in toxicological and hygienic studies. *Gigiena i sanitariya*. 1986; 4: 52-4. (in Russian)
8. Shevlyuk N.N., Stadnikov A.A. *Leydig cells of the testicles of vertebrates (ontogenesis, ultrastructure, cytophysiology, factors and mechanisms of regulation)*. [Kletki Leydiga semennikov pozvonochnykh (ontogenez, ul'trastruktura, tsitofiziologiya, faktory i mekhanizmy regulyatsii)]. Orenburg: Izdatel'stvo OrGMA; 2010. (in Russian)
9. Dedov V.I. Ultrastructure of Sertoli and Leydig cells in rats under normal conditions and prolonged internal irradiation *Tsitologiya*. 1980; 10: 1153-6. (in Russian)
10. Zakhidov S.T., Marshak T.L. Experimental evidence of proliferation and reproduction of Sertoli high differentiation cells. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya*. 2015; 4: 350-60. (in Russian)
11. Kapustin R.V., Onopriyuchuk A.R., Arzhanova O.N. Pathophysiology of the placenta and fetus in diabetes mellitus. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2018; 67 (6): 79-92. (in Russian)

Сведения об авторах:

Брюхин Геннадий Васильевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральского государственного медицинского университета» Минздрава России, e-mail: bgenvas@mail.ru

Антонов Сергей Дмитриевич, соискатель каф. гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральского государственного медицинского университета» Минздрава России, e-mail: s.d.antonov@mail.ru

© Коллектив авторов, 2019
удк 617.753.2

Казимирский А.Н.¹, Салмаси Ж.М.¹, Хамнагдаева Н.В.^{1,2}, Обрубов С.А.¹, Семенова Л.Ю.¹, Порядин Г.В.¹

Нарушение метаболизма ретинола – важное патогенетическое звено формирования осевой близорукости

¹ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

²ФГБУ «Центральная клиническая больница» Управления делами Президента Российской Федерации, 121359, г. Москва, Россия, ул. Маршала Тимошенко д. 15

Цель исследования – определение изменений в экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов, содержание малонового диальдегида и витамина А в периферической крови у пациентов с миопией по сравнению со здоровыми донорами и построение модели патогенеза.

Методы. В исследовании приняли участие 38 детей с приобретенной близорукостью средней степени и отсутствием сопутствующих хронических заболеваний, 35 детей составили группу контроля. Возраст детей варьировал от 11 до 17 лет. Методом непрямой иммунофлюоресценции используя моноклональные антитела определяли количество лимфоцитов экспрессирующих CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD20, CD72, CD38, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, CD54, а также мембранные иммуноглобулины mIgM и mIgG. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) в крови и витамина А в плазме крови определяли традиционными биохимическими методами.

Результаты. У пациентов с миопией обнаружено увеличение числа CD20, CD54 и CD95 позитивных лимфоцитов. Выявленные нарушения со стороны иммунной системы носят вторичный характер. Уровень малонового диальдегида в крови у больных миопией был повышен, а витамина А снижен по сравнению с контролем. На основе этих данных предложена модель патогенеза, в которой центральное место занимает нарушение процесса физиологической регенерации фоторецепторных дисков. Замедленное поглощение клетками пигментного эпителия и ослабление процесса внутриклеточного гидролиза их компонентов вызывают активацию перекисного окисления липидов, образование малонового диальдегида, повреждение сосудистого эндотелия и фибробластов склеры. Процесс ремоделирования фибробластов лимитирован метаболитами, поступающими через поврежденный эндотелий, что приводит к синтезу непрочного коллагена V типа с короткими цепями. Увеличение осевых размеров глаза при миопии – это растяжение и ослабление склеры глаза, связанное с развитием в соединительной ткани дистрофического процесса.

Заключение. Патогенетически обоснованная терапия миопии должна быть направлена на увеличение функциональной активности клеток пигментного эпителия.

Ключевые слова: миопия; патогенез; CD20; CD54; CD95; ПОЛ; МДА.

Для цитирования: Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Хамнагдаева Н.В., Обрубов С.А., Семенова Л.Ю., Порядин Г.В. Нарушение метаболизма ретинола – важное патогенетическое звено формирования осевой близорукости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 110-114.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.110-114

Для корреспонденции: Казимирский А.Н., e-mail: alnica10@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.01.2019

Kazimirsky A.N.¹, Salmasi J.M.¹, Khamnagdayeva N.V.^{1,2}, Obrubov S.A.¹, Semenova L.Yu.¹, Poryadin G.V.¹

Disorders in retinol metabolism as an important part in the pathogenesis of myopia

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanova Str. 1, Moscow, 117997, Russian Federation;

²The Central Clinical Hospital of the Presidential Administration

Aim. Determination of changes in expression of lymphocyte surface receptors and concentrations of malonic dialdehyde and vitamin A in peripheral blood of patients with myopia as compared to healthy donors, and creation of a pathogenetic model.

Methods. This study included 38 children with acquired moderate myopia without concurrent chronic diseases; 35 children constituted a control group. The children were 11 to 17 years old. The amount of lymphocytes expressing CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD20, CD72, CD38, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, CD54, and membrane immunoglobulins mIgM and mIgG was determined

using the indirect immunofluorescence method with monoclonal antibodies. Concentrations of malonic dialdehyde (MDA) in blood and vitamin A in plasma were measured by traditional biochemical methods.

Results. Patients with myopia had increased amounts of CD20-, CD54-, and CD95-positive lymphocytes. The observed immune disorders were secondary. The blood concentration of MDA was increased, and the vitamin A concentration was decreased in myopia patients compared to the control. Based on these data a pathogenetic model was proposed, in which disordered physiological regeneration of photoreceptor disks took the central place. The delayed absorption of pigment epithelial cells and impaired intracellular hydrolysis of their components result in activation of lipid peroxidation, formation of MDA, and damages of the vascular endothelium and scleral fibroblasts. The process of fibroblast remodeling is limited by influx of metabolites through the damaged endothelium, which induces synthesis of weak type V collagen with short chains. Pathogenetically substantiated therapy of myopia should be aimed at increasing the functional activity of pigment epithelial cells.

Keywords: myopia; pathogenesis; CD20; CD54; CD95; ROS; MDA.

For citation: Kazimirsky A.N., Salmasi J.M., Khamnagdayeva N.V., Obrubov S.A., Semenova L.Yu., Poryadin G.V. Disorders in retinol metabolism as an important part in the pathogenesis of myopia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 110-114. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.110-114

For correspondens: *Kazimirskiy Alexander N.*, PhD, professor, Leading Researcher of the Molecular Technology department of Research institute of Translational medicine of Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Ostrovityanova st.1. E-mail: alnica10@mail.ru

Information about authors:

Kazimirsky A.N., <http://orcid.org/0000-0002-3079-4089>

Salmasi J.M., <http://orcid.org/0000-0001-8524-0019>

Khamnagdayeva N.V., <http://orcid.org/0000-0003-1167-9226>

Obrubov S.A., <https://orcid.org/0000-0003-0287-3123>

Semenova L.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-1000-0453>

Poryadin G.V., <https://orcid.org/0000-0003-2010-3296>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 23.01.2019

Введение

Масштабы распространения близорукости можно охарактеризовать как глобальную эпидемию. В настоящее время доля населения с миопией в азиатских странах достигает 80% и 40% – в западных странах [1]. В последнее время наблюдается значительный прирост близорукости у детей и подростков [2].

Методика

В исследовании приняли участие 38 детей с приобретенной близорукостью средней степени и отсутствием сопутствующих хронических заболеваний, 35 детей составили группу контроля. Возраст детей варьировал от 11 до 17 лет.

Оценку относительного и абсолютного содержания в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD20, CD72, CD38, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, CD54 и мембранные иммуноглобулины mIgM и mIgG проводили методом непрямой иммунофлюоресценции с помощью моноклональных антител (ИКО).

Уровень ретинола в крови определяли спектрофотометрически по методу Бессей [3]. Определение ма-

лонового диальдегида (МДА) в крови проводили с использованием тиобарбитуровой кислоты.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал, что у детей с близорукостью отмечалось статистически значимое ($p < 0,05$) повышение количества лимфоцитов, экспрессирующих CD20⁺, CD95⁺ и ICAM-1(CD54⁺).

Результаты проведенного исследования показали отсутствие статистически значимых изменений в количестве Т-лимфоцитов и НК-клеток в периферической крови по сравнению с соответствующими параметрами здоровых детей.

Исследование В-лимфоцитов и их субпопуляций показало неоднозначность их изменения. Так отсутствовали различия в содержании В-лимфоцитов, несущих поверхностный IgG (mIgG⁺-клетки), IgM (mIgM⁺-клетки), CD38⁺ лимфоциты (предшественники плазматических клеток), а также CD72⁺-клетки (зрелые В-лимфоциты, способные развивать синтез иммуноглобулинов). Вместе с тем общее количество В-лимфоцитов (CD20⁺-клетки) в периферической крови было стати-

стически значимо выше ($28,03 \pm 1,90\%$) у пациентов с миопией по сравнению с контролем ($20,48 \pm 1,63\%$). Увеличение числа только В-лимфоцитов может объяснено их пролиферацией в ответ на активационные сигналы, под действие которых попадают эти лимфоидные клетки. К сигналам активации для В-лимфоцитов, не зависящим от антигенной презентации и активационного процесса в лимфоцитах, относятся растворимая форма рецептора CD100 (sCD100), малоновый диальдегид (МДА) и аргиназа [4].

Вероятным механизмом увеличения численности В-лимфоцитов периферической крови при миопии является воздействие на В-клетки одновременно двух стимулирующих рост сигналов – sCD100, который отделяется от поверхности тромбоцитов или Т-лимфоцитов после их взаимодействия с поврежденным эндотелием сосудов сетчатки и МДА, который вызывает в хелперно-индукторных Т-лимфоцитах (Th17-клетки) синтез и секрецию IL-25 активатора пролиферации В-лимфоцитов [4]. Имеются данные по инициации тканевого повреждения под действием sCD100. Так, у пациентов с ревматоидным артритом sCD100 индуцирует образование TNF α и образование IL-6 в CD14⁺-клетках, что вызывает активацию металлопротеиназ и развитие тканевого повреждения [5].

Исследование ранних (CD25 и CD71) и поздних (HLA-DR) активационных антигенов лимфоцитов показывает отсутствие активационного процесса в лимфоцитах периферической крови пациентов с миопией, что свидетельствует об отсутствии процессов антигенной презентации. Вместе с тем было статистически значимо повышено число клеток экспрессирующих рецепторы запуска активационного апоптоза (CD95⁺-лимфоциты) с $15,13 \pm 1,40\%$ в контроле до $20,30 \pm 1,80\%$ у пациентов с миопией, а также рецептора межклеточной коммуникации и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов ICAM-1 (CD54). Количество ICAM-1⁺-лимфоцитов возрастает вдвое – с $12,96 \pm 1,50\%$ у здоровых детей до $23,59 \pm 1,65\%$ у пациентов с миопией.

Увеличение количества ICAM-1⁺-лимфоцитов обнаруживается при воспалительных заболеваниях различного происхождения, что достаточно полно отражено в соответствующей литературе. При заболеваниях невоспалительной природы ICAM-1⁺-лимфоциты практически не исследованы. Вместе с тем, немногочисленные исследования показывают увеличение экспрессии этого рецептора на лимфоцитах и эндотелиальных клетках, что отражает процесс ослабления генерации оксида азота и развитие эндотелиальной дисфункции [6].

Увеличение числа CD95⁺-лимфоцитов в периферической крови пациентов с миопией не сопровождается соответствующим увеличением экспрессии акти-

вационных дифференцировочных рецепторов (CD25, CD71 и HLA-DR), как это наблюдается при воспалительных заболеваниях различного генеза [7]. Полученные результаты указывают на то, что увеличение количества лимфоцитов, несущих поверхностный рецептор запуска апоптоза CD95 не связано с активационным процессом в лимфоцитах. Анализ данных иммунологического исследования косвенно показывает, что миопия не является заболеванием воспалительной природы, которое сопровождается повреждением сосудистого эндотелия и активацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Исследование биохимических параметров больных миопией показало, что концентрация МДА – конечного продукта ПОЛ в крови пациентов с миопией увеличивается и составляет $2,96 \pm 0,12$ мкМ, вдвое превышая контрольный уровень, наблюдаемый у здоровых детей ($1,48 \pm 0,09$ мкМ). Эти результаты подтверждаются данными исследования [8], где демонстрируется зависимость увеличения концентрации МДА в крови от степени миопии. Повышение концентрации МДА в крови пациентов с миопией подтверждает усиление окислительных процессов и, в частности, активацию ПОЛ при этом заболевании. В исследованной группе больных миопией обнаружено снижение концентрации витамина А в плазме крови – $0,95 \pm 0,04$ мкМ при $1,43 \pm 0,04$ мкМ в контроле у здоровых детей. Снижение концентрации витамина А отражает его окисление и превращение в транс-ретиновую кислоту. Увеличение концентрации транс-ретиновой кислоты при миопии наблюдали и другие исследователи [9]. Получены также данные о том, что введение транс-ретиновой кислоты животным в условиях хронического эксперимента вызывает развитие миопии [10].

Продолжительное воздействие транс-ретиновой кислоты в культуре клеток пигментного эпителия кролика (ARPE-19) ингибирует развитие и значительно снижает выживаемость клеток, увеличивает экспрессию MMP-2 [11], а также индуцирует однопочечные разрывы в ДНК и увеличивает избыточную экспрессию маркеров пролиферации МК167 и неоваскуляризации VEGF-A [12].

Полученные результаты согласуются с данными других исследований и позволяют нам сформулировать модель патогенеза, в которой главным иницирующим фактором патогенеза является нарушение процесса поглощения и внутриклеточной деградации дистальных фрагментов фоторецепторных клеток в пигментном эпителии. Замедление поглощения дистальных фрагментов фоторецепторных клеток ведет к активации окислительных процессов, что объясняет снижение концентрации витамина А и рост концен-

трации транс-ретиноевой кислоты, которая образуется из витамина А при его спонтанном окислении. Активация ПОЛ повышает концентрацию МДА, который, действуя продолжительное время, оказывает повреждающее воздействие на клетки сосудистого эндотелия, фоторецепторного слоя сетчатки и фибробласты склеры. Увеличение осевых размеров глаза при миопии — растяжение и ослабление склеры глаза, связанные с развитием в соединительной ткани дистрофического процесса. Ремоделирование соединительной ткани склеры развивается на фоне ослабленного переноса необходимых метаболитов через поврежденный эндотелий, что провоцирует синтез непрочного коллагена V типа с короткими цепями.

Выявленные изменения со стороны иммунной системы при миопии являются вторичными и связаны, по-видимому, с нарушением метаболизма ретинола.

По нашему мнению, патогенетически обоснованная терапия миопии должна быть направлена на увеличение функциональной активности клеток пигментного эпителия для создания оптимальных условий функционирования фоторецепторных клеток.

Литература

1. Morgan I.G., French A.N., Ashby R.S., Guo X., Ding X., He M., Rose K.A. The epidemics of myopia: Aetiology and prevention. *Prog Retin Eye Res.* 2018; 62: 134-49. doi: 10.1016/j.preteyeres.2017.09.004.
2. Обрубов С.А., Хамнагдаева Н.В., Семенова Л.Ю., Порядин Г.В., Салмаси Ж.М. Экспериментальные модели осевой близорукости. Подходы к изучению механизмов развития. *Российская детская офтальмология.* 2015; 2: 58-66.
3. Bessey O.A. Lowry O.H. The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J. Biol. Chem.* 1946; 166(1): 177-88.
4. Казимирский А.Н., Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Семенова Л.Ю. Эндогенные регуляторы иммунной системы (sCD100, малоновый диальдегид, аргиназа). *Бюл. exper. биол. и мед.* 2017; 164(11): 652-60.
5. Yoshida Y., Ogata A., Kang S., Ebina K., Shi K., Nojima S., et al. Semaphorin 4D contributes to rheumatoid arthritis by inducing inflammatory cytokine production: pathogenic and therapeutic implications. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67(6): 1481-90.
6. Carreau A., Kieda C., Grillon C. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Exp Cell Res.* 2011; 317(1): 29-41.
7. Порядин Г.В., Оршанко А.М., Салмаси Ж.М., Латышева Т.В., Казимирский А.Н. Активационные процессы в лимфоцитах пациентов с латентной сенсibilizацией. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2009; 1: 23-4.
8. Матвеев А.В., Гусева М.Р., Маркова Е.Ю., Ульшина Л.В., Кузнецова Ю.Д. Коррекция оксидативного стресса и гемодинамических изменений при миопии и нарушениях аккомодации у детей. *Российская педиатрическая офтальмология.* 2012; 1: 25-8.
9. Обрубов С.А., Румянцев А.Г., Демидова М.Ю., Беспалюк Ю.Г., Бограш Г.И., Иванова А.О., Кузнецова Е.А. Частота близорукости и структура сочетанной с ней экстраокулярной патоло-

гии у детей общеобразовательного учреждения. *Российская педиатрическая офтальмология.* 2008; 4: 5-7.

10. Хамнагдаева Н.В., Обрубов С.А., Семенова Л.Ю., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Казимирский А.Н., Кузнецова Ю.Д. Влияние All-trans ретиноевой кислоты на культуру склеральных фибробластов кролика. *Российская детская офтальмология.* 2016; 3: 18-23.
11. Xing B. Function of all-trans retinoic acid observation on similar myopia changes in cultivated rabbit retinal pigment epithelium and relation with myopia relevant factors. *Pak J Pharm Sci.* 2016; 29(2): 731-35.
12. Tokarz P., Piastowska-Ciesielska A.W., Kaamiranta K., Blasiak J. All-Trans Retinoic Acid Modulates DNA Damage Response and the Expression of the VEGF-A and MKI67 Genes in ARPE-19 Cells Subjected to Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(6) E898. doi: 10.3390/ijms17060898.

References

1. Morgan I.G., French A.N., Ashby R.S., Guo X., Ding X., He M., Rose K.A. The epidemics of myopia: Aetiology and prevention. *Prog Retin Eye Res.* 2018; 62: 134-49. doi: 10.1016/j.preteyeres.2017.09.004.
2. Obrubov S.A., Khamnagdaeva N.V., Semenova L.Yu., Poryadin G.V., Salmasi J.M. Experimental models of axial myopia. Approaches to the study of development mechanisms. *Rossiyskaya detskaya oftal'mologiya* 2015; (2): 58-66. (in Russian)
3. Bessey O.A. Lowry O.H. The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J. Biol. Chem.* 1946; 166(1): 177-88.
4. Kazimirsky A.N., Poryadin G.V., Salmasi J.M., Semenova L.Yu. Endogenous regulators of the immune system (sCD100, Malonaldehyde, arginase). *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2017; 164(11): 652-60. (in Russian)
5. Yoshida Y., Ogata A., Kang S., Ebina K., Shi K., Nojima S., et al. Semaphorin 4D contributes to rheumatoid arthritis by inducing inflammatory cytokine production: pathogenic and therapeutic implications. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67 (6): 1481-90.
6. Carreau A., Kieda C., Grillon C. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Exp Cell Res.* 2011; 317(1): 29-41.
7. Poryadin G.V., Orshanko A.M., Salmasi J.M., Latsysheva T.V., Kazimirsky A.N. Activation processes in lymphocytes of patients with latent sensitization. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2009; (1): 23-4. (in Russian)
8. Matveev A.V., Guseva M.R., Markova E.Y., Ul'shina L.V., Kuznetsova Y.D. Correction of oxidative stress and hemodynamic changes in myopia and accommodation disorders in children. *Rossiyskaya pediatricheskaya oftal'mologiya.* 2012; (1): 25-8. (in Russian)
9. Obrubov S.A., Rumyantsev A.G., Demidova M.Y., Bepalyuk Y.G., Bogrash G.I., Ivanova A.O., Kuznetsova E.A. The frequency of myopia and the structure of combined extraocular pathology in children of General education institutions. *Rossiyskaya pediatricheskaya oftal'mologiya.* 2008; (4): 5-7. (in Russian)
10. Khamnagdaeva N.V., Obrubov S.A., Semenova L.Yu., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Kazimirsky A.N., Kuznetsova Yu.D. Effect of all-trans retinoic acid on rabbit scleral fibroblast culture. *Rossiyskaya detskaya oftal'mologiya.* 2016; (3): 18-23. (in Russian)
11. Xing B. Function of all-trans retinoic acid observation on similar myopia changes in cultivated rabbit retinal pigment epithelium and relation with myopia relevant factors. *Pak J Pharm Sci.* 2016; 29(2): 731-35.
12. Tokarz P., Piastowska-Ciesielska A.W., Kaamiranta K., Blasiak J. All-Trans Retinoic Acid Modulates DNA Damage Response and the Expression of the VEGF-A and MKI67 Genes in ARPE-19 Cells Subjected to Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(6) E898. doi: 10.3390/ijms17060898.

Сведения об авторах:

Казимирский Александр Николаевич, доктор биол. наук, доцент, вед. науч. сотр. отдела молекулярных технологий «НИИ трансляционной медицины» ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, e-mail: alnica10@mail.ru;

Салмаси Жан Мустафевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, e-mail: Profjms@yandex.ru;

Хамнагаева Надежда Вениаминовна, канд. мед. наук, ст. преподаватель каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России; ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ, e-mail: Lyssa_ash@mail.ru;

Обрубов С.А., доктор мед. наук, проф., каф. офтальмологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, e-mail: Obrubovs@yandex.ru;

Семенова Л.Ю., доктор мед. наук, доцент, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, e-mail: Semenovaly@mail.ru;

Порядин Г.В., доктор мед. наук, член-корр. РАН, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092:612.273.2:612.223.11-092.4

Трегуб П.П.^{1,2*}, Куликов В.П.¹, Малиновская Н.А.², Кузовков Д.А.², Ковзелев П.Д.³

HIF-1 – альтернативные сигнальные механизмы активации и формирования толерантности к гипоксии/ишемии

¹ООО «Алтайский медицинский институт последипломного образования». г. Барнаул, Россия;

²ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

Альтернативные сигнальные механизмы активации транскрипционного фактора HIF-1 принципиально можно подразделить на 3 типа: связанные с ингибированием пролилгидроксилаз и ограничением деградации HIF-1 α ; связанные с индукцией HIF-1 α ; связанные с активацией HIF-1 α . Особый практический интерес представляет активация фактора HIF-1 во время гиперкапнии, которая часто сопутствует гипоксии. Пермиссивная гиперкапния вызывает повышение концентрации HIF-1 α в ткани головного мозга и потенцирует активацию HIF-1 α , что выражается в повышении содержания HIF-1 α в гиппокампальных нейронах CA1 региона после гиперкапнически-гипоксического воздействия. При изолированном применении гипоксии аналогичный эффект отсутствует. Перспективным для разработки методов повышения толерантности органов и тканей к гипоксии/ишемии является комбинирование средств, повышающих активность HIF-1, с респираторными гиперкапнически-гипоксическими тренировками и препаратами, влияющими на другие адаптогенные механизмы.

Ключевые слова: HIF-1 α ; сигнальные механизмы; нейропротекция; гипоксия; гиперкапния.

Для цитирования: Трегуб П.П., Куликов В.П., Малиновская Н.А., Кузовков Д.А., Ковзелев П.Д. HIF-1 – Альтернативные сигнальные механизмы активации и формирования толерантности к гипоксии/ишемии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(4): 115-122 .

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.115-122

Для корреспонденции: Трегуб Павел Павлович, e-mail: pfiza_asmu@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-75-00016)

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.03.2019

Tregub P.P.^{1,2}, Kulikov V.P.¹, Malinovskaya N.A.², Kuzovkov D.A.², Kovzelev P.D.³

Hif-1 – alternative signal pathways of activation and formation of tolerance to hypoxia/ischemia

¹LLC «Altai Medical Institute of Postgraduate Education»,
Polzunova st. 34a, 656043, Barnaul, Russia;

²«Professor VF Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University» of the Ministry of Health of Russia,
Partizan Zheleznyak st. 1, 660022, Krasnoyarsk, Russia;

³«National Medical Research Center named after V.A. Almazov» of the Ministry of Health of Russia, Akkuratova st. 2, 197341, St. Petersburg, Russia

Along with the classical oxygen-dependent mechanism of activation of the transcription factor HIF-1, there are alternative signaling mechanisms of this process. These mechanisms can be fundamentally divided into the following types: associated with the inhibition of prolyl hydroxylases and limiting the degradation of HIF-1 α (iron chelators, NO, succinate, inhibitors of lysosomal degradation); associated with the induction of HIF-1 α (TNF α , IL-1, angiotensin); associated with the activation of HIF-1 α (MAPK, PI3K). Of particular practical interest is the activation of HIF-1 factor when exposed to CO₂ during hypercapnia, which is often associated with hypoxia. Permissive hypercapnia causes an increase in the concentration of HIF-1 α in brain tissue at an equivalent level of hypoxia, and also potentiates the effectiveness of hypoxia in relation to HIF-1 α activation, which is expressed in an increase in the content of HIF-1 α in hippocampal neurons of the CA1 region after hypercapnic-hypoxic exposure, on the absence of a similar effect with the isolated use of hypoxia. Promising for the development of methods to increase the tolerance of organs and tissues to hypoxia / ischemia is a combination of agents that increase the activity of HIF-1, with respiratory hypercapnic-hypoxic training and drugs that affect other adaptogenic mechanisms (A1-adenosine receptors, mitok⁺_{АТР}-channels, opioid receptors).

Keywords: HIF-1 α ; signaling pathways; neuroprotection; hypoxia; hypercapnia.

For citation: Tregub P.P., Kulikov V.P., Malinovskaya N.A., Kuzovkov D.A., Kovzelev P.D. HIF-1 – Alternative signals pathways of activation and formation of tolerance to hypoxia/ischemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental`naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 115-122. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.115-122

For correspondence: Pavel P. Tregub, PhD, Principal Reseacher, Scientific Research Institution of molecular medicine and pathobiochemistry; Partizan Zheleznyak st. 1, 660022, Krasnoyarsk, Russian Federation, e-mail: pfiza_asmu@mail.ru

Information about authors:

Tregub P.P., <https://orcid.org/0000-0002-3650-6121>

Kulikov V.P., <https://orcid.org/0000-0003-4869-5465>

Malinovskaya N.A., <https://orcid.org/0000-0002-0033-3804>

Kuzovkov D.A., <https://orcid.org/0000-0002-3981-3354>

Kovzelev P.D. <https://orcid.org/0000-0003-1430-3195>

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

Acknowledgments. The study was carried out with a grant from the Russian Science Foundation (project No. 18-75-00016)

Received 20.03.2019

В последние десятилетия возрастает интерес к изучению биологических эффектов молекулы HIF-1 α (фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа). Такое внимание, главным образом, обусловлено его ключевой ролью в механизме клеточной и тканевой адаптации к дефициту кислорода и ишемии, чему посвящен ряд работ авторитетных ученых [1-5].

Однако, несмотря на традиционные представления о природе сигнального механизма HIF-1 α , базирующегося на кислород-дефицитной аккумуляции, появилась информация об альтернативных механизмах его активации. Эти данные представляют интерес для пересмотра отношения к этому транскрипционному фактору, который регулируется не только гипоксическим стимулом, но и может выступать в качестве мишени для потенцирования защитных эффектов от некоторых адаптогенных триггеров. Это открывает целый ряд перспектив для разработки новых методов и средств повышения толерантности органов и тканей к ишемии.

Биологическая роль транскрипционного фактора HIF-1. HIF-1 α – белок, являющийся α -субъединицей гетеродимерного транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией 1 (HIF-1). Концентрация и стабильность HIF-1 α , его локализация в клетке, а также активность транскрипции прямо зависят от клеточного уровня кислорода [4]. Необходимо подчеркнуть, что во многих работах при обсуждении эффектов и молекулярных механизмов фактора HIF-1, состоящего из α - и β -субъединиц, исследователи часто отождествляют с ним именно α -субъединицу, которая опосредует большую часть эффектов HIF-1.

Фактор HIF-1 играет важную роль в клеточном ответе на изменение кислородного гомеостаза у млекопитающих [2, 6]. Основной функцией этого белка является индукция транскрипции генов, регулирующих кислородное обеспечение клеток и повышающих их толерантность к гипоксии/ишемии [2, 4]. Число обнаруженных генов-мишеней, активируемых HIF-1, продолжает увеличиваться и включает в себя гены, уча-

ствующие в ангиогенезе [7-9], энергетическом метаболизме [3, 9, 10, 11], эритропоэзе [12, 13], клеточной пролиферации [14-16], ремоделировании сосудов и вазомоторных реакциях [17, 18].

Отдельного внимания заслуживает факт сверхэкспрессии HIF-1 в процессе канцерогенеза многих опухолей [19], как по гипоксически-зависимому пути [20], так и по пути не связанному с дефицитом кислорода [21]. В частности, при мутации гена-супрессора белка фон Гиппеля-Линдау (vHL) в клетках почечной карциномы происходит повышение экспрессии HIF-1 α и HIF-2 α .

Кроме того, активированный HIF-1 оказывает провоспалительное и антимикробное действие, посредством модуляции клеточного иммунного ответа [22, 23], проявляет проапоптотические эффекты, специфичные для определенного типа клеток [24-26] и регулирует эмбриональное развитие через повышение экспрессии VEGF [7, 9].

Классический сигнальный путь ответа на гипоксию, опосредованный HIF-1 α . При нормоксии Fe²⁺-содержащие пролил-гидроксилазы подвергают субъединицу HIF-1 α гидроксильрованию. Затем белок vHL связывается с комплексом HIF-1 α -OH, а после убиквитинирования, HIF-1 α подвергается протеасомной деградации [27, 28].

При развитии внутриклеточной гипоксии пролил-гидроксилазы теряют свою активность, что нарушает процесс убиквитин-протеазного разрушения альфа-субъединицы HIF-1 в vHL-опосредованном пути и вызывает аккумуляцию HIF-1 α с последующим его проникновением через нуклеарную мембрану. В ядре альфа-субъединица связывается с бета-субъединицей и приобретает транскрипционную активность в комплексе с коактиватором СВР/p300 [29]. Этот комплекс связывается с элементами ответа на гипоксию (HRE) нескольких генов и индуцирует транскрипцию этих генов.

Активированный гетеродимер HIF-1 связывается с ДНК в сайтах, представленных консенсусной после-

довательностью 58-RCGTG-38 [30]. Сайт связывания с HIF-1, присутствующий в HRE, является цис-зоной транскрипционной регуляторной последовательности, которая может быть расположена в 58-фланкирующих, 38-фланкирующих или промежуточных последовательностях генов-мишеней. Наличие интактного сайта связывания HIF-1 необходимо, но не достаточно, чтобы эти элементы опосредовали активацию транскрипции [30, 31].

Альтернативные сигнальные механизмы активации HIF-1. Наряду с классическим путем активации HIF-1, обусловленным воздействием гипоксии и процессом накопления HIF-1 α , существует целый ряд альтернативных (неканонических) механизмов. Эти сигнальные механизмы затрагивают практически все этапы регуляции активности фактора HIF-1 и его альфа-субъединицы: экспрессия, синтез, трансактивация, накопление и деградация.

Например, синтез HIF-1 α может реализовываться через O₂-независимые механизмы, посредством реакций, контролируемых системами MAPK (mitogen activated proteinkinase) и PI3K (фосфатидилинозитол-3киназа), имеющих важное значение в процессах роста, пролиферации и дифференцировки [1]. Также, известно, что повышение транскрипционной активности HIF-1 наблюдается под действием окиси азота, фактора некроза опухоли альфа, интерлейкина-1 и ангиотензина [32].

При этом известно, что хелаторы железа, индуцирующие экспрессию HIF-1 α подобно гипоксии [33], также предотвращают и его убиквитинирование [34]. Доказано, что эти препараты нарушают ассоциацию vHL и HIF-1 α , тогда как эти белки остаются связанными в клетках подверженных гипоксии [35].

В последнее время появились доказательства существования неканонического пути деградации HIF-1, который зависит от шаперон-опосредованной лизосомальной аутофагии [36-39]. Показано, что применение ингибиторов лизосомальной деградации в модели *in vitro* приводит к повышению уровня HIF-1 α и активности HIF-1, а использование активаторов шаперон-опосредованной аутофагии имеет противоположный эффект. При этом, HSC70 и LAMP2A, аналогичным образом влияют на активность HIF-1, выступая основными компонентами механизма лизосомальной аутофагии. Кроме того, транскрипционный фактор EB, главный регулятор лизосомального биогенеза, также ингибирует HIF-1. Таким образом, модуляция активности лизосомальной аутофагии играет существенную роль в активации HIF-1 по независимому от кислорода пути.

Особый интерес для практического применения в терапии ишемических и гипоксических повреждений

представляет, на наш взгляд, возможная альтернативная активация HIF-1 углекислым газом в условиях гиперкапнии.

Роль гиперкапнии в процессе активации/накопления HIF-1 α . Во многих экспериментальных работах по изучению классического O₂-зависимого механизма активации HIF-1 исследователи пользуются моделями, которые создают в клетке не только дефицит кислорода, но и неизбежное повышение уровня CO₂. Однако, углекислота также является существенным фактором влияния на внутриклеточный гомеостаз и может оказывать независимое от кислорода воздействие на активность HIF-1.

Поскольку продукция диоксида углерода в организме тесно связана с потреблением кислорода, существует обратная зависимость между уровнями этих газов в клетках и тканях. Повышенная продукция CO₂, возникающая при гипоксии, компенсируется за счет гипервентиляции. На тканевом и клеточном уровне устойчивая гиперкапния формируется при угнетении этого механизма и/или нарушении микроциркуляции, сопровождаясь активацией анаэробного гликолиза [40]. Гипоксия и гиперкапния обычно сопутствуют респираторным расстройствам, таким как синдром ночного апноэ, пневмония и хроническая обструктивная болезнь легких [41, 42], а также заболеваниям, сопровождающимся нарушениями кровообращения и микроциркуляции [43, 44].

В литературном обзоре, посвященном потенциальным способам достижения активного долголетия, существенное внимание уделяется положительному гормональному эффекту перемежающейся гиперкапнии [45]. Примечательно, что перmissive гиперкапния признана клиническими специалистами как эффективный элемент защитной стратегии при искусственной вентиляции легких [46]. Кроме того, в цикле экспериментальных исследований был показан протекторный потенциал перmissive гиперкапнии в отношении ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга, патогенетически связанного с возникновением гипоксии в нервных клетках [47, 48]. Наши работы демонстрируют, что гиперкапния оказывает потенцирующее влияние на протекторную эффективность гипоксии при сочетанном курсовом воздействии, проводимом перед моделированием острой гипобарической гипоксии и фокального ишемического инсульта [49, 50].

Имеются работы, демонстрирующие стимулирующее влияние гиперкапнии на HIF-1 α . Так, в 2009 г. было установлено, что в головном мозге после введения ацетазоламида происходит увеличение концентрации HIF-1 α [51]. Авторы позиционировали это как прямой

эффект используемого препарата, хотя основной механизм его действия заключается в блокировании карбоангидразы с последующим повышением уровня CO_2 , который гипотетически также мог быть причиной нарушенного эффекта.

При оценке уровня HIF-1 α и HIF-2 α в коре головного мозга во время 3-недельного воздействия хронической гипоксии и гиперкапнии было отмечено их повышенное накопление, но в сопряжении со снижением плотности капиллярного русла и факторов роста сосудов [52].

Важно отметить наличие публикаций, в которых сделаны противоположные заключения при оценке влияния гиперкапнии на уровень HIF-1 α . Так, в экспериментальном исследовании A. Selfridge и соавт. [53] гиперкапния подавляла стабильность белка HIF и экспрессию его гена-мишени *in vivo* и *in vitro*, что ассоциировалось с прямым снижением внутриклеточного pH. А в исследовании V. Raeis и соавт. [54] выявлено отсутствие корреляции между повышением экспрессии HIF-1 α и уровнем CO_2 после 24-часовой экспозиции кардиомиоцитов в условиях гиперкапнической гипоксии *in vitro*. Однако, в указанных работах супрессия белка HIF была обнаружена при использовании модели с высоким уровнем гиперкапнии ($\text{FetCO}_2=10\%$) и/или длительным воздействием (4–6 ч и 24 ч), что могло вызвать дезадаптивный эффект.

В одной из наших работ методом иммуноферментного анализа было продемонстрировано повышение концентрации HIF-1 α в тканях головного мозга не только при воздействии дефицита кислорода, но и при повышении CO_2 в нормоксических условиях [55]. Для моделирования гиперкапнических и гипоксических состояний применялись 7-кратные курсы 30-минутных воздействий умеренного дефицита кислорода ($P_{\text{O}_2} \approx 90$ мм рт. ст.) и/или избытка CO_2 ($P_{\text{CO}_2} \approx 50$ мм рт. ст.) с интервалом 24 ч, выбранные в качестве оптимального нейротропного режима по результатам наших предыдущих исследований. Образцы головного мозга забирались для гомогенизации и иммунохимического исследования через 24 ч после 7-го респираторного воздействия для возможности оценки уровня HIF-1 α после стабилизации его концентрации [1] и формирования ишемической толерантности головного мозга [49].

В другом нашем исследовании результаты флуоресцентной микроскопии участка гиппокампа из CA1 региона, наиболее чувствительного к дефициту кислорода, показали, что курсовое воздействие гиперкапнической гипоксии повышает содержание HIF-1 α в нервных клетках, на фоне отсутствия аналогичного эффекта при изолированном применении гиперкапнии и гипоксии [56]. Эти данные позволяют предполагать,

что гиперкапния потенцирует эффективность гипоксии в отношении активации HIF-1 α .

При этом, важно отметить, что гиперкапния при сочетании с гипоксией частично препятствует снижению парциального напряжения кислорода в артериальной крови, формируя более высокий уровень PaO_2 по сравнению с изолированным воздействием гипоксии (48 и 33 мм рт. ст., соответственно) [56]. Это происходит, вероятно, вследствие одновременной стимуляции под воздействием CO_2 легочной вентиляции и легочной перфузии. Кроме того, это свидетельствует о том что, гиперкапния в сочетании с гипоксией оказывает индуцирующее действие на HIF-1 α даже в случае менее выраженной степени дефицита кислорода, чем при ее изолированном воздействии в эквивалентной концентрации.

В то же время, пока нет оснований утверждать, что более эффективное влияние гиперкапнической гипоксии на аккумуляцию HIF-1 α обусловлено непосредственным воздействием CO_2 , а не снижением уровня pH. Как следует из наших данных, в пользу первого варианта свидетельствует то, что аккумуляция HIF-1 α наблюдается при воздействии гиперкапнической гипоксии, для которой характерно меньшее по сравнению с изолированной гипоксией снижение PaO_2 . В пользу второго варианта могут свидетельствовать данные о снижении в условиях ацидоза функциональной активности пролил-гидроксилаз, ответственных за деградацию HIF-1 α при нормоксии [57].

Возможности потенцирования протекторных эффектов HIF-1 α . Основываясь на выраженных и глубоких регуляторных эффектах HIF-1, модуляция его активности (в том числе, фармакологическая) может представлять терапевтический интерес при лечении пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, ишемическими повреждениями и злокачественными новообразованиями [58].

Перспективным для использования в качестве средства модуляции эффектов фактора HIF-1 представляется сочетание воздействий, влияющих как на классический, так и на альтернативные механизмы его активации. Интересным в этом отношении является потенцирование гиперкапнически-гипоксических респираторных воздействий фармакологическими средствами, стимулирующими неканонические пути активации HIF-1 (хелаторы железа, блокаторы карбоангидразы, селективные ингибиторы лизосомальной аутофагии и активаторы MAPK и PI3K и т.д.). При этом, комбинация средств, повышающих активность HIF-1, с респираторными воздействиями и препаратами, влияющими на другие адаптогенные механизмы, может быть наиболее эффективной. Это подтверж-

дается увеличением нейропротекторной эффективности гиперкапнически-гипоксических воздействий при комбинации с активаторами А1-аденозиновых рецепторов и митохондриальных АТФ-зависимых K^+ -каналов [59], а также усилением кардиопротекторного эффекта при сочетании гипоксического прекодиционного рывания с активаторами опиоидных рецепторов [60].

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Куликов В.П., Трегуб П.П.

Сбор и обработка материала – Трегуб П.П., Малиновская Н.А., Ковзелев П.Д.

Написания текста – Трегуб П.П., Ковзелев П.Д., Кузовков Д.А.

Редактирование – Кузовков Д.А.

Литература

1. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2011; 1: 3-19
2. Adams J.M., Difazio L.T., Rolandelli R.H., Luján J.J., Haskó G., Csóka B., Selmezy Z., Németh Z.H. HIF-1: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiol Hung*. 2009; 96(1): 19-28.
3. Lee J.W., Bae S.H., Jeong J.W., Kim S.H., Kim K.W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. *Experimental & Molecular Medicine*. 2004; 36(1): 1-12.
4. Semenza G.L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1999; 15: 551-78.
5. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92(12): 5510-14.
6. Semenza G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology*. 2000; 88(4): 1474-80.
7. Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.-M., Fukumura D., Brusselmans K., Dewerchin M. et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation, and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998; 394: 485-90.
8. Gerber H.-P., Condorelli F., Park J., Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes: Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia. *J Biol Chem*. 1997; 272: 23659-67.
9. Ryan H.E., Lo J., Johnson R.S. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*. 1998; 17: 3005-15.
10. Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F., Leung S.W., Laughner E., Wenger R.H. et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev*. 1998; 12: 149-62.
11. Wood S.M., Wiesener M.S., Yeates K.M., Okada N., Pugh C.W., Maxwell P.H., Ratcliffe P.J. Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 α -subunit (HIF-1 α): characterization of HIF-1 α -dependent and independent hypoxia-inducible gene expression. *J Biol Chem*. 1998; 273: 8360-8.
12. Hu J., Discher D.J., Bishopric N.H., Webster K.A. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 245: 894-9.
13. Jiang B.-H., Rue E., Wang G.L., Roe R., Semenza G.L. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1996; 271: 17771-8.
14. Eckhart A.D., Yang N., Xin X., Faber J.E. Characterization of the α 1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 9487-92.
15. Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G., Semenza G.L. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*. 1999; 59: 3915-8.
16. Tazuke S.I., Mazure N.M., Sugawara J., Carland G., Faessen G.H., Suen L.-F. et al. Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 10188-93.
17. Melillo G., Musso T., Sica A., Taylor L.S., Cox G.W., Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med*. 1995; 182: 1683-93.
18. Palmer L.A., Semenza G.L., Stoler M.H., Johns R.A. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1998; 274: L212-9.
19. Zhong H., De Marzo A.M., Laughner E., Lim M., Hilton D.A., Zagzag D., Buechler P., Isaacs W.B., Semenza G.L., Simons J.W. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Research*. 1999; 59(22): 5830-5.
20. Vaupel P., Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Reviews*. 2007; 26(2): 225-39.
21. Krieg M., Haas R., Brauch H., Acker T., Flamme I., Plate K.H. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene*. 2000; 19 (48): 5435-43.
22. Cramer T., Yamanishi Y., Clausen B.E., Förster I., Pawlinski R., Mackman N. et al. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*. 2003; 112: 645-57.
23. Oda T., Hirota K., Nishi K., Takabuchi S., Oda S., Yamada H. et al. Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2006; 291: 104-13.
24. Krick S., Eul B.G., Hänze J., Savai R., Grimminger F., Seeger W., Rose F. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 2005; 32(5): 395-403.
25. Li L., Qu Y., Li J., Xiong Y., Mao M., Mu D. Relationship between HIF-1 α expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury. *Brain Res*. 2007; 1180: 133-9.
26. Magnon C., Opolon P., Ricard M., Connault E., Ardouin P., Galoup A. et al. Radiation and inhibition of angiogenesis by canstatin synergize to induce HIF-1 α -mediated tumor apoptotic switch. *J Clin. Invest*. 2007; 117(7): 1844-55.
27. Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95: 7987-92.
28. Mole D.R., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life*. 2001; 52: 43-7.
29. Huang L.E., Arany Z., Livingston D.M., Bunn H.F. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *The J Biol Chem*. 1996; 271(50): 32253-9.

30. Semenza G.L., Jiang B-H., Leung S.W., Passantino R., Concordet J-P., Maire P., Giallongo A. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996; 271: 32529–37.
31. Semenza G.L., Wang G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992; 12: 5447–54.
32. Yoon D., Pastore Y.D., Divoky V. et al. Hypoxia-inducible factor 1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *J Biol Chem.* 2006; 281: 25703–11.
33. Wang G.L., Semenza G.L. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood.* 1993; 82: 3610–5.
34. Kallio P.J., Wilson W.J., O'Brien S., Makino Y., Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 1999; 274: 6519–25.
35. Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G-W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E. et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999; 399: 271–5.
36. Ferreira J.V., Fôfo H., Bejarano E., Bento C.F., Ramalho J.S., Girão H., Pereira P. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy.* 2013; 9: 1349–66.
37. Ferreira J.V., Soares A.R., Ramalho J.S., Pereira P., Girao H. K63 linked ubiquitin chain formation is a signal for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Sci. Rep.* 2015; 5: 10210.
38. Hubbi M.E., Gilkes D.M., Hu H., Kshitiz, Ahmed I., Semenza G.L. Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α to promote cell-cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 3325–34.
39. Hubbi M. E., Hu H., Kshitiz, Ahmed I., Levchenko A., Semenza G.L. Chaperone-mediated autophagy targets hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) for lysosomal degradation. *J Biol Chem.* 2013; 288: 10703–14.
40. Куликов В.П., Кузнецова Д.В., Заря А.Н. Цереброваскулярная и кардиоваскулярная CO₂-реактивность в патогенезе артериальной гипертензии. *Артериальная гипертензия.* 2017; 23(5): 433–46.
41. Budweiser S., Jörres R. A., Pfeifer M. Treatment of respiratory failure in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon.* 2008; 3: 605–18.
42. Krieger J., Sforza E., Apprill M., Lampert E., Weitzenblum E., and Ratomaharo J. Pulmonary hypertension, hypoxemia, and hypercapnia in obstructive sleep apnea patients. *Chest.* 1989; 96: 729–37.
43. Back S.A. Brain Injury in the Preterm Infant: New Horizons for Pathogenesis and Prevention. *Pediatr Neurol.* 2015; 53(3): 185–92.
44. Kwasiborski P.J. Selected biochemical markers of hypoxia. *Przegl Lek.* 2012; 69(3): 115–9.
45. Pruijboom L., Muskiet A.J. Intermittent living; the use of ancient challenges as a vaccine against the deleterious effects of modern life. A hypothesis. *Medical Hypotheses.* 2018; 120: 28–42.
46. Contreras M., Masterson C., and Laffey J. G. Permissive hypercapnia: what to remember. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 2015; 28: 26–37.
47. Tao T., Liu Y., Zhang J., Xu Y., Li W., Zhao M. Therapeutic hypercapnia improves functional recovery and attenuates injury via anti-apoptotic mechanisms in a rat focal cerebral ischemia/reperfusion model. *Brain Res.* 2013; 1533: 52–62.
48. Zhou Q., Cao B., Niu L., Cui X., Yu H., Liu J., Li H., Li W. Effects of permissive hypercapnia on transient global cerebral ischemia–reperfusion injury in rats. *Anesthesiology.* 2010; 112: 288–97.
49. Tregub P., Kulikov V., Bespalov A. Tolerance to acute hypoxia maximally increases in case of joint effect of normobaric hypoxia and permissive hypercapnia in rats. *Pathophysiology.* 2013; 3: 165–70.
50. Tregub P., Kulikov V., Motin Y., Bespalov A., Osipov I. Combined exposure to hypercapnia and hypoxia provides its maximum neuroprotective effect during focal ischemic injury in the brain. *J Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2015; 24(2): 381–7.
51. Xu J., Peng Z., Li R., Dou T., Xu W., Gu G. et al. Normoxic induction of cerebral HIF-1 β by acetazolamide in rats: Role of acidosis. *Neurosci. Lett.* 2009; 451: 274–8.
52. Benderro G.F., Tsipis C.P., Sun X., Kuang Y., LaManna J.C. Increased HIF-1 α and HIF-2 α accumulation, but decreased microvascular density, in chronic hyperoxia and hypercapnia in the mouse cerebral cortex. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 789: 29–35.
53. Selfridge A.C., Cavadas M.A., Scholz C.C., Campbell E.L., Welch L.C., Lecuona E. et al. Hypercapnia Suppresses the HIF-dependent Adaptive Response to Hypoxia. *J Biol Chem.* 2016; 291(22): 11800–8.
54. Raes V., Philip-Couderc P., Roatti A., Habre W., Sierra J., Kalangos A. et al. Central venous hypoxemia is a determinant of human atrial ATP-sensitive potassium channel expression: evidence for a novel hypoxia-inducible factor 1 α -Forkhead box class O signaling pathway. *Hypertension.* 2010; 55(5): 1186–92.
55. Куликов В.П., Трегуб П.П., Ковзелев П.Д., Дорохов Е.А., Белоусов А.А. Гиперкапния – альтернативный гипоксии сигнальный стимул для повышения HIF-1 α и эритропоэтина в головном мозге. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2015; 3: 34–7.
56. Куликов В.П., Мотин Ю.Г., Трегуб П.П., Ковзелев П.Д., Шошин К.А., Зинченко Е.К., Чернецкий А.Е. Сочетание гиперкапнии и гипоксии приводит к ацидозу и увеличивает содержание HIF-1 α в гиппокампе крыс. *Российский физиологический журнал.* 2018; 104(11): 1347–55.
57. Lando D., Gorman J.J., Whitelaw M.L., Peet D.J. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270: 781–90.
58. Левченкова О.С., Новиков В.Е. Индукторы регуляторного фактора адаптации к гипоксии. *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.* 2014; 2: 134–44.
59. Трегуб П.П., Куликов В.П., Степанова Л.А., Забродина А.С., Нагибаева М.Е. Роль аденозиновых А1-рецепторов и митохондриальных K⁺АТФ-каналов в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2014; 58(4): 48–52.
60. Maslov L.N., Lishmanov Y.B., Oeltgen P.R., Barzakh E.I., Krylatov A.V., Govindaswami M., Brown S.A. Activation of peripheral δ 2 opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury Involvement of protein kinase C, NO-synthase, KATP channels and the autonomic nervous system. *Life Sciences.* 2009; 84: 657–63.

References

1. Lukyanova L.D. Modern problems of adaptation to hypoxia. Signaling mechanisms and their role in systemic regulation. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2011; 1: 3–19. (in Russian)

2. Adams J.M., Difazio L.T., Rolandelli R.H., Luján J.J., Haskó G., Csóka B. et al. HIF-1: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiol Hung.* 2009; 96(1): 19-28.
3. Lee J.W., Bae S.H., Jeong J.W., Kim S.H., Kim K.W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. *Experimental & Molecular Medicine.* 2004; 36(1): 1-12.
4. Semenza G.L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 1999; 15: 551-78.
5. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995; 92(12): 5510-14.
6. Semenza G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology.* 2000. 88(4): 1474-80.
7. Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.-M., Fukumura D., Brusselmans K., Dewerchin M. et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation, and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998; 394: 485-90.
8. Gerber H.-P., Condorelli F., Park J., Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes: Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 1997; 272: 23659-67.
9. Ryan H.E., Lo J., Johnson R.S. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* 1998; 17: 3005-15.
10. Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F., Leung S.W., Laughner E., Wenger R.H. et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 1998; 12: 149-62.
11. Wood S.M., Wiesener M.S., Yeates K.M., Okada N., Pugh C.W., Maxwell P.H., Ratcliffe P.J. Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 α -subunit (HIF-1 α): characterization of HIF-1 α -dependent and independent hypoxia-inducible gene expression. *J Biol Chem.* 1998; 273: 8360-8.
12. Hu J., Discher D.J., Bishopric N.H., Webster K.A. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 245: 894-9.
13. Jiang B.-H., Rue E., Wang G.L., Roe R., Semenza G.L. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996; 271: 17771-8.
14. Eckhart A.D., Yang N., Xin X., Faber J.E. Characterization of the α 1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 9487-92.
15. Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G., Semenza G.L. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 1999; 59: 3915-8.
16. Tazuke S.I., Mazure N.M., Sugawara J., Carland G., Faessen G.H., Suen L.-F. et al. Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 10188-93.
17. Melillo G., Musso T., Sica A., Taylor L.S., Cox G.W., Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med.* 1995; 182: 1683-93.
18. Palmer L.A., Semenza G.L., Stoler M.H., Johns R.A. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1998; 274: L212-9.
19. Zhong H., De Marzo A.M., Laughner E., Lim M., Hilton D.A., Zagzag D. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Research.* 1999; 59(22): 5830-5.
20. Vaupel P., Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Reviews.* 2007; 26(2): 225-39.
21. Krieg M., Haas R., Brauch H., Acker T., Flamme I., Plate K.H. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006; 291: 104-13.
22. Cramer T., Yamanishi Y., Clausen B.E., Förster I., Pawlinski R., Mackman N. et al. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell.* 2003; 112: 645-57.
23. Oda T., Hirota K., Nishi K., Takabuchi S., Oda S., Yamada H. et al. Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006; 291: 104-13.
24. Krick S., Eul B.G., Hänze J., Savai R., Grimminger F., Seeger W. et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2005; 32(5): 395-403.
25. Li L., Qu Y., Li J., Xiong Y., Mao M., Mu D. Relationship between HIF-1 α expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury. *Brain Res.* 2007; 1180: 133-9.
26. Magnon C., Opolon P., Ricard M., Connault E., Ardouin P., Galup A. et al. Radiation and inhibition of angiogenesis by canstatin synergize to induce HIF-1 α -mediated tumor apoptotic switch. *J Clin. Invest.* 2007; 117(7): 1844-55.
27. Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 7987-92.
28. Mole D.R., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life.* 2001; 52: 43-7.
29. Huang L.E., Arany Z., Livingston D.M., Bunn H.F. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *The J Biol Chemistry.* 1996; 271(50): 32253-9.
30. Semenza G.L., Jiang B.-H., Leung S.W., Passantino R., Concordet J.-P., Maire P. et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996; 271: 32529-37.
31. Semenza G.L., Wang G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992; 12: 5447-54.
32. Yoon D., Pastore Y.D., Divoky V. et al. Hypoxia-inducible factor 1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *J Biol Chem.* 2006; 281: 25703-11.
33. Wang G.L., Semenza G.L. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood.* 1993; 82: 3610-5.
34. Kallio P.J., Wilson W.J., O'Brien S., Makino Y., Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 1999; 274: 6519-25.

35. Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G-W., Clifford S.C., Vaux E.C. et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399: 271-5.
36. Ferreira J.V., Fôfo H., Bejarano E., Bento C.F., Ramalho J.S., Girão H. et al. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*. 2013; 9: 1349-66.
37. Ferreira J.V., Soares A.R., Ramalho J.S., Pereira P., Giraio H. K63 linked ubiquitin chain formation is a signal for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Sci. Rep.* 2015; 5: 10210.
38. Hubbi M.E., Gilkes D.M., Hu H., Kshitiz, Ahmed I., Semenza G. L. Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α to promote cell-cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111: 3325-34.
39. Hubbi M. E., Hu H., Kshitiz, Ahmed I., Levchenko A., Semenza G. L. Chaperone-mediated autophagy targets hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) for lysosomal degradation. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 10703-14.
40. Kulikov V.P., Kuznetsova D.V., Zarya A.N. Cerebrovascular and cardiovascular CO₂ reactivity in the pathogenesis of arterial hypertension. *Arterial'naya Gipertenziya*. 2017; 23(5): 433-46. (in Russian)
41. Budweiser S., Jörres R. A., Pfeifer M. Treatment of respiratory failure in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon.* 2008; 3: 605-18.
42. Krieger J., Sforza E., Apprill M., Lampert E., Weitzenblum E., Ratomaharo J. Pulmonary hypertension, hypoxemia, and hypercapnia in obstructive sleep apnea patients. *Chest*. 1989; 96: 729-37.
43. Back S.A. Brain Injury in the Preterm Infant: New Horizons for Pathogenesis and Prevention. *Pediatr Neurol*. 2015; 53(3): 185-92.
44. Kwasiborski P.J. Selected biochemical markers of hypoxia. *Przegl Lek.* 2012; 69(3): 115-9.
45. Pruijboom L., Muskiet A.J. Intermittent living; the use of ancient challenges as a vaccine against the deleterious effects of modern life. A hypothesis. *Medical Hypotheses*. 2018; 120: 28-42.
46. Contreras M., Masterson C., Laffey J. G. Permissive hypercapnia: what to remember. *Curr. Opin. Anaesthesiol*. 2015; 28: 26-37.
47. Tao T., Liu Y., Zhang J., Xu Y., Li W., Zhao M. Therapeutic hypercapnia improves functional recovery and attenuates injury via anti-apoptotic mechanisms in a rat focal cerebral ischemia/reperfusion model. *Brain Res*. 2013; 1533: 52-62.
48. Zhou Q., Cao B., Niu L., Cui X., Yu H., Liu J. et al. Effects of permissive hypercapnia on transient global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Anesthesiology*. 2010; 112: 288-97.
49. Tregub P., Kulikov V., Beshpalov A. Tolerance to acute hypoxia maximally increases in case of joint effect of normobaric hypoxia and permissive hypercapnia in rats. *Pathophysiology*. 2013; 3: 165-70.
50. Tregub P., Kulikov V., Motin Y., Beshpalov A., Osipov I. Combined exposure to hypercapnia and hypoxia provides its maximum neuro-protective effect during focal ischemic injury in the brain. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2015; 24(2): 381-7.
51. Xu J., Peng Z., Li R., Dou T., Xu W., Gu G. et al. Normoxic induction of cerebral HIF-1 β by acetazolamide in rats: Role of acidosis. *Neurosci. Lett.* 2009; 451: 274-8.
52. Bendero G.F., Tsipis C.P., Sun X., Kuang Y., LaManna J.C. Increased HIF-1 α and HIF-2 α accumulation, but decreased microvascular density, in chronic hyperoxia and hypercapnia in the mouse cerebral cortex. *Adv Exp Med Biol*. 2013; 789: 29-35.
53. Selfridge A.C., Cavadas M.A., Scholz C.C., Campbell E.L., Welch L.C., Lecuona E. et al. Hypercapnia Suppresses the HIF-dependent Adaptive Response to Hypoxia. *J Biol Chem*. 2016; 291(22): 11800-8.
54. Raes V., Philip-Couderc P., Roatti A., Habre W., Sierra J., Kalangos A. et al. Central venous hypoxemia is a determinant of human atrial ATP-sensitive potassium channel expression: evidence for a novel hypoxia-inducible factor 1 α -Forkhead box class O signaling pathway. *Hypertension*. 2010; 55(5): 1186-92.
55. Kulikov V.P., Tregub P.P., Kovzelev P.D., Dorokhov E.A., Belousov A.A. Hypercapnia - an alternative stimulus signaling hypoxia to increase HIF-1 α and erythropoietin in the brain. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2015; 3: 34-7. (in Russian)
56. Kulikov V.P., Motin Yu.G., Tregub P.P., Kovzelev P.D., Shoshin K.A., Zinchenko E.K., et al. The combination of hypercapnia and hypoxia leads to acidosis and increases the HIF-1 α content in rat hippocampus. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal*. 2018; 104(11): 1347-55. (in Russian)
57. Lando D., Gorman J.J., Whitelaw M.L., Peet D.J. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur. J Biochem*. 2003; 270: 781-90.
58. Levchenkova O.S., Novikov V.E. Inductors of the regulatory factor for adaptation to hypoxia. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2014; 2: 134-44. (in Russian)
59. Tregub P.P., Kulikov V.P., Stepanova L.A., Zabrodina A.S., Nagibaeva M.E. The role of adenosine A1 receptors and mitochondrial K⁺ + ATP channels in the mechanism of increasing resistance to acute hypoxia with the combined effects of hypoxia and hypercapnia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; 58(4): 48-52. (in Russian)
60. Maslov L.N., Lishmanov Y.B., Oeltgen P.R., Barzakh E.I., Krylatov A.V., Govindaswami M. et al. Activation of peripheral δ 2 opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury Involvement of protein kinase C, NO-synthase, KATP channels and the autonomic nervous system. *Life Sciences*. 2009; 84: 657-63.

Сведения об авторах:

Трегуб Павел Павлович, канд. мед. наук, зам. директора по науке ООО «Алтайский медицинский институт последипломного образования», науч. сотр. ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, e-mail: pfiza_asmu@mail.ru;

Куликов Владимир Павлович, доктор мед. наук, проф., директор ООО «Алтайский медицинский институт последипломного образования», e-mail: kulikov57@mail.ru;

Малиновская Наталья Александровна, доктор мед. наук, доцент, науч. сотр. ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, e-mail: malinovskaya-na@mail.ru;

Кузовков Дмитрий Андреевич, студент лечебного факультета ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, e-mail: 79833749139k@gmail.com;

Ковзелев Павел Дмитриевич, клинический ординатор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, e-mail: kovzelev@bk.ru

© Пальцын А.А., 2019

УДК 616-092

Пальцын А.А.

Запоминание и забывание

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
125315, г. Москва, Россия, Балтийская ул., д. 8;
ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования»,
123995, г. Москва, Россия, Баррикадная ул., д. 2/1

В обзоре, минуя психологические аспекты сложного явления – памяти, предпринята попытка представить в сжатом виде физиологию и морфологию современного представления о проблеме. Почти полуторазековая история научных предположений и знаний о механизмах памяти содержит замечательные открытия, которые должны быть использованы и используются для разумной организации общения, социальных связей, культуры, быта, труда, отдыха и лечения людей. Материалистическая идея, о том, что память представляет собой комбинацию связей между нейронами, возникшая вначале как мудрое предположение Бэйна, Кахаля, Павлова, Хэбба, во второй половине XX века оказалась подтвержденной многими разнообразными и хитроумными экспериментальными доказательствами, частично представленными в статье. Все, связанные с памятью варианты поведения и состояния животных и человека находят объяснения в процессах, развивающихся в синапсах. Сугубо медицинское значение памяти заключается в том, что различные виды её недостаточности – постоянный и, часто, существенный дефект, отягощающий любое старение, даже протекающее без грубых когнитивных нарушений. Расстройства памяти – важнейший отрицательный компонент многих наследственных и нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: мозг; память; синапсы; сон.

Для цитирования: Пальцын А.А. Запоминание и забывание. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 123-129.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.123-129

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.04.2019

Paltsyn A.A.

Memorizing and forgetting

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltijskaya 8, Moscow 125315, Russia;

²Russian Medical Academy of Postgraduate Education,
Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russia

The almost sesquicentennial history of scientific hypotheses and knowledge of the mechanisms of memory contains remarkable discoveries that should be used and are used for rational organization of communication, social relations, culture, life, work, leisure, and curing of people. The materialistic idea that memory is a combination of interneuron connections emerged for the first time as a wise hypothesis of Bain, Cajal, Pavlov, and Hebb in the second half of the 20th century. This hypothesis has been confirmed by many diverse and ingenious experimental evidence partially presented in this article. All memory-related variations of behavior and condition of animals and humans can be explained by processes developing in synapses. A specifically medical significance of memory is that various types of memory insufficiency are a permanent and often a considerable defect aggravating any aging even not associated with a severe cognitive impairment. Moreover, memory impairment is the most important negative component of many hereditary and neurodegenerative diseases.

Keywords: brain; memory; synapses; sleep.

For citation: Paltsyn A.A. Memorizing and forgetting. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2019; 63(4):123-129. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.123-129

For correspondence: Paltsyn A.A., e-mail: lrrp@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 02.04.2019

В обзоре, минуя психологические аспекты сложного явления — памяти, сделана попытка представить в сжатой форме физиологию и морфологию современного представления о проблеме.

Идею о межклеточных контактах нейронов как структурной основе памяти впервые выдвинул шотландский ученый Alexander Bain. В замечательной книге «Ум и тело» [1] он писал: «для каждого акта памяти, каждого возникновения мысли, необходима особая группировка, особый вариант клеточных соединений». Современники не смогли оценить и принять идею Bain'a. Она оставалась незамеченной более 20 лет до появления подобных высказываний Сантьяго Кахала, основанных на его опыте изучения отростков нервных клеток [2]. Выдержки из этого текста Кахала на испанском можно прочесть на английском в переводе соотечественника Кахала Delgado-García [3]. Кахаль писал об изменении межнейронных связей в юношеские годы соответственно образованию и привычкам. *Предположения* Бэйна и Кахала оказались пророческими, блестяще *оправданными гипотезами* в результате изобретения И.П. Павловым метода условных рефлексов и исследований, выполненных этим методом. Физиологические основы условного рефлекса — элементарного акта возникновения памяти, были тщательно и убедительно разработаны Павловской школой. Иван Петрович доказал, что системы условнорефлекторных связей, их комплексы лежат в основе ассоциативного механизма научения, формирования навыков, привычек и жизненного опыта в целом. В статье 1932 г. «Ответ физиолога психологам» [4] И.П. Павлов писал: «При обычной процедуре образования прочного условного рефлекса прохождение волны возбуждения из соответствующей корковой клетки к центру безусловного раздражителя есть основное условие более или менее постоянного объединения двух нервных пунктов. Относительно факта постепенного усиления условного эффекта при процессе его образования нужно сказать, что всё дело заключается во всё большем концентрировании раздражения и затем, может быть, в постепенном проторении пути между связываемыми пунктами центральной нервной системы (подчеркнуто мной). И.П. Павлов, почему-то писал о «пути» между связываемыми пунктами нервной системы и не использовал, известное ему, слово «синапс». Скорее всего, из желания сделать текст понятным более широкому кругу читателей.

Дальнейшее развитие идеи о связи памяти с синапсами принято видеть в представлениях канадского физиолога Дональда Хебба, изложенных в его книге «Организация поведения» [5]. Он, по сути, переписал идею И.П. Павлова, но с использованием слова — синапс. Умозрительно объяснил, что стимул первич-

но недостаточный для того, чтобы вызвать опосредованный синапсом ответ, при повторных включениях или сочетаниях с действенным стимулом модифицирует этот синапс и становится достаточным для ответной реакции. Модификацию он *умозрительно* описывал разрастанием и увеличением площади контакта синапса с постсинаптической клеткой. Вот перевод Хебба: «Эффективность клетки А в итоге метаболических изменений, связанных с многократным включением клетки Б, — увеличивается». Это объяснение закрепилось в литературе и стало популярным под названиями: «синапсы Хебба», «постулат Хебба». Таким образом, объяснение памяти синаптической пластичностью возникло и долгое время оставалось умозрительным, замечательной, но не доказанной догадкой. В 1967 г. появилось экспериментальное подтверждение идеи. Норвежский исследователь Terje Lømo и его научный руководитель описали явление долговременной потенциации — ЛТР [6]. Кратковременная (длительностью до 10 с) стимуляция током нейронов зубчатой извилины гиппокампа вызывала продолжительное (до 10 ч) усиление активности этих нейронов. Позже выяснилось, что состояние потенциации может длиться неделями. Поскольку в то время уже знали, что гиппокамп — структура, ответственная за память, вполне правдоподобно предположили, что ЛТР — механизм образования памяти. «Претензия» ЛТР на механизм памяти подкрепляется строгой специфичностью реакции, т.е. развитием её только в стимулированных клетках и не распространением на соседние нейроны. Повторные стимуляции увеличивают продолжительность состояния ЛТР, что соответствует представлению о кратковременной и долговременной памяти. Другая форма зависимого от активности изменения синаптической связи, выражающаяся её ослаблением (сравнительно с состоянием до воздействия) получила название долговременной депрессии (LTD). Поведенческая роль ЛТР и LTD существенно зависит от области мозга, где они развиваются. В коре они проявляются слуховыми, зрительными и двигательными изменениями. Ответ в виде ЛТР или LTD может определяться частотой стимулирующего воздействия. Так в гиппокампе снижение частоты стимула меняет результат с ЛТР на LTD. LTD заявляется как тип синаптической пластичности характерный для коры мозжечка [7]. LTD развивается и в неокортексе, гиппокампе, стриатуме, когда кратковременная возбуждающая стимуляция увеличивает концентрацию Ca^{2+} в постсинаптических нейронах в меньшей степени, чем необходимо для ЛТР [8].

F. Engert и T. Bonhoeffer [9] показали экспериментом *in vitro*, что после индукции ЛТР в CA1 области

гиппокампа на постсинаптическом дендрите появляются новые шипики. Также *in vitro* методом двухфотонной микроскопии нейронов CA1 из мозга крысы окрашенных GFP была сделана [10] фоторегистрация появления на дендрите «филоподия-подобных» выпячиваний высотой менее 5 мкм на расстоянии около 50 мкм от стимулирующего электрода. Выпячивания не появлялись при блокаде NMDAR (N-methyl-D-aspartate – Receptors).

Показано, что закрытие одного глаза у мышей увеличивает число шипиков на апикальных дендритах пятого слоя пирамид зрительной коры, обслуживающих другой глаз. Восстановление бинокулярного зрения возвращает динамику образования шипиков к исходному уровню. Однако повышенное содержание шипиков на испытуемых дендритах сохраняется. При повторном закрытии того же глаза скорость добавления шипиков не увеличивается. Получается, что дополнительные шипики есть структурное выражение памяти о повышенной нагрузке и субстрат, позволяющий быстрее справиться с повторной нагрузкой [11]. Такие же, по сути, результаты публиковались при исследовании других проявлений памяти. Методом оптогенетики было показано, что забывание, полученной в курсе обучения информации, сочеталось с уменьшением размера и исчезновением шипиков [12]. Это доказывает, что структуры-носители информации не клетки, а синапсы и шипики. Следовательно, структурно энграмма памяти представляет собой комбинацию шипиков, а детальнее – комплекс, расположенных на них синапсов.

Чрезвычайная морфологическая сложность нейрона, сравнительно с другими клетками, резко выраженная морфологическая поляризация, обуславливают внутриклеточную гетерогенность в регуляции экспрессии генов. Отростки нейрона многократно превышают диаметр перикариона и могут иметь до 200 000 контактов (например, нейроны Пуркинье) с другими клетками. Присутствие рибосом в дендритах обуславливает тот факт, что неизбежно возникающие различия в стимуляции этих синапсов создают локальную внутриклеточную разницу в трансляции мРНК [13].

В 2014 г. в журнале Nature была опубликована статья [14] с убедительным доказательством роли LTP и LTD в механизмах запоминания и забывания. На крысах, методом оптогенетики было показано, что ассоциативная память о состоянии страха может быть инактивирована LTD и реактивирована LTP. Болевое воздействие на конечности сочетали с оптогенетической стимуляцией амигдалы в режимах LTD и LTP.

Попытки критической переоценки роли синапсов в механизмах памяти предпринимаются до сих пор [15,

16]. Это естественно для живой, развивающейся науки. Однако аргументы «просинаптически» настроенных исследователей [17] кажутся убедительнее. Например, Е.И. Захарова с сотрудниками описали положительную корреляцию активности в синаптических субфракциях ключевого фермента холинергических нейронов коры ацетилтрансферазы со способностью к обучению [18]. Сравнительно недавно – апрель 2018 г., в журнале Science появился результат замечательного исследования сотрудников Сеульского университета под руководством В.К. Kaang [19]. На осуществление этого эксперимента авторы потратили около 10 лет. В гиппокамп (CA3) мышей вводили с помощью вируса рекомбинантную ДНК, кодирующую экспрессию зеленого флуоресцентного белка в нейронах с энграммой памяти. У животных вырабатывали условный рефлекс связывающий окружение, в которое их помещали, с сильным или слабым электрическим шоком. При действии только условного раздражителя (памяти, но не тока) у подопытных мышей энграмма памяти (зеленая флуоресценция) появлялась в CA1 нейронах. Диаметр дендритов и плотность расположения шипиков на зеленых нейронах были больше, чем на неокрашенных. Ситуации, соответствующие действию слабого и сильного шока, не отличаясь по числу задействованных нейронов, отличались диаметром дендритов и плотностью расположения синапсов (шипиков). Связи были мощнее после условного рефлекса на сильный шок.

Таким образом, сегодня трудно допустить, что формирование и сохранение памяти определяются чем-то иным, а не изменениями в силе синаптических связей между нейронами ЦНС, но не какими-либо другими из содержащихся в мозге клеток. Непостоянство таких связей, необходимость их изменений и способность к ним – неперемное условие сохранения жизни, называемое синаптической пластичностью. Ею обуславливается возможность обучения, т.е. приобретения и утраты памяти. Её нарушения лежат в основе неврологических расстройств. Для обеспечения сложных мыслительных и поведенческих реакций за счет синаптической пластичности постоянно формируются и перестраиваются ансамбли нейронов.

Одним из наиболее важных молекулярных механизмов таких перестроек, медиатором химической синаптической передачи нервного импульса между клетками является глутамат и связываемый им рецептор – NMDAR. Он – главный инструмент синаптической пластичности и, соответственно, обучения и памяти. Но, в то же время, избыточная активация этого рецептора, повышая приток Ca^{2+} , формирует эксайтотоксичность – причину нейродегенеративных рас-

стройств. Поэтому антитела к глутамату могут оказывать нейротропное действие при нарушениях памяти у стареющих животных, нормализовать обмен дофамина и заслуживают внимания в качестве перспективы лечения нейродегенерации [20].

Обусловленный NMDAR ответ может быть причиной, как здоровья, так и гибели нейронов. Продолжительное время различие эффектов объясняли только нормальной или избыточной концентрацией Ca^{2+} . Позже выяснилось, что причина различия заключается в расположении рецептора. Стимуляция синаптических NMDAR оказывает нейротропное действие, а экстраинаптических — губительна для клеток. Последние, как показало иммуно-электронно-микроскопическое и цитохимическое исследования, расположены или перисинаптически: около 100 нм от синапса иногда дальше, но на шипике, или совсем далеко: на дендрите или аксоне [21]. Различный эффект стимуляции тех и других объясняется тем, что активируются геномные программы с противоположным действием на внутриклеточные сигнальные пути. Активация синаптических NMDAR, распространяясь в ядро, включает геномные программы, повышающие устойчивость митохондрий нейрона, уменьшающие экспрессию про-апоптотических факторов, в том числе каспаз, стимулирующих антиоксидантную защиту. Экстраинаптические NMDAR — антагонисты синаптических NMDAR — будучи активированными, нарушают связи синапсов с ядром, баланс про- и антифункциональной импульсации, адекватность перехода в клетки Ca^{2+} и адекватность включения генома.

Нарушения синаптического-экстраинаптического баланса считается важным моментом в нейрональной дисфункции при ишемии, а также при развитии нейродегенеративных болезней. Такие нарушения обнаружены при инсульте, травме мозга, болезнях Хантингтона и Альцгеймера и должны учитываться в терапевтических стратегиях [22].

Во многих областях мозга отростки астроцитов тесно прилегают к синапсам вообще и глутаматным, в частности. Специфический трансмиттер астроцитов D-серин является модулятором NMDAR, агонистом глутамата. Одно из доказательств сказанного — эксперимент Oliet с сотрудниками [23]. Нейроны супраоптического ядра гипоталамуса девственных крыс окружены плотным слоем астроцитов. Цитохимическим анализом авторы показали, что в этой области высок уровень D-серина и он является здесь единственным эндогенным лигандом NMDAR. У лактирующих животных астроцитарное окружение нейронов и синапсов существенно снижается и снижается постсинаптический ток возбуждения. В другом эксперименте груп-

пы Oliet снижение концентрации D-серина в синаптической щели (лактация) уменьшало число активированных NMDA-рецепторов и, следовательно, приток кальция в нейроны. Из-за недостатка кальция вместо, свойственной девственному животному LTP, развивалась LTD [24].

Многочисленными (почти 5000 обзоров в PubMed в конце 2018 г.) более поздними исследованиями было определено, что регуляция NMDAR разносторонняя со многими аллостерическими модуляциями. Сегодня практически перспективным способом влияния на состояние памяти представляется регуляция продукции D-серина — главного эндогенного ко-агониста для NMDAR активации. Наиболее существенные результаты в этом направлении получены группой ученых Сорбонны под руководством Billard, обнаруживших возможность исправлять D-серином возрастной дефицит памяти. Они показали, что снижение тканевого уровня аминокислоты обуславливается меньшей продукцией фермента серин-рацемазы [25]. У стареющих крыс линии LOU/C не снижается экспрессия серин-рацемазы. Этим объясняют сохранение у животных уровня D-серина, активации NMDAR. У них не обнаруживают возрастного дефицита памяти, связанного с CA1 областью гиппокампа. Отсутствие признаков оксидативного стресса у старых животных этой линии указывает на то, что нарушения обмена D-серина провоцируются реактивными формами кислорода [26]. И, наоборот, фенотип серин-рацемазы негативных мышей напоминает шизофрению: атрофия коры, сглаживание и снижение плотности шипиков на дендритах, когнитивные нарушения [27]. Лечение таких мышей (взрослых) D-серином в значительной мере устраняло патологические изменения. Важность сохранения стабильности функции серин-рацемазы выражается тем фактом, что с её нарушением связывают когнитивный дефицит возрастной — гиподисфункция, а также когнитивный дефицит при болезни Альцгеймера — но в этом случае выражающийся гиперфункцией [28].

Какие изменения, создаваемые в нервных клетках сигналами внешней среды, превращаются в код памяти? Это могут быть изменения в экспрессии ионных каналов, меняющие возбудимость нейронов и их потенциалы действия. Изменения внешней или внутренней среды организма структурно могут выразиться появлением новых шипиков и отростков или ретракцией и удалением старых. Комплекс всех молекулярных и клеточных изменений в группе нейронов, занятых в событии создают энграмму памяти, определяющую поведение.

Замечательное свойство организма — память имело бы в жизни вообще и жизни человека, в особенно-

сти, гораздо меньшее значение и адаптационную ценность, если бы не было забывания. Человек не только помнит, но и думает, а для этого нужно обобщать, абстрагировать, т.е. даже помня что-то, волевым усилием заставить себя временно «забыть» это что-то для решения интеллектуальной задачи. Поскольку объем памяти ограничен, забывание имеет первостепенное значение для удаления из мозга утратившей актуальности информации. Таким образом, забывание расширяет приспособительные возможности поведения. У млекопитающих гибкость поведения связывают с префронтальной корой. В этой области мозга включением активного забывания может подавляться не нужная в данный момент, мешающая принять правильное решение память [29, 30]. Это делает забывание равноценным запоминанию фактором поведенческой гибкости животного. Природа поручила памяти не просто хранение информации, но оптимальное для выживания использование этой информации. Если бы мы помнили всё, что было вчера до мельчайших подробностей, у нас исчезла бы возможность воспринимать происходящее сегодня. Всеобщий принцип гомеостаза, конечно, распространяется и на память. Понятно, что важнейшим инструментом регулирования памяти в мозге является механизм удаления неиспользуемой информации – «активное забывание» [31]. Оно осуществляется деградацией молекулярных и клеточных следов памяти. Временная характеристика этого процесса выражается кривой Эббингауза, созданной им в экспериментах на себе и опубликованной ещё в 1885 г. По Эббингаузу неактуальная информация забывается примерно на 70% уже через 9 ч, затем скорость забывания снижается и через месяц в памяти сохраняется около 20% информации [31]. Конечно это грубая схема, поскольку есть различные типы памяти и скорости забывания. Пассивное забывание мыслится не связанным со способностью мозга целенаправленно разрушать запомненное. В то же время, всё известное о памяти и, в частности, изложенное выше, свидетельствует, что память – это субстрат, структура. Все биологические структуры подвержены конститутивному молекулярному обновлению. В нем видится механизм пассивного забывания. После, прекращения действия фактора, повлиявшего на формирование структуры, продолжающееся всю жизнь молекулярное обновление, протекающее уже без участия того фактора, может обновить структуру с изменением. В результате утратится, закодированная структурой память. Активное забывание связывают с механизмом запоминания, обучения, в который вовлекаются структуры, уже участвующие в ранее созданных, энграммах памяти. Вовлечение таких структур в образование новых энграмм

снижает или устраняет их возможность поддерживать старые энграммы. Здесь различают два варианта. Забывание временное с сохранением энграмм памяти и способности вспомнить забытое при изменении условий. Забывание с разрушением ранее созданных, энграмм – необратимое.

Забывание – одна из жизненно-важных функций сна [32]. Во сне происходит освобождение от неактуальной «замусоривающей» информации. В информационном потоке разделяются «сигнал» и «шум». Это специфическое забывание необходимое для оптимизации сенсорно-моторных синапсов, их рациональной «перезагрузки» для эффективного обучения. Дефицит такого забывания составляет основу интеллектуальной недостаточности и проблем умственного (психического) здоровья. Различают стадию медленного (non-rapid eye movement - NREM) и быстрого (rapid eye movement – REM) сна. По времени первая занимает около 80% общей продолжительности сна [33]. Медленный сон характеризуется низкой частотой ЭЭГ, снижением эмоциональности, ясности, упрощенностью сознания, преимуществом парасимпатической системы (снижением сердечного ритма и частоты дыхания). Быстрый сон ближе к состоянию бодрствования. Повышается частота ЭЭГ, эмоциональность сознания, мышечный тонус, ритм сердца и дыхания.

В 1983 г. Лауреат Нобелевской премии Крик с Митчисоном опубликовали гипотезу [34], что в фазу быстрого сна в нейронных сетях коры происходит процесс обратный механизму запоминания – ослабление связей необязательных, затрудняющих доступ к жизненно важными связям. Предположения Крика и Митчисона впоследствии были подкреплены экспериментами. Так Derégnaucourt с сотрудниками [35] обнаружили, что у обучающихся пению, молодых австралийских птиц – зебровых зябликов сложность песни в течение дня возрастала. Сон каждую ночь уменьшал сложность песни, причем правильные элементы сохранялись, а шумы исчезали. Однако, согласно уточняющим данным гипотеза Крика и Митчисона справедлива для сна вообще, но её связь конкретно с быстрым сном пока не убедительна [36]. REM – сон сохраняет и укрепляет кратковременную память в гиппокампе. Она «стирается» после перемещения в кору, освобождая синапсы краткосрочного хранилища – гиппокампа для кодирования новых объемов памяти [32].

Сегодня при утвердившемся мнении, что сон способствует решению творческих задач, существуют противоречия в том какой вид сна: быстрый или медленный, обеспечивает эту способность. Очень вероятно, что эти противоречия только теоретические, а реаль-

но для творчества равнозначны оба вида сна. Медленный сон важен для абстрагирования, выделения сути информации. А повышенная возбудимость и фрагментарность мысли при быстром сне — идеальное условие для формирования новых, нестандартных связей между порциями (блоками) информации. Иными словами, для озарений, часто бывающих парадоксальными [37].

При обучении, в состоянии бодрствования, происходит образование синаптических связей. Их стабилизация может достигаться как во время бодрствования, так и во сне. Однако направленное ослабление и утрата синапсов, также необходимые для эффективного обучения, специфичны для сна, и дефектность последнего процесса обуславливает различные формы интеллектуальной недостаточности. Сон — занятие опасное, повышающее вероятность гибели животного. Тем не менее, в эволюции он закрепился и развился в большое разнообразие форм: спячка с понижением температуры и скорости обмена, сон одним полушарием мозга попеременно у морских млекопитающих, сон в полете — всё это убедительное свидетельство того, что преимущества сна перекрывают его недостатки. Наиболее вероятно, что забывание тот эволюционный фактор, который обусловил появление и развитие явления — сон. Сегодня имеется много указаний на то, что резкое уменьшение во сне информационного потока из окружающего мира позволяет рассортировать полученную перед сном информацию на забываемый «шум» и запоминаемый «сигнал». По поводу механизмов дифференцировки «шума» и «сигнала» предложено много теорий, даже для краткого изложения которых авторам (Rasch'у и Vogt'у) [38] пришлось написать огромный обзор (86 страниц, 1358 ссылок!). Есть указания, что ни «шум», ни «сигнал» вначале не связаны с синтезом нового белка, а лишь с изменением актина в цитоскелете, обусловленного фосфорилированием [39]. В обобщающей повествовательной форме можно констатировать, что «шум» и «сигнал» различаются, скорее всего, прочностью сформировавшихся в период бодрствования связей. То, что возбуждалось реже или слабее и менее эмоционально спящий мозг относит к «шуму» и забывает. А то, что возбудилось настолько, что достигло порога «сигнала», выходит на молекулярный уровень, достаточный для трансляции, и запоминается [39]. Эта общая для работы мозга схема особо выразительно осуществляется в гиппокампе — своеобразном «фильтре» информации. Запомненная информация во время сна перемещается на долговременное хранение и использование в кору, а не достигшая порога актуальности — забывается. Синхронная консолидация корковых энграмм памяти со «стирани-

ем» энграмм гиппокампа освобождает синапсы гиппокампа для восприятия новых данных [33]. Получается, что сон равно необходим как для запоминания, так и для забывания. Ещё одной функцией гиппокампа является запоминание и кодирование окружающего пространства (пространственная память), в связи с чем он активируется всякий раз, когда необходимо удержать в фокусе внимания внешние ориентиры, определяющие вектор поведения.

Есть сообщение, что одинаково высокая способность формирования кратковременной и долговременной памяти свойственны лишь небольшой доле животных. У большинства же корреляции этих способностей не обнаружено [40].

Приспособление к среде обеспечивается множеством, созданных эволюцией, структурных и функциональных свойств организмов. Их изошренная и, в то же время поразительно естественная, гармония со средой бесконечно превышает все создания человека. Даже современного — много преуспевшего в разгадке и изобретении «чудес». Самый действенный стимул научного исследования, по-видимому, есть, и всегда будет, удивление и восхищение созданиями Природы. Основанное на памяти великолепие приспособления живых существ к жизни на живой Земле — ещё одно свидетельство красивой и мудрой простоты Эволюции.

Литература

4. Павлов И.П. *Рефлекс свободы*. 2011; 202-37.
18. Захарова Е.И., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Монаков М.Ю., Дудченко А.М., Специфичность холинергических механизмов обучения и памяти у крыс с различным уровнем способностей к пространственному обстановочному обучению в водном лабиринте Морриса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 4: 13-20.
20. Грудень М.А., Давыдова Т.В., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Ветрилэ Л.А., Morozova-Roche L.M.A., Sewell R.D.E. Нейропротекторные эффекты антител к глутамату при нарушениях памяти, индуцированных олигомерами провоспалительного белка S100A9, у стареющих животных. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 4: 13-20.
40. Захарова Е.И., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Монаков М.Ю., Дудченко А.М. Независимость механизмов кратковременной и долговременной памяти в пространственной обстановочной модели обучения в водном лабиринте Морриса. *Патогенез*. 2018; 3: 147-50.

References

1. Bain, Alexander. *Mind & Body*. 1873. New York: D. Appleton & Company/
2. Cajal S.R. The croonian lecture. La fine structure des centres nerveux *Proceedings of the Royal Society of London* 1894. 55, 444-68.
3. Delgado-García J.M. Cajal and the conceptual weakness of neural sciences. *Front. Neuroanat.* 2015; 9:128.

4. Pavlov IP. *Reflex of freedom. [Refleks svobody]*. 2011, 202-237. (in Russian)
5. Hebb, Donald. *The Organization of Behavior*. 1949. New York: Wiley & Sons.
6. Andersen, P. Lomo, T. Control of hippocampal output by afferent volley frequency. *Prog. Brain Res.* 1967; 27: 400–12.
7. Ito M. Long-term depression. *Annu Rev Neurosci* 1989; 12: 85-102.
8. Artola A, Singer W. Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 1993; 16: 480-7.
9. Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature.* 1999 May 6; 399(6731): 66-70.
10. Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science.* 1999 Mar 19; 283(5409): 1923-7.
11. Hofer SB, Mrsic-Flogel TD, Bonhoeffer T, Hübener M Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature.* 2009 Jan 15; 457(7227): 313-7.
12. Hayashi-Takagi A, Yagishita S, Nakamura M, Shirai F, Wu YI, Loshbaugh AL, et al. Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature.* 2015; 525(7569): 333–8.
13. Wang DO, Martin KC, Zukin RS. Spatially restricting gene expression by local translation at synapses. *Trends Neurosci.* 2010; 33(4): 173–82.
14. Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C.D., Lin, J.Y., Tsien, R.Y., Malinow, R. Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 2014; 511, 348–52.
15. Gallistel C.R., Balsam P.D. Time to rethink the neural mechanisms of learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2014; 108, 136–44.
16. Trettenbrein P. C. The demise of the synapse as the locus of memory: a looming paradigm shift? *Front. Syst. Neurosci.* 2016; 10:88.
17. Jesse J, Langille, Richard E. Brown. The Synaptic Theory of Memory: A Historical Survey and Reconciliation of Recent Opposition. *Front. Syst. Neurosci.*, 26 October 2018.00052.
18. Zakharova, Storozheeva Z.I., Proshin A.T., MonakovM. Yu., Dudchenko A.M. Specificity of cholinergic mechanisms of learning and memory in rats with different levels of ability contextual learning in the Morris water maze. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2018; 62(4): 13-20. (in Russian)
19. Choi JH, Sim SE, Kim JI, Choi DI, Oh J, Ye S et al. Interregional synaptic maps among engram cells underlie memory formation *Science.* 2018 Apr 27; 360(6387): 430-5.
20. Gruden M.A., Davydova T.V., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Vetriele L.A., Morozova-Roche L.M., Sewell R.D.E. [Neuroprotective effects of glutamate antibodies on memory impairment induced by proinflammatory S100A9 protein oligomers in aging animals]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya [Pathological physiology and experimental therapy]* 2017, №4, 13-20. (in Russian)
21. Petralia RS1, Wang YX, Hua F, Yi Z, Zhou A, Ge L et al. Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience.* 2010 Apr 28;167(1):68-87.
22. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2010 Oct;11(10):682-9.
23. Oliet S.H.R. Piet R. Poulain D.A Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science.* 2001; 292: 923-926.
24. Panatier A1, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA et al. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell.* 2006 May 19;125(4):775-84.
25. Billard JM. Serine racemase as a prime target for age-related memory deficits. *Eur J Neurosci.* 2013 Jun; 37(12):1931-8.
26. Billard JM. D-Serine in the aging hippocampus. *J Pharm Biomed Anal.* 2015 Dec 10;116:18-24.
27. Coyle JT, Balu DT The Role of Serine Racemase in the Pathophysiology of Brain Disorders. *Adv Pharmacol.* 2018;82:35-56.
28. Billard JM. Changes in Serine Racemase-Dependent Modulation of NMDA Receptor: Impact on Physiological and Pathological Brain Aging. *Front Mol Biosci.* 2018 Nov 28;5:106.
29. Norman KA, Newman EL, Detre G. A neural network model of retrieval-induced forgetting. *Psychol. Rev.* 2007;114:887–953.
30. Bekinschtein P, Weisstaub NV, Gallo F, Renner M, Anderson MC A retrieval-specific mechanism of adaptive forgetting in the mammalian brain. *Nat Commun.* 2018 Nov 7;9(1):4660.
31. Davis R. L., Zhong Y. The biology of forgetting -A Perspective. *Neuron* 2017, 95, 490–503.
32. Poe G.R. Sleep Is for Forgetting *J Neurosci.* 2017 Jan 18; 37(3): 464–473.
33. Langille. J. J. Remembering to Forget: A Dual Role for Sleep Oscillations in Memory Consolidation and Forgetting. *Front. Cell. Neurosci.*, 12 March 2019 |.00071.
34. Crick F, Mitchison G. The function of dream sleep. *Nature.* 1983 Jul 14-20;304(5922):111-4.
35. Derégnaucourt S, Mitra PP, Fehér O, Pytte C, Tchernichovski O B How sleep affects the developmental learning of bird song. *Nature.* 2005 Feb 17;433(7027):710-6.
36. Rasch B, Born J About sleep's role in memory. *Physiol Rev.* 2013 Apr;93(2):681-766.
37. Lewis PA, Knoblich G, Poe G How Memory Replay in Sleep Boosts Creative Problem-Solving. *Trends Cogn Sci.* 2018 Jun;22(6):491-503.
38. Rasch B, Born J About sleep's role in memory. *Physiol Rev.* 2013 Apr;93(2):681-766.
39. Seibt J, Frank M. G. Primed to Sleep: The Dynamics of Synaptic Plasticity Across Brain States. *Front. Syst. Neurosci.*, 01 February 2019 | 00002.
40. Zakharova, Storozheeva Z.I., Proshin A.T., MonakovM. Yu., Dudchenko A.M. [Independence of mechanisms for short-term and long-term memory in spatial contextual learning in the Morris water maze]. *Patogenez [Pathogenesis]* 2018.03.147-150 (in Russian).

Сведения об авторах:

Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО, лауреат Государственной премии СССР.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-009.7

Овсянников В.Г., Бойченко А.Е., Алексеев В.В., Каплиев А.В., Шумарин А.Е., Котиева И.М., Алексеева Н.С., Вартанян Э.Э., Кутузова А.А., Гулян М.В.

Антиноцицептивная система. Эндогенные механизмы обезболивания

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, г. Ростов-на-Дону, Россия, пер. Нахичеванский, д. 29

Представлен обзор современных данных по изучению антиноцицептивной системы и эндогенных механизмов обезболивания. Контроль болевой чувствительности осуществляется многими структурами ЦНС, каждая из которых функционирует как самостоятельное образование. В комплексе все они входят в состав сложной системы антиноцицепции, аналогично тому, как ощущение боли является результатом интегративной функции ЦНС. Данное сообщение посвящено анализу роли информации, поступающей по толстым миелиновым волокнам в задние рога спинного мозга и нисходящих тормозных влияний на уровне задних рогов спинного мозга. Охарактеризованы структуры, влияющие на антиноцицепцию. На уровне спинного мозга обнаружены два механизма подавления боли – это сегментарный контроль и система нисходящего тормозного контроля. По современным данным обезболивающие эффекты объясняются не только сегментарным контролем, но и включением надсегментарных механизмов контроля, в т.ч. и гуморальных. Центральные структуры головного мозга оказывают не только нисходящее влияние на спинальном уровне, но и модифицируют болевые сигналы в местах их переключения в различных структурах головного мозга. Нисходящая ингибиторная система тесно взаимосвязана с тремя нейротрансмиттерными системами: опиатной, норадренергической и серотонинергической. Возникновение боли зависит не только от интенсивности ноцицептивного повреждения, но и от состояния различных звеньев антиноцицептивной системы. На основании знаний о патогенезе острой боли, структуре и функции антиноцицептивной системы дается определение понятия «боль».

Ключевые слова: боль, антиноцицепция, обезболивание, патогенез, структуры мозга.

Для цитирования: Овсянников В.Г., Бойченко А.Е., Алексеев В.В., Каплиев А.В., Шумарин А.Е., Котиева И.М., Алексеева Н.С., Вартанян Э.Э., Кутузова А.А., Гулян М.В. Антиноцицептивная система. Эндогенные механизмы обезболивания. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63 (4): 130-136.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.130-136

Для корреспонденции: Алексеева Наталья Сергеевна, e-mail: alekseeva_ns@rostgmu.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.03.2019

Ovsyannikov V.G., Boychenko A.E., Alekseev V.V., Kapliev A.V., Shumarin A.E., Kotieva I.M., Alekseeva N.S., Vartanyan E.E., Kutuzova A.A., Gulyan M.V.

The antinociceptive system. Endogenous mechanisms of pain control

Department of Pathological Physiology, Rostov State Medical University, Pereulok Nakhichevansky 29, Rostov-on-Don 344022

This review focused on the antinociceptive system and endogenous mechanisms of pain control. Multiple structures of the central nervous system control the pain sensitivity, and each of them functions as an independent entity. Together they constitute a complex system of antinociception consistent with that the sensation of pain is provided by integrative functioning of the central nervous system. This review analyzed the role of information delivered through thick myelin fibers to posterior horns and descending inhibitory effects at the level of the posterior horns. Two pain relief mechanisms were found at the spinal level, the segmental control and the descending inhibitory control system. According to current data anesthetic effects are explained not only by the segmental control but also by involvement of suprasegmental control mechanisms, including humoral ones. Central structures both exert downstream effects at the spinal level and modify pain signals at the locations where they switch over in various cerebral structures. The descending inhibitory system is closely interrelated with three neurotransmitter systems, the opiate, noradrenergic and serotonergic ones. Emergence of pain depends on both the intensity of nociceptive damage and on the condition of multiple parts of the antinociceptive system. Based on studying the pathogenesis of acute pain and the structure and function of antinociceptive system the authors provided a definition for the term of pain.

Keywords: pain; antinociception; anesthesia; pathogenesis; brain structures.

For citation: Ovsyannikov V.G., Boychenko A.E., Alekseev V.V., Kapliev A.V., Shumarin A.E., Kotieva I.M., Alekseeva N.S., Vartanyan E.E., Kutuzova A.A., Gulyan M.V. The antinociceptive system. Endogenous mechanisms of pain control. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 130-136 (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.130-136

For correspondence: **Natalya S. Alekseeva**, Ph.D. in Medicine (pathological physiology). Associate Professor of the Department of pathological Physiology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; 29 Nakhichevskiy Lane, Rostov-on-Don 344022, Russian Federation, e-mail: alekseeva_ns@rostgmu.ru

Information about authors:

Ovsyannikov V.G., <https://orcid.org/0000-0002-8775-0781>

Boychenko A.E., <https://orcid.org/0000-0001-8034-7044>

Alekseev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-8055-2184>

Kapliev A.V., <https://orcid.org/0000-0002-7337-3241>

Alekseeva N.S., <https://orcid.org/0000-0002-5280-6511>

Shumarin A.E., <https://orcid.org/0000-0002-1295-3912>

Kotieva I.M., <https://orcid.org/0000-0001-7657-4762>

Vartanyan E.E., <https://orcid.org/0000-0002-5371-7764>

Kutuzova A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9289-355X>

Gulyan M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6023-8916>

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 01.03.2019

Контроль болевой чувствительности осуществляется многими структурами ЦНС, каждая из которых функционирует как самостоятельное образование. В комплексе все они входят в состав сложной системы антиноцицепции, аналогично тому, как ощущение боли является результатом интегративной функции ЦНС. Возникновение боли, как уже говорилось, зависит не только от интенсивности ноцицептивного повреждения, но и от состояния различных звеньев антиноцицептивной системы.

В модуляции боли, снижении ее интенсивности и исчезновении важная роль принадлежит трем важнейшим механизмам антиноцицепции:

1. Аfferентной информации, поступающей в задние рога спинного мозга от тактильных, температурных рецепторов и рецепторов глубокой чувствительности;

2. Структурам головного мозга, формирующим тормозные нисходящие влияния на уровне задних рогов спинного мозга;

3. Гуморальным механизмам антиноцицепции.

Ранее [1] мы анализировали роль гуморальных факторов (эндогенных опиатов, норадреналина, дофамина, серотонина, ацетилхолина, ГАМК, каннобиноидов и орексина), образующихся при формировании болевой ощущения и играющих важную роль в обезболивании. Проанализированы также механизмы их антиноцицептивного действия.

Данное сообщение посвящено анализу роли информации, поступающей по толстым миелиновым во-

локнам в задние рога спинного мозга и нисходящим тормозным влияниям на уровне задних рогов спинного мозга.

Роль информации, поступающей по толстым миелинизированным волокнам в задние рога спинного мозга в антиноцицепции. Поступающая в спинной мозг по толстым миелиновым волокнам (A α и A β) информация от тактильных, температурных и проприорецепторов стимулирует образование нейронами задних рогов энкефалинов и эндорфинов. Они тормозят образование и выделение в пресинаптическую щель субстанции P из пресинаптической терминали. Конечным итогом является подавление передачи болевой импульса в ЦНС и невозможность формирования болевой ощущения (**рис. 1**).

Классическим примером такой модуляции боли является уменьшение болевой ощущения при массаже, тепловом прогревании, физиопроцедурах, акупунктуре. В то же время, дефицит информации по толстым миелиновым волокнам (например, при ампутации конечностей) способствует формированию фантомной боли, вследствие снижения образования эндогенных опиатов в задних рогах спинного мозга. При этом, вероятно, нейроны задних рогов спинного мозга начинают спонтанно генерировать импульсы, вследствие их деполяризации, которые, поступая по проводящим болевым путям в соматосенсорные проекции отсутствующей конечности, формируют болевое ощущение [2, 3].

Роль нисходящих тормозных влияний антиноцицепции. При формировании вторичной или нелокали-

зованной боли болевые импульсы вызывают возбуждение ряда важнейших зон головного мозга: гигантоклеточного ядра, ядра шва, центрального серого околотовопроводного вещества (ЦСОВ), миндалина, островка, передней и задней поясной коры, префронтальной области коры головного мозга. Именно эти структуры головного мозга рассматриваются как важные центры, формирующие нисходящие тормозные влияния на уровне задних рогов спинного мозга (рис. 2).

По мнению Н. Jones и соавт. [4] нисходящие влияния идут из коры мозга, включая лобную долю коры мозга и переднюю поясную кору, гипоталамус, миндалину, серое околотовопроводное вещество (aqueductus gra), ствол мозга и проявляют тормозный эффект на уровне задних рогов спинного мозга. Реализация нисходящих тормозных влияний осуществляется через ЦСОВ и ядра шва с выделением на уровне задних рогов спинного мозга ряда гуморальных факторов (энкефалины, норадреналин, дофамин, серотонин, ГАМК). Поэтому нисходящие тормозные влияния обозначаются как энкефалин-, серотонин-, адрен-, ГАМК-ергические [4–6] (рис. 2).

Большое количество опиатных рецепторов обнаружено в ЦСОВ и желатинозной субстанции спинного мозга. По данным R. Daroff [5] предшественники опиоидов обнаружены в миндалине, гипоталамусе, ЦСОВ, ядрах шва и задних рогах спинного мозга. Энкефалины, как эндогенные опиаты, высвобождаются

нейронами спинного мозга и в зависимости от взаимодействия с опиатными μ -рецепторами постсинаптической терминали нейрона, гиперполяризуют мембрану путем открытия калиевых каналов, делая невозможной передачу импульса в ЦНС.

Серотонинергические нейроны сосредоточены преимущественно в ЦСОВ, ростральном вентромедиальном отделе продолговатого мозга, ядрах шва [5]. Именно серотонинергические нисходящие пути рассматриваются как главная эндогенная модуляторная система и главная мишень супраспинальной анальгезии. Показано, что введение серотонина в спинной мозг вызывает анальгезию. Более того, блокада обратного захвата серотонина трициклическими антидепрессантами уменьшает боль и увеличивает количество серотонина.

Норадренергические нейроны локализируются в голубом пятне и покрышке мозга. Нисходящие адренергические влияния подавляют поток болевых импульсов на уровне задних рогов спинного мозга через взаимодействие с пресинаптическими α_2 -адренорецепторами терминали первого нейрона болевой системы. Увеличивается входящий ток Ca^{2+} в пресинаптическую терминаль, что блокирует выделение в синаптическую щель основных нейротрансмиттеров боли – глутамата и субстанции P [4].

Дофаминергические нейроны сосредоточены в заднем отделе околожелудочковой области таламуса. Их возбуждение болевыми импульсами вызывает высво-

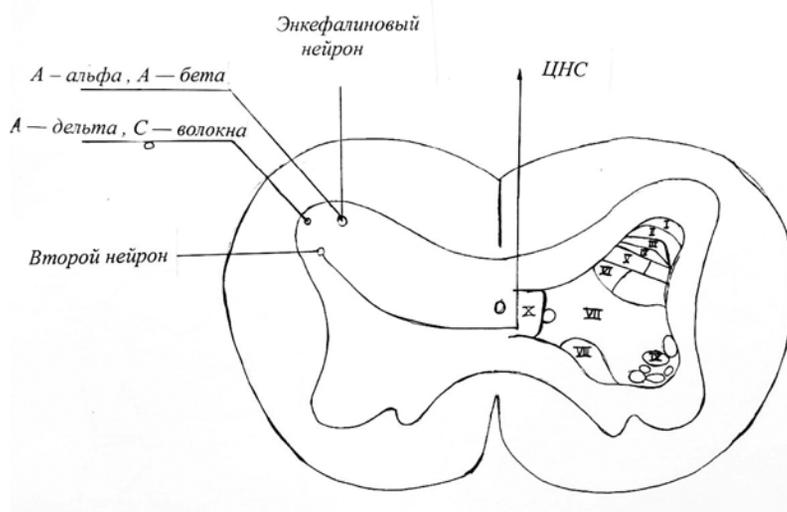


Рис. 1. Блокада передачи болевого импульса эндогенными опиатами (энкефалины) на уровне задних рогов спинного мозга под влиянием афферентации по толстым миелиновым волокнам (А α и А β).

бождение дофамина, который, взаимодействуя с D_2 рецепторами, ослабляет реакцию на боль.

Таким образом, на уровне спинного мозга обнаружены два механизма подавления боли — это сегментарный контроль и система нисходящего тормозного контроля. Сегментарный контроль осуществляется на уровне задних рогов спинного мозга в желатинозной субстанции. Согласно воротной теории P.Wall и R.Melzack [8], восприятие боли зависит от баланса между притоком по толстым нервным волокнам импульсов, возникающих в результате действия неповреждающих факторов (например, поглаживание, растирание, не болевое электрораздражение, акупунктура) и по нервным волокнам малого диаметра (Аδ и С волокна), как следствия действия на ткани повреждающих факторов. Если доминирует приток импульсов по таким болевым афферентам,

то активируются спинно-таламические пути и формируется болевое ощущение. Если доминирует приток импульсов по толстым волокнам нейрона, то возникает пре-синаптическое торможение, входные ворота для болевой информации закрываются (отсюда и название теории боли - «теория входных ворот»), следовательно, спинно-таламические пути не активируются и боль не возникает. Правомочность этой концепции подтверждает эффективность обезболивания при поглаживании или растирании кожи после удара, чрезкожной стимуляции, акупунктуре. По современным данным, эти обезболивающие эффекты объясняются не только сегментарным контролем, но и включением надсегментарных механизмов контроля, в т.ч. и гуморальных.

Обнаружена гипоталамо-спинальная система торможения боли. Аксоны нейронов паравентрикулярного, медиального преоптического ядра, дорсальных отделов гипоталамуса спускаются в спинной мозг и, заканчиваясь в желатинозной субстанции, осуществляют супраспинальный контроль болевой чувствительности на уровне спинного мозга. Эта система активируется анальгетиком циклозоцином [9].

Важное значение в обезболивании на уровне спинного мозга принадлежит нисходящим антиноцицептивным влияниям, которые осуществляются в желатинозной субстанции задних рогов через α_2 -, серотониновые и μ , δ , κ -опиатные рецепторы. Местом приложения действия морфия и морфомиметиков является и желатинозная субстанция спинного мозга. Этот обезболивающий эффект блокируется налуксоном. В настоящее время многие исследования подтверждают, что эндогенные опиаты, как и препараты опиата, блокируют выделение субстанции Р нейронами задних рогов спинного мозга. Уменьшение или отсутствие медиатора боли (субстанции Р) является, вероятно, тем механизмом, который вызывает обезболивание на уровне задних рогов спинного мозга, т.е. осуществляет «воротный» контроль боли. Значение серотонина в обезболивании на спинальном уровне подтверждается наблюдением, что уменьшение серотонина в спинном мозге снижает интенсивность морфиновой анестезии. Обезболивающий эффект антидепрессантов связан с блокадой обратного захвата катехоламинов и серотонина. А.А. Панин и А.А. Карелин [10] считают это следствием влияния нисходящих волокон, а не существованием спинальных серотонинергических нейронов.

Система супраспинального контроля обусловлена влиянием на спинной мозг различных структур головного мозга. Это связано с такими структурами как перивентрикулярные зоны, периакведуктальные субстанции, ядра шва ствола мозга [11].

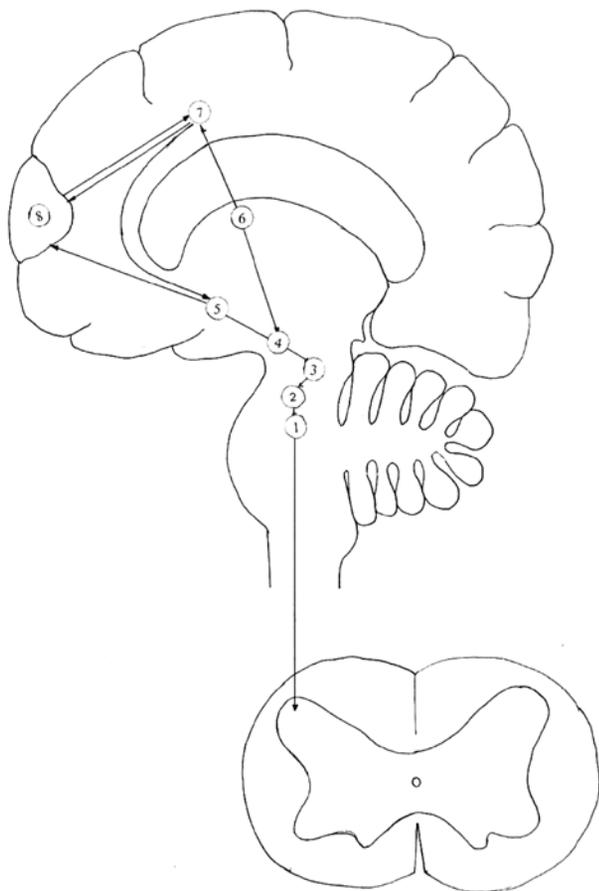


Рис. 2. Схема нисходящих тормозных влияний на уровне задних рогов спинного мозга.

1 – гигантоклеточное ядро, 2 – ядра шва, 3 – центральное серое околоводопроводное вещество (ЦСОВ), 4 – гипоталамус, 5 – миндалина, 6 – островок, 7 – передняя и задняя поясная кора, 8 – фронтальная кора.

По данным В.Н. Шток [9], антиноцицепция зрительного бугра связана с ретикулярным таламическим ядром, при стимуляции которого тормозные импульсы идут к другим ядрам зрительного бугра.

Установлено, что контроль болевой чувствительности системой ЦСОВ – ядра шва не зависит от влияния опиатной системы. В клинике при сильных болях у неоперабельных больных используется стимуляция через вживленные электроды ядер гипоталамуса и ЦСОВ, составляющих важное звено в противоболевой системе [12]. При этом воздействие постоянного тока и прямоугольных импульсов с частотой 77 Гц через 10–15 мин после включения тока вызывает адаптацию к боли, которая продолжается 8–12 ч после его выключения. Эксперименты на животных и клинические наблюдения показывают, что раздражение центрального серого околотоводопроводного вещества, ядер шва, ядер покрышки среднего мозга, черной субстанции, голубого пятна, ростральной части хвостатого ядра и перегородки вызывает анальгезию [13]. Установлено, что эти эффекты связаны с такими гуморальными факторами как эндорфины и энкефалины, серотонин, норадреналин, а также активацией ГАМК и глицина. Есть основание полагать, что нисходящими путями антиноцицептивной системы являются норадреналин-, серотонин-, дофамин-, а также опиоид-ергические пути. Так, по современным данным, адренергические нисходящие антиноцицептивные пути начинаются преимущественно в центральном сером околотоводопроводном веществе и ретикулярной формации, серотонинергические – из ядер шва, а опиоидергические – из ядер шва и ретикулярной формации. Последние реализуются через энкефалины и β -эндорфин. Если адренергические влияния опосредуются через пре- и постсинаптические α -адренорецепторы, то эндогенные опиоиды действуют пресинаптически, ингибируя освобождение субстанции *P*. Анализ нисходящих анальгетических влияний констатирует, что при активации ядер шва это происходит через серотонинергические нисходящие влияния; при стимуляции парагигантоклеточного ядра анальгезия возникает за счет эндорфин- и норадренергических систем, а при стимуляции синего пятна в вентральной части ретикулярной формации моста за счет НА-ергических нисходящих влияний на задние рога спинного мозга. Хвостатое ядро, черная субстанция и красное ядро также выполняют функции антиноцицепции.

Центральные структуры головного мозга оказывают не только нисходящее влияние на спинальном уровне, но и модифицируют болевые сигналы в местах их переключения в различных структурах головного мозга. Имеются многочисленные наблюдения, когда раз-

дражение ряда структур мозга приводит к ослаблению боли или эффекту обезболивания и, напротив, их разрушение усиливает боль. Последнее свидетельствует о том, что выключение отдельных компонентов антиноцицептивной системы усиливает боль, и косвенно подтверждает постоянное тормозное влияние антиноцицептивной системы на болевые проводящие пути и формирование боли.

Анальгетическая система головного мозга включает кору больших полушарий, ядра гипоталамуса (паравентрикулярные и медиальные преоптические ядра дорсального отдела), ЦСОВ, ядра шва, гигантоклеточное ядро. При активации медиальных ядер гипоталамуса, центрального серого околотоводопроводного вещества, ядер шва и ретикулярной формации развивается мощная анальгезия. При разрушении же центрального пучка покрышки дорсомедиальных ядер гипоталамуса, таламуса, введении столбнячного токсина в задние рога спинного мозга, зрительный бугор, ядра тройничного нерва резко усиливаются болевые ощущения или возникают спонтанные боли [8, 14–16].

Таким образом, болевые импульсы поступающие в центральную нервную систему по палеоспиналоталамическому тракту вызывают возбуждение ряда структур ЦНС, выполняющих антиноцицептивную функцию (гигантоклеточное ядро, ядра шва, ЦСОВ, гипоталамус, кора мозга) за счет так называемых нисходящих ГАМК-, энкефалин-, серотонин-, адренергических тормозных влияний на уровне задних рогов спинного мозга.

Нисходящие ГАМК-, норадреналин-, опиоидергические тормозные влияния на уровне задних рогов спинного мозга осуществляются путем освобождения таких нейротрансмиттеров как ГАМК, норадреналин и эндогенные опиаты (энкефалины и эндорфины). Механизм их тормозных влияний различен, но в целом обусловлен уменьшением поступления кальция и натрия в пресинаптические терминалы или гиперполяризацией, то есть выходом калия из постсинаптической терминалы [17–20].

ГАМК – соединяется с ГАМКв-рецепторами, активирует калиевые каналы и формирует гиперполяризацию постсинаптической терминалы, препятствуя, таким образом, передаче болевого импульса в ЦНС.

Норадреналин возбуждает α 2-рецепторы, что способствует увеличению выхода калия из постсинаптической терминалы, формируя ее гиперполяризацию.

Эндорфины и энкефалины взаимодействуя с μ - и δ - опиоидными рецепторами, стимулируют усиленный выход калия из постсинаптической терминалы и тормозят передачу болевого импульса в ЦНС. Полагают также [19], что нисходящие волокна, поступающие

из структур головного мозга в задние рога спинного мозга, выделяют серотонин, который стимулирует выделение энкефалина. Последний вызывает пре- и пост-синаптическое торможение, вследствие чего болевые импульсы, поступающие в спинной мозг по А-дельта и С-волокам, не формируют болевое ощущение и двигательную реакцию спинального уровня (отдергивание, отпрыгивание).

В целом нисходящая тормозная система тесно взаимосвязана с тремя нейротрансмиссивными системами: опиатной, норадренергической и серотонинергической [5]. Эндогенные опиоиды (β -эндорфин, мет- и лейцинэнкефалин, динорфин) обнаружены в миндале (amygdala), гипоталамусе, ЦСОВ, ядрах шва. Норадренергические волокна нейронов ствола мозга и моста через заднелатеральный канатик спинного мозга достигают задних рогов спинного мозга. Стимуляция этих областей головного мозга или введение такого агониста α_2 -адренорецепторов как клонидин формирует аналгезию. Что касается серотонинергических нейронов, то много их обнаруживается в ядрах шва. Их аксоны спускаются в спинной мозг и в составе заднелатерального канатика достигают также задних рогов спинного мозга. Введение серотонина в спинной мозг формирует аналгезию, а повреждение ядер шва снижает интенсивность морфиновой аналгезии. Установлено, что трициклические антидепрессанты и ингибиторы обратного захвата в синапсах серотонина и адреналина снижают интенсивность боли поскольку, полагают, это связано с увеличением их концентрации в нейронах нисходящих ингибиторных путей.

На основании изучения патогенеза острой боли, структуры и функции антиноцицептивной системы нами [21–23] было дано следующее определение понятия боль. «Боль – это типовой, выработанный в ходе эволюции патологический процесс, который возникает при действии повреждающих факторов (аллогенов) или ослаблении противоболевой системы и характеризуется перцепцией, активацией вегетативных, эмоциональных, двигательных реакций, изменением памяти и обязательной активацией различных звеньев противоболевой системы. Эти изменения направлены на исчезновение боли, восстановление поврежденного участка и, в конечном итоге, гомеостаза». Иными словами в самом формировании боли заложены механизмы ее нивелирования.

Литература/References

- Ovsyannikov V.G., Boichenko A.E., Kotieva I.M., Alekseev V.V., Kapliev A.V., Alekseeva N.S. Antinociceptive system. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii*. 2014; 3: 46-54. (in Russian)

- Kryzhanovskiy G.N., Danilova Y.I., Grafova V.N., Reshetnyak V.K. Features of the development of pain syndromes in the interaction of generators of pathologically enhanced excitation. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1994; 118(10): 364-67. (in Russian)
- Kryzhanovskiy G.N. Pathological integration in the nervous system. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2000; 129(2): 124-8. (in Russian)
- Jones H.R., Burns T.M., Aminoff M.J., Pomeroy S.L. *Pain pathways anatomy ascending pathways endorphin system. The Netter collection of medical illustrations: spinal cord and peripheral motor and sensory systems*. Second Edition; 2013 (Section 8): 201-24.
- Daroff R.B., Fenichel G.M., Jankovic J., Mazziotto J.C. *Principles of Pain Management*. Bradley, Neurology in Clinical Practice, Sixth Edition; 2012. Chapter 44: 783-801.
- Hemmings H.C., Talmage D.E. *Pharmacology and physiology for anesthesia: foundations and clinical application*. 2013.
- Winn H.R. *Youmans Neurological Surgery*. 2011.
- Wall P., Melzack R. *Textbook of pain*. Livingstone Edinburgh; 1994.
- Shtok V.N. *Headache. [Golovnaya bol']*. Moscow; 1988. (in Russian)
- Panin A.A., Karelin A.A. opiate receptors, endorphins and their antagonists. *Anestezjologiya i reanimatologiya*. 1984; 4: 52-61. (in Russian)
- Bragin E.O. Neurochemical mechanisms of pain sensitivity regulation. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 1985; 16(1): 21-42. (in Russian)
- Serkov F.N., Kazakov V.N. *Neurophysiology of the thalamus. [Neurofiziologiya talamusa]*. Kiev; Naukova Dumka; 1980. (in Russian)
- Kukushkin M.L., Tabeeva G.R., Podchufarova E.V. *Pain syndrome: pathophysiology, clinic, treatment. Clinical guidelines. [Bolevoy sindrom: patofiziologiya, klinika, lecheniye. Klinicheskiye rekomendatsii]*. Moscow; IMA-PRESS; 2011. (in Russian)
- Kryzhanovsky G.N., Grafova V.N., Danilova E.Z., Igonkina S.N., Sakharova O.P. Pain syndrome of spinal origin. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1973; 9: 31-5. (in Russian)
- Kryzhanovsky G.N., Grafova V.N., Danilova E.Z., Igonkina S.N. The study of pain syndrome of spinal origin (to the concept of the generator mechanism of pain syndrome). *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1974; 7: 15-20. (in Russian)
- Wall P., Melzack R. *Textbook of pain*. Edinburgh; Elsevier Churchill-Livingstone; 2005.
- Kharkevich D.A. *Pharmacology. [Farmakologiya]*. Moscow; Geotar-Media; 2017. (in Russian)
- Babos M.B., Grady B., Wisnoff W., McGhee Ch. *Pathophysiology of Pain*. Disease-a-Month; 2013; 59(10): 330-58.
- Hall J.E. *Somatic Sensations*. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology; 2011.
- Suzuki R., Dickenson A.H. *Nociception: basic principles*. Cambridge Books Online; 2003.
- Ovsyannikov V.G. *Pain (etiology, pathogenesis, principles and mechanisms of treatment). [Bol' (etiologiya, patogenez, printsipy i mekhanizmy lecheniya)]*. Rostov-on-Don; 1990 (in Russian)
- Ovsyannikov V.G. *Essays on the pathophysiology of pain [Ocherki patofiziologii boli]*. Rostov-on-Don; 2003. (in Russian)
- Ovsyannikov V.G., Kapliev A.V., Shumarin A.E. *Ontogenetic features of central aminergic mechanisms in normal and acute somatic pain. [Ontogeneticheskiye osobennosti tsentral'nykh aminergicheskikh mekhanizmov v norme i pri ostroy somaticheskoy boli]*. Rostov-on-Don; 2012. (in Russian)

Сведения об авторах:

Овсянников Виктор Григорьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. пат. физиол. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России;
Бойченко Александр Евгеньевич, канд. мед. наук, проф., каф. пат. физиол. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, доцент;
Алексеев Владимир Вячеславович, канд. мед. наук, доцент, каф. пат. физиол. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России;
Каплиев Андрей Викторович, канд. мед. наук, доцент, каф. пат. физиол. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России;
Шумарин Александр Евгеньевич, канд. мед. наук доцент, каф. пат. физиол. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России;
Котиева Инга Мовлиевна, канд. мед. наук доцент, каф. пат. физиол. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России;
Алексеева Наталья Сергеевна, канд. мед. наук, доцент каф. пат. физиол. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России;
Вартамян Эмма Эмильевна, канд. биол. наук, ассистент каф. пат. физиол. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России;
Кутузова Александра Александровна, канд. мед. наук, доцент, каф. пат. физиол. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России;
Гулян Марина Владимировна, канд. мед. наук, ассистент каф. пат. физиол. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-006.6:577.21:615-015

Бурденный А.М.^{1,2}, Лукина С.С.³, Заварыкина Т.М.², Пронина И.В.¹, Бреннер П.К.^{2,4}, Капралова М.А.^{2,4}, Аткарская М.В.², Филиппова Е.А.¹, Иванова Н.А.¹, Круглова М.П.³, Белова М.В.³, Бахрушина Е.О.³, Брага Э.А.^{1,5}, Логинов В.И.^{1,5}

Фармакогенетика лекарственных веществ при раке молочной железы и новые возможности улучшения их биодоступности

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

² ФГБНУ «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля» РАН, 119334, г. Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4;

³ ФGAOУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8;

⁴ ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», 109472, г. Москва, Россия, ул. Академика Скрябина, д. 23;

⁵ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», 115522, г. Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1

В работе была проанализирована отечественная и зарубежная литература, в которой рассматривается фармакогенетический подход к лечению рака молочной железы, а также приведены результаты клинических исследований, в которых показана роль молекулярно-генетических маркеров в эффективности терапии рака молочной железы. Известно, что аллельные варианты генов могут иметь различное влияние на эффективность лекарственных веществ. Фармакогенетическое значение имеют любые как наследуемые (герминальные), так и случайные (соматические) изменения в геноме пациенток. Как правило, для оценки эффективности и токсичности лекарственных веществ используются наследуемые генетические варианты, в то же время, случайные мутации, а также другие известные для опухолевого генома изменения используются при выборе схемы лечения и создания задела для увеличения эффективности терапии. Одним из перспективных и стремительно развивающихся направлений современной фармакологии является адресная доставка лекарственных препаратов к опухоли. В обзоре обобщаются новые актуальные разработки в области направленного транспорта лекарственных веществ в опухолевую ткань.

Ключевые слова: рак молочной железы; фармакогенетика; транспорт веществ; лекарственные мишени; персонализированная терапия.

Для цитирования: Бурденный А.М., Лукина С.С., Заварыкина Т.М., Пронина И.В., Бреннер П.К., Капралова М.А., Аткарская М.В., Филиппова Е.А., Иванова Н.А., Круглова М.П., Белова М.В., Бахрушина Е.О., Брага Э.А., Логинов В.И. Фармакогенетика лекарственных веществ при раке молочной железы и новые возможности улучшения их биодоступности. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2019; 63(4): 137-150.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.137-150

Для корреспонденции: Бурденный Алексей Михайлович, e-mail: burdenny@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 2019

Burdennyu A.M.^{1,2}, Lukina S.S.³, Zavarykina T.M.², Pronina I.V.¹, Brenner P.K.^{2,4}, Kapralova M.A.^{2,4}, Atkarskaya M.V.², Filippova E.A., Ivanova N.A., Kругlova M.P.³, Belova M.V.³, Bahrushina E.O.³, Braga E.A.^{1,5}, Loginov V.I.^{1,5}

Pharmacogenetics of drugs in breast cancer and new approaches for improvement of their bioavailability

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia;

² Institute for Biochemical Physics, Kosygina Str. 4, Moscow 119334, Russia;

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Moscow 119991, Russia;

⁴ K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Akademika Skryabina Str. 23, Moscow 109472, Russia;

⁵ Research Centre for Medical Genetics, Moskvorechje Str. 1, Moscow 115522, Russia

This review analyzed Russian and international studies focusing on the pharmacogenetic approach to treatment of breast cancer. Also, the authors presented results of clinical studies, which showed the role of molecular genetic markers in the efficacy of breast cancer therapy. Allelic variants of different genes have been shown to exert different influences on drug effects. Both inherited and somatic changes in the patient's genome are pharmacogenetically significant. Inherited genetic variants are generally used for evaluating efficacy and toxicity of drugs while somatic mutations and other known changes in tumor cells are used primarily for selection of treatment and creation of a base for enhancing the effectiveness of therapy. A promising and rapidly developing field of modern pharmacology is targeted delivery of drugs to the tumor. This review summarized state-of-the-art knowledge of new developments in transport of drugs to tumor tissue.

Keywords: breast cancer; pharmacogenetics; efflux transporters; drug targets; personalized therapy.

For citation: Burdenny A.M., Lukina S.S., Zavarykina T.M., Pronina I.V., Brenner P.K., Kapralova M.A., Atkarskaya M.V.², Filippova E.A., Ivanova N.A., Kruglova M.P., Belova M.V., Bahrushina E.O., Braga E.A., Loginov V.I. Pharmacogenetics of drugs in breast cancer and new approaches for improvement of their bioavailability. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2019; 64(4): 137-150. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.137-150

For correspondence: *Burdenny Alexey Mikhailovich*, e-mail: burdenny@gmail.com

Information about authors:

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

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

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Recieved

Введение

Рак можно с уверенностью отнести к заболеваниям, имеющим генетическую природу [1]. К генетическим факторам, приводящим к злокачественной трансформации, относят: мутации, в том числе наследуемые (т.н. семейные), однонуклеотидные замены в генах ключевых процессов, например, репарации ДНК, делеции или вставки в ключевых районах, например, промоторных областях, а также другие генетические или эпигенетические изменения, влияющие на регуляцию биологических процессов в клетке. Подобные нарушения могут носить как наследственный, так и спорадический характер. Выявление генетических нарушений, характерных для определенного вида рака — важнейший ключ к персонализации лечения этого заболевания [2]. Не менее важным является знание индивидуальных особенностей организма пациента, влияющих на эффективность лечения и развитие побочных эффектов, что обеспечивает возможность индивидуального подбора лекарственных препаратов и их дозировки для конкретного пациента.

На сегодняшний день известно, что наследуемые варианты генов (герминальные мутации и/или полиморфизмы) являются важными факторами при выборе тактики лечения [3]. Для более точного понимания механизмов, лежащих в основе индивидуального ответа на тот или иной препарат требуются исследования в области фармакогенетики и фармакогеномики для этих лекарственных веществ (ЛВ) [4]. К задачам фармакогенетики следует отнести изучение роли от-

дельных вариантов генов, которые потенциально могут быть вовлечены в ответ опухоли на ЛВ, тогда как задачи фармакогеномики гораздо шире и затрагивают взаимодействия между генами, включая целые генные пути, нарушения в которых могут влиять на эффективность действия ЛВ [3]. Наиболее значимо на фармакокинетику и фармакодинамику ЛВ влияют однонуклеотидные замены, или однонуклеотидные полиморфные маркеры, приводящие к изменению структуры белкового продукта гена и имеющие достаточно высокую частоту встречаемости в популяции. Их влияние выражается в том, что при определенных вариантах гена, введение того или иного препарата может не давать требуемого эффекта или быть малоэффективным. Это может быть связано с нарушением транспорта и метаболизма ЛВ, изменением структуры мишени конкретного препарата [3]. Результаты исследований в области фармакогенетики и фармакогеномики важны для прогноза эффективности лечения, рецидива опухоли и выживаемости пациентов [5].

Кроме индивидуальных различий в чувствительности опухоли к ЛВ, важным фактором, влияющим на результат лечения и возникновение побочных эффектов, является биодоступность используемых препаратов. ЛВ, применяемые в составе химиотерапии, часто обладают низкой растворимостью и малой биодоступностью при внутривенном введении. Это может приводить как к передозировке, так и недостаточной эффективности и избыточному расходованию ЛВ. Все это

делает актуальным поиск и разработку систем таргетной доставки ЛВ. Целью создания таких систем является адресная доставка препарата к опухоли-мишени, улучшение фармакокинетических и фармакодинамических свойств уже существующих лекарств, направленное на максимальное снижение их токсичности, и следовательно, к повышению переносимости пациентами и усилению терапевтической эффективности.

Цель обзора – обобщение результатов и успехов фармакогенетики, а также оценка роли генетических факторов при использовании ряда ЛВ для лечения рака молочной железы. Предпринята попытка кратко осветить основные группы соединений, разрабатываемых для таргетной доставки ЛВ непосредственно к опухоли.

Молекулярный патогенез рака молочной железы. Рак представляет собой многофакторное заболевание, характеризующееся нестабильностью генома, недостаточностью репарации ДНК, неконтролируемым клеточным делением, инвазией, образованием метастазов, нарушениями в работе механизмов апоптоза и стимуляцией процессов ангиогенеза [6]. Наиболее вероятной причиной нарушения регуляции этих процессов являются различные молекулярно-генетические

изменения, в частности, мутации и однонуклеотидные замены в функционально важных генах [7]. Кроме того, для опухолевой клетки характерна нестабильность генома, опосредованная инактивацией систем репарации ДНК и нарушениями в молекулярном контроле клеточного цикла.

Ключевым моментом в индукции канцерогенеза является накопление мутаций в онкогенах и генах-супрессорах опухоли. Генетические повреждения в онкогенах могут возникать вследствие случайного мутационного процесса, однако вероятность мутаций существенно повышается при канцерогенной нагрузке. Каскад, запущенный измененными онкогенами (активированными) и генами-супрессорами опухоли (ингибированными), приводит к изменению свойств клетки (рис. 1), что в дальнейшем приводит к клеточной инвазии и трансформации клеточного окружения, и, как следствие, к прогрессии опухоли.

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным злокачественным новообразованием среди женщин; от РМЖ ежегодно в мире страдают более 2 млн женщин, а смертность составляет около 600 000 человек в [9]. В 2017 г. в России выявлено более 70 500 новых случаев этого заболевания [10].

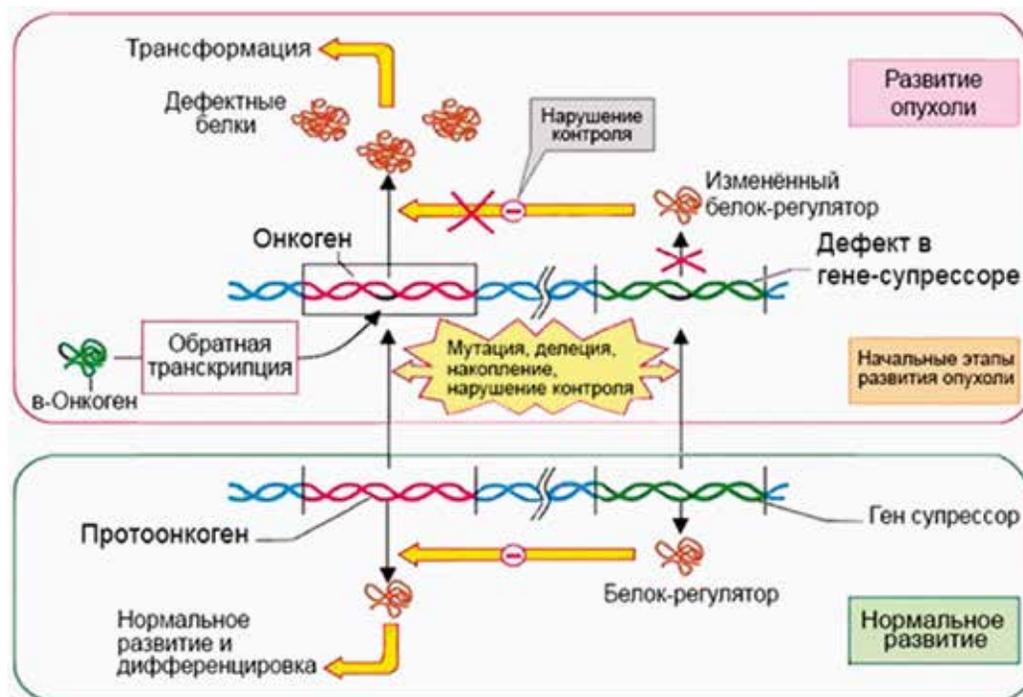


Рис. 1. Основные этапы канцерогенеза. На рисунке схематично отображены основные этапы канцерогенеза в сравнении с нормально развивающейся клеткой. Основным механизмом развития опухоли связан с нарушением структуры генов (верхний рисунок). Показано, как нарушения структуры онкогенов и/или супрессоров, вызванные различными причинами, могут привести к необратимому каскаду процессов, приводящему в итоге к развитию опухоли (Взято из свободных источников с изменениями, сделанными авторами обзора [8]).

Существует много факторов повышенного риска развития РМЖ. Среди них факторы внешней среды (экологическая ситуация, стрессовое воздействие, употребление алкоголя и др.) и молекулярно-генетические факторы, которые всё чаще называют детерминирующими [11]. Для развития РМЖ характерен определенный спектр молекулярно-генетических нарушений, наиболее значимыми в нем являются мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*. По данным различных исследований, при носительстве мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* вероятность развития РМЖ составляет 40–87% для носителей мутации в гене *BRCA1* и 18–88% для носителей мутации в гене *BRCA2* [12].

Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* характерны для наследственного РМЖ. Тем не менее, объяснить развитие наследственного РМЖ только мутациями этих генов можно лишь в 25% случаев, а спорадического – в 5% случаев [11]. Кроме генов *BRCA1* и *BRCA2* развитие наследственного РМЖ связано с герминальными мутациями в других генах супрессорах опухоли, большинство из которых принимает участие в поддержании стабильности генома клетки. К ним относятся ассоциированные с наследственными синдромами гены *TP53*, *PTEN*, *ATM* и *BLM*, а также гены средней и низкой пенетрантности, такие как *CHEK2*, *BRIP*, *PALB2*, *NBS1*, *RAD50* и гены репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch-репарации) *MSH2* и *MLN*. Эти гены участвуют в регуляции клеточного цикла, работе внутриклеточных сигнальных путей и метаболизме стероидных гормонов. [13]. Большинство белковых продуктов этих генов взаимодействуют с белком *BRCA1*, который, в комплексе с ними, влияет на различные внутриклеточные процессы, такие как репарация двунитевых разрывов ДНК, контроль клеточного цикла, дупликация центросом и инактивация X-хромосомы. Ген *BRCA2* участвует в процессах рекомбинации ДНК, гомологичной репарации, транскрипции, ремоделировании хроматина, дупликации хромосом и цитокинеза. В клинической диагностике анализ мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* рекомендован в случае отягощенного семейного анамнеза, у пациенток молодого возраста и при тройном негативном фенотипе РМЖ у пациенток моложе 50 лет [14]. Выявление мутаций на ранних стадиях ведет к изменению тактики лечения, что может пролонгировать время жизни пациента [15].

Определение молекулярно-генетических маркеров при РМЖ является не только важным прогностическим фактором развития рака, но также может изменить подход к лекарственной терапии (химиотерапии, гормонотерапии, таргетной терапии) опухолей определенных молекулярно-биологических подтипов.

Фармакогенетика РМЖ. РМЖ представляет собой онкологическое заболевание, имеющее несколько молекулярных подтипов, сильно различающихся между собой по клиническим характеристикам и используемым схемам лечения [14]. Разные ответы на одинаковые схемы у пациентов с РМЖ, имеющих сходные клинические характеристики, связаны с индивидуальными особенностями как опухоли, так и организма пациента. В задачу настоящего обзора не входит подробное описание имеющихся клинических рекомендаций для лечения РМЖ, поэтому мы будем рассматривать фармакогенетические особенности групп препаратов и отдельных ЛВ, применяемых в схемах терапии РМЖ (табл. 1).

1. Тамоксифен. Уже свыше 35 лет тамоксифен является «золотым стандартом» эндокринной терапии РМЖ и относится к группе антиэстрогенов – синтетических веществ различного химического строения, механизм действия которых связан с влиянием на рецепторы эстрогенов [16]. Гормонотерапия является ключевым методом лечения люминального РМЖ, отличительной чертой которого является гиперэкспрессия рецепторов эстрогенов (ER+). Тем не менее, опухоль может приобретать устойчивость к терапии данного типа. Для преодоления этой проблемы и для разработки новой эффективной стратегии лечения необходимо понимание механизмов, способствующих подобной устойчивости. Большое число исследований по изучению генетических аспектов РМЖ выявило важную роль генов, вовлеченных в *PI3K/Akt/mTOR* путь. Следует отметить, что ключевые гены этого пути – *PIK3CA*, имеющий частые мутации в 30% случаев прогрессирующего ER+/HER2– РМЖ, а также *AKT1*, мутация которого (E17K) была обнаружена у 1,4–8% пациентов с РМЖ. Изменения в генной структуре обозначенных генов, а также других, вовлеченных в единый путь, приводят к развитию РМЖ. Таким образом, используемые при лечении препараты направлены, главным образом, на подавление экспрессии *PIK3CA* (тамоксифен), а также *AKT1* путей (паклитаксел из группы таксанов) [17].

Тамоксифен метаболизируется в печени с помощью ферментов семейства цитохрома p450 с образованием продуктов, оказывающих защитное действие на рецептор эстрогена. Терапевтический эффект лечения РМЖ при этом связан с 4-гидрокситамоксифеном и эндоксифеном [18] (рис. 2). Эти метаболиты проявляют значительно большее сродство к рецептору эстрогена и большую эффективность в подавлении пролиферации клеток по сравнению с тамоксифеном.

Ген *CYP2D6* кодирует фермент, катализирующий превращение тамоксифена в его активные метаболиты.

ты и, тем самым, регулируя скорость этой реакции [18]. Ген *CYP2D6* является высоко полиморфным, в настоящее время для него известно 63 различных аллеля, многие из которых связаны с повышенной, пониженной или полностью заблокированной активностью белкового продукта гена. Активность *CYP2D6*, ассоциированная с этими аллелями, может быть слабой, промежуточной, экстенсивной и гиперэкстенсивной [18]. Таким образом, генетическая изменчивость гена *CYP2D6* стала важным фактором, влияющим на индивидуальный ответ при лечении тамоксифеном. Влияние генетических вариантов генов *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2B6*, *CYP2C9* и *CYP3A5* на результаты лечения тамоксифеном было оценено в работе Schroth W и др. По

результатам этого исследования было показано, что у пациентов, получавших тамоксифен, и имеющих аллели *4, *5, *10, *41 гена *CYP2D6*, безрецидивный период был более коротким и показатели выживаемости намного хуже, чем при других аллельных вариантах ((*hazard ratio [HR]* = 2.24; *CI*_{95%} = 1.16–4.33; *p*=0.02) и (*HR*=1.89; *CI*_{95%}=1.10–3.25; *p*=0.02). Пациенты с аллелем *17 гена *CYP2C19* имели более высокий индекс ферментативной активности и более благоприятный прогноз (*HR*=0.45; *CI*_{95%}=0.21–0.92; *p*=0.03), чем носители аллелей *1, *2 и *3 [19]. Дальнейшие исследования показали, что риск рецидива был выше у тех пациентов, которые имели генотипы гена *CYP2D6*, связанные со слабой или промежуточной активностью

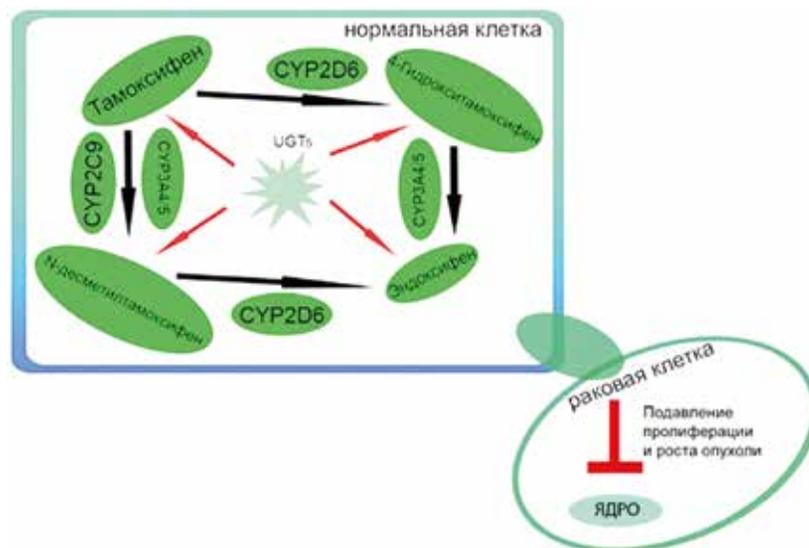


Рис. 2. Основные пути метаболизма тамоксифена.

Таблица 1

Лекарственные вещества и гены, влияющие на их эффективность при раке молочной железы

Лекарственный препарат	Гены, ассоциированные с препаратом
Тамоксифен	<i>CYP2D6, CYP2C19, CYP2B6, CYP2C9, CYP3A5, ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2, CYP1B1, SLC01B3, SLC22A7, UGT2B7, UGT1A10, UGT1A8, ESR1, ESR2</i>
Паклитаксел	<i>CYP3A4, CYP2C8, ABCB1, TUBD1, TUBB3, TUBB6, ENCCT3, NEK2, PFDN2, PTP4A3, SDCCAG8, TBCE,</i>
Производные платины	<i>BRCA1/2, TP53</i>
Антрациклины	<i>BRCA1/2, GSTP1, GSTM1, GSTT1, CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, SLC2A16, CYP2B6, CYP2C, CYP3A5, CYP2C19, MDM2, CYP3A4*1B, ALDH1A1, CYP2A6, CYP2C8, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCG2, SLC22A7, SLC29A1, DPYD, DPYS</i>
Циклофосфамид	<i>CYP2B6*6, CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5, GSTM1, GSTP1, GSTT1</i>
Антиметаболиты (антагонисты пириимидина)	<i>MTHFR, TS</i>
Таргетные препараты	<i>ERBB2, BRCA1/2</i>

белкового продукта [18]. В другом исследовании, на пациентах с инвазивным гормон-положительным РМЖ, было показано влияние аллельных вариантов генов *CYP2D6*, *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG2* на выживаемость без прогрессирования в ответ на монотерапию тамоксифеном [20].

Тамоксифен и его активные метаболиты (4-гидрокситамоксифен и эндоксифен) ингибируют пролиферацию и рост клеток рака молочной железы.

Инактивация тамоксифена и его метаболитов в основном обеспечивается ферментами уридиндифосфат-глюкуронозилтрансферазы, кодируемыми генами *UGT2B7*, *UGT1A10* и *UGT1A8*. Было показано, что аллель 268Tуг гена *UGT2B7* и аллель 277Tуг гена *UGT1A8* обладают самой высокой активностью *in vitro* в отношении метаболитов тамоксифена (транс-4-гидрокситамоксифена и транс-эндоксифена) [21].

В двух крупных международных исследованиях было показано, что существует связь между эффективностью тамоксифена и полиморфными маркерами гена, кодирующего рецептор эстрогена [22, 23]. Рецептор эстрогена существует в двух формах ($ER\alpha$ и $ER\beta$) и кодируется независимо двумя разными генами: *ESR1*, расположенном на хромосоме 6 и *ESR2*, расположенном на хромосоме 14 [24]. В генах *ESR1* и *ESR2* было выявлено 17 и 8 функциональных полиморфных маркеров, соответственно, а также показано, что 3 наиболее частых гаплотипа (H4, H6, и H13) гена *ESR1* статистически значимо связаны с пониженным риском развития РМЖ ($p < 0.01$). Кроме того, выявлена ассоциация двух часто встречающихся полиморфных маркеров, находящихся в 3'нетранслируемой области гена *ESR2* (rs4986938 и rs928554), с подавлением экспрессии $ER\beta$ у пациенток с РМЖ [25]. Также, показана ассоциация полиморфного маркера rs1801132 гена *ESR1* с сокращением периода без прогрессирования у пациенток, получавших гормонотерапию [22]. Таким образом, молекулярно-генетические маркеры ряда генов оказывают значимое влияние на метаболизм тамоксифена.

2. Паклитаксел. Другим препаратом, действующим на гены PI3K/Akt/mTOR пути, является паклитаксел – химиотерапевтическое средство из группы таксанов, ингибирующее деполимеризацию тубулиновых микротрубочек и останавливающее клеточный цикл в метафазе [26]. Широкое применение плохо растворимого паклитаксела в онкологии ограничивается его высокой токсичностью.

Биотрансформация паклитаксела происходит главным образом в печени, где под воздействием ферментов, кодируемых генами *CYP3A4* и *CYP2C8*, ЛВ окисляется с образованием неактивных метаболитов. Белок

Р-гликопротеин, кодируемый геном *ABCB1*, с другой стороны, увеличивает клиренс ЛВ, уравновешивая реабсорбцию из гепатоцеллюлярной системы и кишечную экскрецию [27]. Таким образом, полиморфные варианты генов *CYP3A4*, *CYP2C8* и *ABCB1* могут быть использованы как биомаркеры токсичности и ответа на паклитаксел. В частности, в исследовании у пациентов с раком яичников, получавших паклитаксел, носители аллелей 3435T и/или 1236T гена *ABCB1* развивались более тяжелой нейтропенией, чем у носителей аллеля С ($p = 0.03$ и $p = 0.06$, соответственно) [28]. Таким образом, наличие вариантных аллелей гена *ABCB1* всегда связано с значительным повышением эффективности воздействия паклитаксела и может быть использовано для оптимизации его дозировки [29]. В другом исследовании, проведенном на 261 пациентке с раком яичников, получавших паклитаксел и производные платины в качестве химиотерапии первой линии, было показано, что носители аллеля G полиморфного маркера A392G гена *CYP3A4* имеют более низкую выживаемость по сравнению с носителями генотипа AA, вероятно, в результате более высокой активности фермента [30].

Опухоли РМЖ могут проявлять устойчивость к таксанам вследствие изменений в генах белка тубулина. В исследованиях на различных клеточных линиях показано, что мутации в генах α - и β -тубулина связаны с устойчивостью к таксанам [31]. Показано, что наиболее часто происходит амплификация генов *TUBD1* и *TUBB3*, при этом точечные мутации в генах семейства тубулинов различаются у чувствительных и устойчивых к таксанам линий РМЖ. Были проанализированы нарушения в генах и изменение профиля экспрессии 27 белков семейства тубулина в образцах более 4000 случаев РМЖ [32]. Показано, что экспрессия генов *TUBB3* и *TUBB6* была значительно снижена в устойчивых к таксанам опухолях.

3. Производные платины. Механизмом действия препаратов платины (цисплатин и карбоплатин) является образование плохо репарируемых и длительно существующих внутри- и межнитевых сшивок. Этот эффект может рассматриваться как основание для отнесения комплексных соединений платины к классу алкилирующих противоопухолевых препаратов. В результате их действия нарушается репликация и транскрипция, что ведет к остановке клеточного цикла и апоптозу [16]. Гены *BRCA1* и *BRCA2* играют ключевую роль в системе репарации ДНК, отвечая за гомологичную рекомбинацию ДНК, при их инактивации опухолевые клетки становятся более чувствительными к производным платины.

Одна из первых клинических работ по изучению эффективности платиносодержащей химиотерапии

(ХТ) при РМЖ [33] была проведена на 28 больных с тройным негативным РМЖ. Две пациентки были носителями наследственной мутации гена *BRCA1* и получали неoadьювантную ХТ цисплатином (75 мг/м²). В результате у обеих носительниц мутации гена *BRCA1* была зарегистрирована полная патоморфологическая регрессия опухоли (ПР). В целом у 6 из 28 пациентов, включая и обеих носительниц мутации гена *BRCA*, была достигнута полная регрессия опухоли. Выявлено несколько факторов, связанных с более выраженным ответом на терапию цисплатином, среди них снижение экспрессии гена *BRCA1* ($p=0.03$), метилирование промотора гена *BRCA1* ($p=0.04$) и мутации (нонсенс-мутации или сдвиг рамки считывания) в гене TP53 ($p=0.03$) [33].

Примерно в то же время у пациенток с наследственными мутациями гена *BRCA1 5382insC*, *C61G* и/или *4153delA* было выявлено, что монотерапия цисплатином более эффективна, чем использование других схем лечения [34]. Исследование было проведено на 102 больных с BRCA-ассоциированным РМЖ, получавших несколько схем ХТ. У пациенток, получавших лечение доксорубицином и доцетакселом, полная регрессия была достигнута в 8% случаев (2/25), тогда как при лечении по схемам на основе доксорубицина – в 22% случаев (11/51). При использовании монотерапии цисплатином (4 цикла, 75 мг/м²) полная регрессия была достигнута у 10 женщин из 12 (83%). Схожие результаты ответа на монотерапию цисплатином наблюдались у 20 носительниц мутации гена *BRCA1* при метастазировании РМЖ [34, 35].

Однако результаты последовавших за ними работ не были так однозначны. В крупном исследовании, проведенном в Китае, с участием больных тройным негативным РМЖ, было показано, что у носительниц наследственной мутации гена *BRCA1* не наблюдалось значимых различий в частоте полной ПР при сравнении с больными без мутаций в этом гене. Кроме того, в отличие от предыдущих работ, авторы обнаружили меньшую частоту полной ПР при платиносодержащей ХТ по сравнению со схемами на основе антрациклинов (40% и 57%, соответственно) [36]. Также в рандомизированном исследовании эффективности препаратов платины при тройном негативном РМЖ у носителей наследственных мутаций генов *BRCA1/2* был выявлен более выраженный ответ опухоли на ХТ карбоплатином по сравнению с доцетакселом (68% и 33%, соответственно, $p=0.03$). Медиана времени без прогрессирования при лечении карбоплатином была больше у носителей мутаций в генах *BRCA1/2* по сравнению с больными без мутаций (6.8 и 4.4 мес, соответственно) [37].

4. Антрациклины. Антрациклины (например, доксорубин) имеют комплексный механизм действия, который включает интеркаляцию ДНК, генерацию свободных радикалов и нарушение репарации ДНК [16]. Доксорубин метаболизируется в печени ферментами I фазы биотрансформации ксенобиотиков альдокеторедуктазой и карбонилредуктазой (*Carbonyl reductase [NADPH] 1 и 3; CBR1 и CBR3*) в активный метаболит, доксорубинол, который затем детоксифицируется ферментами II фазы семейства глутатион-трансфераз (GST). Показано, что предрасполагающие генотипы генов *GSTP1*, *GSTM1* и *GSTT1* в сочетании существенно снижают эффективность доксорубина (частоту ПР) у пациенток с РМЖ [38]. В работе Gor et al. [39] было изучено влияние изменений в генах *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2B6*, *CYP2D6*, *CYP2C9*, *GSTP1*, *GSTM1* и *GSTT1*. Авторы обнаружили, что пациентки, у которых был выявлен по крайней мере один аллель G полиморфного маркера rs2740574 гена *CYP3A4*, имели более низкую безрецидивную выживаемость, чем женщины, у которых выявлен AA генотип. Другое исследование показало, что предрасполагающие аллели полиморфных маркеров rs192709 и rs3211371 гена *CYP2B6* были ассоциированы со снижением эффективности действия антрациклинов (доксорубин, циклофосфамид), тогда как ряд однонуклеотидных полиморфных маркеров в этом же гене (rs8192709, rs3745274, rs2279343) был связан с неблагоприятным прогнозом РМЖ [40]. Следует сказать, что доксорубин также является субстратом для продуктов генов *ABCB1* и *SLC2A16*. Результаты исследования показали, что носители минорных генотипов полиморфных маркеров *A146G*, *T312C* и *T755C* в гене *SLC2A16* имели более низкую скорость выведения лекарственного вещества, что приводило к более медленному нарастанию токсичности для организма пациента [40]. Важным аспектом является связь доксорубина с нарушениями в генах системы репарации ДНК, а именно в генах *BRCA1/2*. В исследовании, посвященном влиянию мутаций в генах *BRCA1* на эффективность доксорубина при тройном негативном подтипе РМЖ, было выявлено снижение эффективности препарата у пациенток с мутацией этого гена [41].

Ещё одним важным аспектом следует считать влияние доксорубина на функционирование системы апоптоза. В одном из исследований показано, что препарат существенно изменял экспрессию различных сплайс-форм гена *MDM2* до и после введения в клетки [42]. Ген *MDM2*, из семейства убиквитин лигаз, является важным фактором развития опухоли, и вовлечен в регуляцию экспрессии белка p53 на уровне контроля активности самого белка и регуляции работы

одноименного гена. В норме ген *MDM2* активируется при повышении уровня белка p53, способствуя его дальнейшему разрушению в протеосомах [43]. В свою очередь, ген *TP53* представляет собой один из наиболее изученных транскрипционных факторов, белковый продукт которого осуществляет регуляцию широкого спектра клеточных процессов, выступая своего рода «дирижёром», ведущим постоянный надзор за состоянием генома и устраняющим потенциально опасные в плане злокачественной трансформации клетки [44].

5. Циклофосфамид. Циклофосфамид относится к группе алкилирующих препаратов и является пролекарством, которое в организме пациента подвергается активации ферментами семейства цитохромов I фазы биотрансформации ксенобиотиков (кодируются генами *CYP2B6*, *CYP3A4* и *CYP3A5*) и инактивируется, главным образом, через конъюгацию его с тиолом или сульфатом посредством ферментов семейства глутатион-S-трансфераз (кодируются генами *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*) [38, 39]. Активный метаболит 4-гидроксициклофосфамид диффундирует в раковые клетки и отвечает за алкилирующую способность циклофосфамида. Показано, что частота тяжелой формы нейтропении при лечении циклофосфамидом была ниже у пациентов носителей аллеля *CYP2B6*6*, чем у пациентов, не имеющих данного аллеля *CYP2B6*6* [45]. Поскольку аллель *CYP2B6*6* связан с пониженной экспрессией и уменьшением образования белкового продукта этого гена, [46] уменьшение дозы циклофосфамида может привести к снижению частоты тяжелой нейтропении (4 степени) у пациентов с аллелем *CYP2B6*6*. В другой работе, выполненной на 405 пациентах с ранним РМЖ, было показано, что *AA* генотип (*rs1695*) гена *GSTP1* связан с более высоким риском тяжелой нейтропении 3/4 степени, чем генотипы *AG* и *GG* [47]. В то же время, в некоторых работах не обнаружено влияние данного полиморфного маркера на токсичность химиотерапии, но отмечена ее высокая эффективность: пациенты с минорным аллелем *G* маркера *rs1695* гена *GSTP1* имели более выраженный ответ на ХТ по частоте достижения ПР [48].

6. Антиметаболиты (антагонисты пиримидина). Антиметаболиты структурно сходны с природными нуклеотидами. Механизм действия антиметаболитов основывается или на включении их в ДНК или РНК вместо нативных нуклеотидов, или на ингибировании белков, участвующих в метаболизме нуклеотидов. Все антагонисты пиримидина являются пролекарствами и внутриклеточно превращаются в цитотоксичные метаболиты. Наиболее часто используемыми антагонистами пиримидина являются 5-фторурацил (5-ФУ),

гемцитабин, цитарабин, капецитабин и тегафур [49]. Полиморфные изменения ферментов метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) и дигидропиримидиндегидрогеназы (*DPD*) могут влиять на фармакодинамику фторпиримидинов. В ряде исследований, была оценена эффективность лечения и уровень токсичности 5-ФУ, в зависимости от полиморфных вариантов этих генов. Так, по результатам исследований было отмечено, что мутация *IVS14+1G>A* в гене *DPD* является наиболее распространенной функциональной мутацией и приводит к пропуску всего экзона 14 (165 п.н.), что в конечном итоге приводило к полной потере активности фермента рDPD. Кроме того, наличие у пациентки других полиморфных вариантов гена *DPD* (с.1850C>T и с.257C>T, также было связано с тяжелыми побочными эффектами препарата [50]. Пациенты с генотипом *CT* и *TT* гена *MTHFR* (*rs1801133*) имели более высокую вероятность развития тяжелой нейтропении, чем пациенты с генотипом *CC* ($p = 0.043$) [51]. Таким образом, полиморфные маркеры генов *DPD* и *MTHFR* играют потенциальную роль в идентификации пациенток с повышенным риском развития токсических побочных эффектов и могут быть важными маркерами в прогнозировании клинического исхода у пациенток с РМЖ.

7. Таргетные препараты. Таргетные препараты представляют собой ЛВ, созданные для направленного взаимодействия с заранее установленными и охарактеризованными молекулами, имеющими ключевое значение для протекания на молекулярном уровне процессов, определяющих возникновение и развитие злокачественной опухоли [16]. На сегодняшний день к таргетным препаратам можно отнести две основные группы веществ: анти-HER2-препараты и PARP-ингибиторы.

Трастузумаб является первым моноклональным антителом к рецептору HER2. На HER2-позитивные опухоли приходится 20–25% всех случаев РМЖ, поэтому использование трастузумаба для подавления активности рецептора HER2 открыло новую эру в терапии данного варианта РМЖ. Ген *ERBB2*, кодирующий рецептор HER2 является членом семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGF) и большинство HER2-позитивных опухолей связаны с амплификацией гена *ERBB2*. Терапевтический эффект анти-HER2-препаратов связан с их способностью подавлять передачу сигналов HER2 рецептора с помощью ряда механизмов, включая подавление двух путей: Ras/Raf/MAPK, который регулирует пролиферацию клеток и PI3K/AKT, который, в свою очередь, контролирует выживаемость клеток. Этот вид терапии позволяет значительно улучшить выживаемость без прогрессирования

ния и общую выживаемость пациенток при РМЖ с амплифицированным геном *ERBB2* [52].

Механизм действия *PARP-ингибиторов* основывается на взаимодействии препарата с поли(АДФ-рибоза)-полимеразой — ключевым белком, необходимым для восстановления однонитевых разрывов ДНК с помощью механизма эксцизионной репарации. При этом опухолевые клетки с дефектом гена *BRCA1*, имеют повышенную чувствительность к *PARP-ингибиторам*. При воздействии данных ЛВ на опухолевую клетку с дефектом системы репарации ДНК невосстановленные однонитевые разрывы ДНК становятся двунитевыми, репарация которых не может осуществляться должным образом, что приводит клетку к апоптозу. Препарат талазопариб, прошедший III фазу клинических испытаний показал статистически значимо лучший показатель выживаемости без прогрессирования. При этом медиана времени без прогрессирования составила 8,6 мес. в группе больных, получавших талазопариб, и 5,6 мес. в группе с другой химиотерапией (ОШ=0,542; $p<0,001$), частота объективного ответа опухоли составила 62,6% и 27,2% соответственно (ОШ=5.0; $p<0,001$) [53]. Авторы сделали заключение об эффективности данного ЛВ при распространенном РМЖ с носительством наследственной мутации в генах *BRCA1/2*.

Противоопухолевая терапия сопровождается рядом трудностей, связанных с биодоступностью ЛВ, таких как быстрое расщепление препаратов и их выведение из организма, наличие токсических эффектов, связанных с попаданием в неспецифические отделы организма после биораспределения [54]. Таким образом, одним из перспективных и стремительно развивающихся направлений современной фармакологии является адресная (или таргетная) доставка лекарственных препаратов.

Иммобилизация лекарств на наночастицах позволяет повысить их биодоступность, улучшая растворимость и обеспечивая преодоление различных барьеров, например, гематоэнцефалического барьера, снизить влияние на организм в целом, целенаправленно воздействуя на поврежденную область [55]. Немаловажным дополнительным преимуществом является возможность создания препаратов пролонгированного действия. В качестве носителей лекарственных препаратов в настоящее время наиболее активно изучаются липосомы, углеродные нанотрубки, полимеры, дендримеры, фуллерены, магнитные наночастицы, нанодисперсные кремнеземы [55] (рис. 3).

Наночастицы, имеют размер в диапазоне 1–1000 нм, и множество свойств важных для использования в он-

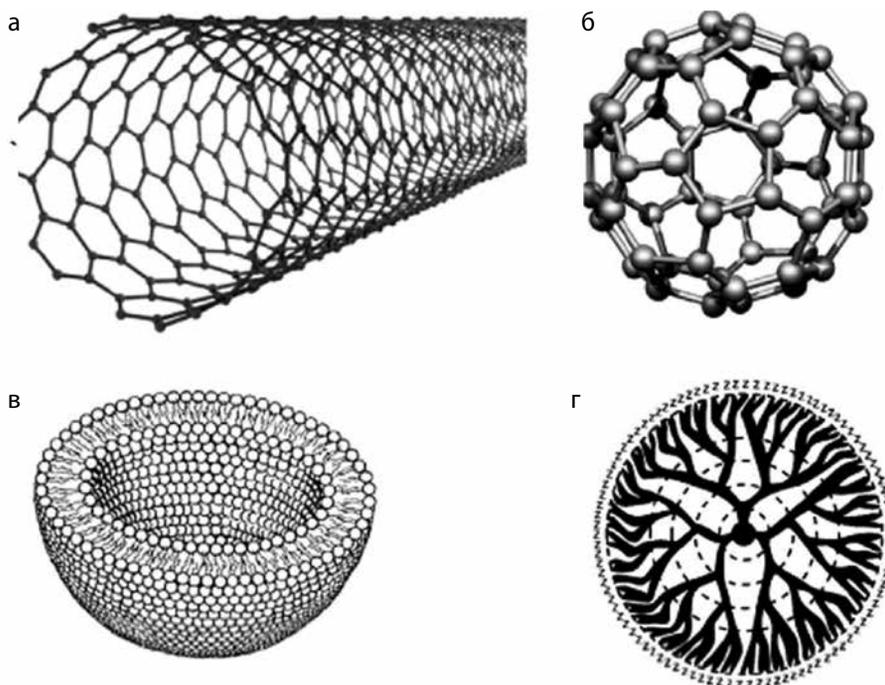


Рис. 3. Перспективные носители лекарственных препаратов: а — нанотрубки; б — фуллерены; в — липосомы; г — дендримеры [56].

кологии. В табл. 2 приведены некоторые наиболее используемые варианты транспортных наночастиц, а также их основные характеристики и недостатки [54].

1. Липосомы. Наиболее изученной и широко используемой системой направленной доставки являются липосомы (малые, большие и многослойные) — это полые частицы, содержимое которых ограничено липидной мембраной. Мембрана липосомы состоит из привычных для организма веществ, следовательно, она, во-первых, нетоксична, во-вторых, может подвергаться биотрансформации после применения, в-третьих, способна сливаться с клеточной мембраной, высвобождая действующее вещество внутрь клетки. Важно, что до этого момента лекарство полностью защищено от ферментов и прочих биологически активных веществ крови [57]. С точки зрения биологической совместимости липосомы идеальны как переносчики ЛВ. Они создаются из нативных липидов и поэтому нетоксичны, не вызывают нежелательных иммунных реакций и биodeградируемы. Однако липосомы недостаточно стабильны в крови и быстро выводятся из кровотока клетками РЭС (ретикуло-эндотелиальной системы). Липосомы чувствительны к физическим и химическим стимулам. Действие препарата можно локализовать в определенной ткани-мишени за счет местного нагревания. Для этой цели применяются термочувствительные липосомы, состоящие из фосфолипидов с температурой фазового перехода выше, чем температура тела [58]. Такие липосомальные формы обладают повышенной проницаемостью при темпера-

туре, близкой к температуре фазового перехода, и в сочетании с локальным нагреванием используются для доставки лекарственных соединений в опухоль.

Для защиты от распознавания РЭС используются полиэтиленгликоль-модифицированные везикулы (ПЭГ), которые, нашли применение при лигандопосредованной направленной доставке препаратов в опухоль [59]. Конъюгация с соответствующим вектором или их фрагментами позволяет модулировать распределение липосом в органах и тканях. Липосомы, к поверхности которых присоединены молекулы или их фрагменты, называются иммунолипосомами. С помощью таких «адресных» липосом можно не только оптимизировать терапевтические свойства лекарственных веществ, но и в ряде случаев корректировать действующую дозу. Так, например, результатом применения противоопухолевого препарата доксорубицина, включенного в пэгилированные липосомы, для лечения больных метастатическим раком молочной железы стало увеличение продолжительности жизни. Несмотря на его терапевтическую активность, препарат имеет существенные недостатки. Ввиду короткого времени циркуляции в плазме в активной форме требуется увеличение терапевтической дозы препарата, что в свою очередь приводит к кардио- и нефротоксичности. Положительные результаты были получены при комбинированной терапии, состоящей из доксила и цисплатина, мицета и паклитаксела или келикса и карбоплатина [59, 60].

Таблица 2

Перспективные носители лекарственных препаратов

Наночастица	Описание	Преимущества	Недостатки
Липосомы	Везикулы с липидной мембраной и жидким центром	Относительно безопасны, пригодность для поверхностной функционализации	Трудности стерилизации, ограниченная загрузка лекарств и низкая стабильность
Фуллерены	Частицы с четкой морфологией в сочетании с хорошей химической и термической стабильностью	Хорошая биосовместимость, большая площадь поверхности, четко определенная морфология	Сложности в увеличении размера
Нанотрубки	Цилиндрические носители, образованные из бензолных колец	Благодаря инфракрасной фотолюминесценции нанотрубки позволяют получать оптические изображения, что обеспечивает лучшее пространственное разрешение и более глубокое изображение тканей	Существуют опасения в отношении токсичности <i>in vivo</i> , биоразлагаемости, биораспределения и элиминации
Дендримеры	Содержат повторяющиеся звенья разветвленных мономеров, выходящих радиально из центрального ядра	Многомерная структура с отличными показателями вместимости, способная к таргетному наведению посредством поверхностной функционализации	Токсичность

При исследовании возможностей терапии при развитии устойчивости носителей мутаций в генах *BRCA1/2* к PARP-ингибиторам было предложено использовать пути регуляции генов PI3K пути. В качестве возможных регуляторов могут быть использованы гены микроРНК. Известна роль микроРНК как регулятора экспрессии многих генов и процессов за счёт специфического комплементарного связывания с определенной последовательностью в 3'-нетранслируемой области. В результате было показано, что miR-451 может использоваться как новый терапевтический агент для подавления пути PI3K/AKT при комбинировании с PARP-ингибиторами для оказания комплексного воздействия на клетки с мутантным геном *BRCA1*. Результаты показали, что, используя один и тот же носитель для доставки ЛВ, можно устранить разницу в транспортировке двух препаратов *in vitro*. Более того, стабильный носитель для доставки лекарств с предсказуемой биодинамикой *in vivo* может гарантировать фиксированное соотношение концентрации лекарственного средства в тканях опухоли [61].

2. Фуллерены. Фуллерены – это шарообразные молекулы с замкнутой поверхностью, являющиеся одной из аллотропных модификаций углерода [62]. К настоящему времени разработаны технологии, позволяющие получать стабильные коллоидные растворы фуллеренов в воде. Водорастворимые производные фуллерена могут эффективно взаимодействовать с ДНК, белками и живыми клетками. Биологическая активность фуллеренов разнообразна, например, противовирусная, антибактериальная, антиоксидантная и прооксидантная, нейропротекторная, цитотоксическая и цитопротективная, активность в клеточных сигнальных путях и противораковая активность [63]. Так в первых исследованиях была показана антипролиферативная активность фуллерена $C_{60}(OH)_{24}$ (фуллеренол) на трех клеточных линиях РМЖ человека, выражавшаяся в слабом ингибировании роста клеток, которая изменялась в зависимости от клеточной линии, времени и концентрации фуллеренола [64]. В более позднем исследовании с применением дополнительных ЛВ: доксорубицина, цисплатина, таксола и тиазофурина, как отдельно, так и в различных схемах, было показано, что одновременное применение фуллеренола и противоопухолевых препаратов приводило к существенному снижению цитотоксичности, противоопухолевых препаратов. Скорость снижения цитотоксичности зависела от концентрации фуллеренола, типа противоопухолевого препарата и клеточной линии [62]. Защитный эффект фуллеренола был более выраженным в отношении доксорубицина, цисплатина и тиазофурина, лекарств, токсичность

которых была основана на образовании активных форм кислорода. Модуляция цитотоксичности, индуцированной таксолом, фуллеренолом может быть опосредована другими механизмами, например, влияние на цитоскелет [62].

3. Нанотрубки. Углеродные нанотрубки представляют собой полые цилиндрические структуры одностенного или многостенного строения, образованные свернутыми гексагональными графеновыми плоскостями. Актуальным вопросом является возможность использования нанотрубок в качестве носителей ЛВ. Существуют 3 способа применения нанотрубок для доставки и высвобождения ЛВ. Первый способ заключается в сорбировании активных молекул препарата на сети нанотрубок или внутри их пучка. Второй способ предполагает химическое присоединение лекарства к функционализированной внешней стенке нанотрубки. Наконец, третий способ требует помещения молекул активного вещества в просвет нанотрубки [65]. На сегодняшний день разработаны однослойные углеродные нанотрубки для адресной доставки в опухоль доксорубицина [66].

4. Дендримеры. Этот класс соединений интересен тем, что при их получении с каждым элементарным актом роста молекулы количество разветвлений увеличивается в геометрической прогрессии. В результате, с увеличением молекулярной массы таких соединений, изменяются форма и жесткость молекул, что, как правило, сопровождается изменением физико-химических свойств дендримеров (вязкость, растворимость, плотность и т. д.). Наряду с традиционно используемыми для получения сверхразветвленных полимеров алкилдиаминными и полиэтилендиаминными, такие соединения, как полиамидоамин и аминокислота лизин, также показали себя в качестве удобных мономеров при создании мицелл дендримерной структуры с высокими показателями биологической совместимости. Подобные полимеры позволяют связывать необходимые для введения в биологическую среду препараты путем образования комплекса с поверхностью дендронов или глубокого проникновения между «ветвями» боковых цепей макромолекул, что в сочетании с контролируемыми в процессе синтеза размером и свойствами поверхности полностью оправдывает применение дендримеров в качестве носителей для фармакологии и медицины. К настоящему моменту уже показана эффективность их применения для доставки ряда лекарственных препаратов в экспериментах на животных. Так, проведенные эксперименты показали значительное повышение эффективности действия метотрексата, уменьшение побочного действия и токсичности при дендримерной

транспортировке его в организм. Дальнейшие исследования в этом направлении, по мнению разработчиков, будут способствовать переходу онкозаболеваний в хроническую управляемую форму [67].

Таким образом, использование наночастиц для доставки ЛВ непосредственно к тканям опухоли является актуальным развивающимся направлением в фармакологии, которое может позволить модулировать активность и токсичность применяемых ЛВ.

Заключение

Последние достижения в области геномных исследований продемонстрировали существенную роль генетических факторов в прогнозировании ответа опухоли на терапию. Фармакогенетические исследования могут внести существенный вклад в лечение рака молочной железы. Индивидуализация лечения этого заболевания связано с дальнейшим поиском вероятных молекулярно-генетических маркеров эффективности лекарственных веществ и прогнозирования развития побочных эффектов терапии. Развитие системы наночастиц для адресной доставки лекарственных веществ в ткань опухоли даст возможность снижения побочных эффектов препаратов и повышения их биодоступности.

Участие авторов:

Концепция и дизайн обзора — Бурденный А.М., Логинов В.И., Лукина С.С., Заварыкина Т.М., Пронина И.В.

Написание и редактирование глав:

Бурденный А.М., Логинов В.И., Брага Э.А. Пронина И.В., Филиппова Е.А., Иванова Н.А.

Заварыкина Т.М., Бреннер П.К., Капралова М.А., Аткарская М.В.

Лукина С.С., Круглова М.П., Белова М.В., Бахрушина Е.О.

Литература (п.п. 1-9; 11; 12; 15; 17-43; 45-55; 57-67 см. References)

10. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. *Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность)*. М.; ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России; 2018.
13. Лаптев С. А., Корженевская М. А., Имянитов Е.Н. *Молекулярно-генетический «портрет» рака молочной железы*. Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Т. 2017; 2: 12–22
14. Стенина М.Б., Жукова Л.Г., Королева И.А., Пароконная А.А., Семиглазова Т.Ю., Тюляндин С.А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению инвазивного рака молочной железы. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. 2018; 8: 113-44.
16. Корман Д.Б. *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов*. М.; Практическая медицина; 2014.

44. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. *Успехи биологической химии*. 2007; 47: 3-52.
56. Постнов В.Н., Наумышева Е.Б., Королев Д.В., Галагудза М.М. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов. *Биотехносфера*. 2013; 6: 16-27.

References

1. Mäbert K., Cojoc M., Peitzsch C., Kurth I., Souchelnytskyi S., Dubrovskaya A. Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives. *Int J Radiat Biol*. 2014; 90(8): 659-77.
2. Buonaguro FM, Caposio P, Tornesello ML, De Re V, Franco R. Cancer Diagnostic and Predictive Biomarkers 2018. *Biomed Res Int*. 2019; e3879015.
3. Rodríguez-Vicente A.E., Lumbreras E., Hernández J.M., Martín M., Calles A., Oñín C.L. et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics as tools in cancer therapy. *Drug Metab Pers Ther*. 2016; 31(1): 25-34.
4. Freedman A.N., Sansbury L.B., Figg W.D., Potosky A.L., Weiss Smith S.R., Khoury M.J. et al. Cancer pharmacogenomics and pharmacoepidemiology setting a research agenda to accelerate translation. *J Natl Cancer Inst*. 2010; 102: 1698-705.
5. Kranzler H.R., Smith R.V., Schnoll R., Moustafa A., Greenstreet-Akman E. Precision medicine and pharmacogenetics: what does oncology have that addiction medicine does not. *Addiction*. 2017; 112(12): 2086-94.
6. Somarelli J.A., Ware K.E., Kostadinov R., Robinson J.M., Amri H., Abu-Asab M. et al. PhyloOncology: Understanding cancer through phylogenetic analysis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017; 1867(2): 101-8.
7. Maxwell K.N., Nathanson K.L. Common breast cancer risk variants in the post-COGS era: a comprehensive review. *Breast Cancer Res*. 2013; 15(6): 212.
8. <http://mrmarker.ru/p/page.php?id=5040>
9. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(6): 394-424.
10. Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. *Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality)*. [Zlokachestvennyy novooobrazovaniya v Rossii v 2017 godu (zabolevaemostj i smertnostj)]. Moscow; FSBI «Moscow Scientific Research Oncology Institute of P.A. Hertsen» of Ministry of Health and Social Development of Russia; 2018. (in Russian)
11. Ellsworth R.E., Decewicz D.J., Shriver C.D., Ellsworth D.L. Breast cancer in the personal genomics era. *Curr Genomics*. 2010; 11(3):146-61.
12. Engela C., Fischerb C. Breast Cancer Risks and Risk Prediction Models. *Breast Care (Basel)*. 2015; 10(1): 7–12.
13. Laptiev S. A., Korzhenevskaya M. A., Imyanitov E.N. Molecular genetic “portrait” of breast cancer. *Scientific notes SPbGMU them. Acad. I.P. Pavlova T*. 2017; 2: 12–22. (in Russian)
14. Stenina MB, Zhukova L.G., Koroleva I.A., Parokonnaya A.A., Semiglazova T.Yu., Tylyandin S.A. and other. Practical recommendations on the medicinal treatment of invasive breast cancer. *Zlokachestvennyye opukholi: Prakticheskie rekomendatsii RUSSCO*. 2018; 8: 113-44. (in Russian)
15. Domchek S.M., Greenberg R.A. Breast cancer gene variants: separating the harmful from the harmless. *J Clin Invest*. 2009; 119(10): 2895-7.
16. Korman D. B. *Targets and mechanisms of action of anticancer drugs [Misheni i mekhanizmy deystviya protivopukholevykh preparatov]*. Moscow; Prakticheskaya meditsina; 2014.

17. Araki K., Miyoshi Y. Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 2018; 25(4): 392-401.
18. Hansten P.D. The Underrated Risks of Tamoxifen Drug Interactions. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2018; 43(5): 495-508.
19. Schroth W., Goetz M.P., Hamann U., Fasching P.A., Schmidt M., Winter S., et al. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA*. 2009; 302(13): 1429-36.
20. Kiyotani K., Mushihiro T., Imamura C.K., Hosono N., Tsunoda T., Kubo M., et al. Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABC2 on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2010; 28(8): 1287-93.
21. Lazarus P., Sun D. Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen and aromatase inhibitors. *Drug Metab Rev*. 2010; 42(1): 182-94.
22. Kuo S.H., Yang S.Y., You S.L., Lien H.C., Lin C.H., Lin P.H. et al. Polymorphisms of ESR1, UGT1A1, HCN1, MAP3K1 and CYP2B6 are associated with the prognosis of hormone receptor-positive early breast cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(13): 20925-38.
23. Hertz D.L., Henry N.L., Kidwell K.M., Thomas D., Goddard A., Azzouz F. et al. ESR1 and PGR polymorphisms are associated with estrogen and progesterone receptor expression in breast tumors. *Physiol Genomics*. 2016; 48(9): 688-98.
24. Cox D.G., Bretsky P., Kraft P., Pharoah P., Albanes D., Altshuler D. et al. Haplotypes of the estrogen receptor beta gene and breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2008; 122(2): 387-92.
25. Putnik M., Zhao C., Gustafsson J.A., Dahlman-Wright K. Effects of two common polymorphisms in the 3' untranslated regions of estrogen receptor beta on mRNA stability and translatability. *BMC Genet*. 2009; 10: 23-31.
26. Weger V.A., Beijnen J.H., Schellens J.H. Cellular and clinical pharmacology of the taxanes docetaxel and paclitaxel- a review. *Anticancer Drugs*. 2014; 25(5):488-94.
27. Kapse-Mistry S., Govender T., Srivastava R., Yergeri M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Front Pharmacol*. 2014; 56: 159.
28. Bergmann T.K., Brasch-Andersen C., Gréen H., Mirza M.R., Skougaard K., Wihl J. et al. Impact of ABCB1 variants on neutrophil depression: a pharmacogenomic study of paclitaxel in 92 women with ovarian cancer. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012; 110(2): 199-204.
29. Houtsma D., Guchelaar H.J., Gelderblom H. Pharmacogenetics in oncology: a promising field. *Curr Pharm Des*. 2010; 16(2): 155-63.
30. Assis J., Pereira D., Gomes M., Marques D., Marques I., Nogueira A et al. Influence of CYP3A4 genotypes in the outcome of serous ovarian cancer patients treated with first-line chemotherapy: implication of a CYP3A4 activity profile. *Int J Clin Exp Med*. 2013; 6(7): 552-61.
31. Berrieman H.K., Lind M.J., Cawkwell L.. Do β -tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy. *The Lancet*. 2004; 5(3): 158-64.
32. Nami B.I., Wang Z. Genetics and Expression Profile of the Tubulin Gene Superfamily in Breast Cancer Subtypes and Its Relation to Taxane Resistance. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(8): 274.
33. Silver D.P., Richardson A.L., Eklund A.C., Wang Z.C., Szallasi Z., Li Q. et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28(7): 1145-53.
34. Byrski T., Dent R., Blecharz P., Foszczynska-Kłoda M., Gronwald J., Huzarski T. et al. Results of a phase II open-label, non-randomized trial of cisplatin chemotherapy in patients with BRCA1-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2012; 14(4): 110.
35. Wang C., Zhang J., Wan, Y., Ouyang T., Li J., Wang T. et al. Prevalence of BRCA1 mutations and responses to neoadjuvant chemotherapy among BRCA1 carriers and non-carriers with triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol*. 2015; 26(3): 523-28.
36. Hahnen E., Lederer B., Hauke J., Loibl S., Kröber S., Schneeweiss A. et al. Germline mutation status, pathological complete response, and disease-free survival in Triple-Negative breast Cancer: secondary analysis of the GeparSixto randomized clinical trial. *JAMA Oncol*. 2017; 10: 1378-85.
37. Tutt A., Tovey H., Cheang M.C.U., Kernaghan S., Kilburn L., Gazinska P. et al., Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *Nat. Med*. 2018; 24(5): 628-37.
38. Oliveira A.L., Rodrigues F.F., Santos R.E., Aoki T., Rocha M.N., Longui C.A. et al. GSTT1, GSTM1, and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in locally advanced breast cancer. *Genet Mol Res*. 2010; 9(2): 1045-53.
39. Gor P., Su H.I., Gray R., Gimotty P., Horn M., Aplenc R. et al. Cyclophosphamide- metabolizing enzyme polymorphisms and survival outcomes after adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(3): 26.
40. Bray J., Sludden J., Griffin M.J., Cole M., Verrill M., Jamieson D. et al. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br J Cancer*. 2010; 102(6): 1003-9.
41. Paluch-Shimon S., Friedman E., Berger R., Papa M., Dadiani M., Friedman N. et al. Neo-adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel in triple-negative breast cancer among BRCA1 mutation carriers and non-carriers. *Breast Cancer Res Treat*. 2016; 157(1): 157-65.
42. Huun ., Gansmo L.B., Mannsåker B., Iversen G.T., Øvrebo J.I., Lonning P.E. et al. Impact of the MDM2 splice-variants MDM2-A, MDM2-B and MDM2-C on cytotoxic stress response in breast cancer cells. *BMC Cell Biol*. 2017; 18(1): 17.
43. Pellegrino M., Mancini F., Lucà R., Coletti A., Giacchè N., Manni I. et al. Targeting the MDM2/MDM4 interaction interface as a promising approach for p53 reactivation therapy. *Cancer Res*. 2015; 75(21): 4560-72.
44. Chumakov P.M. P53 protein and its universal functions in a multicellular organism. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2007; 47: 3-52. (in Russian)
45. Tsuji D., Ikeda M., Yamamoto K., Nakamori H., Kim Y.I., Kawasaki Y. et al. Drug-related genetic polymorphisms affecting severe chemotherapy-induced neutropenia in breast cancer patients: A hospital-based observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(44): 515.
46. Hofmann M.H., Bliervernicht J.K., Klein K. Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 325: 284-92.
47. Yao S., Barlow W.E., Albain K.S., Choi J-Y, Zhao H., Livingston R.B. et al. Gene polymorphisms in cyclophosphamide metabolism pathway, treatment-related toxicity, and disease-free survival in SWOG 8897 clinical trial for breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(24): 6169-76.
48. Islam M.S., Islam M.S., Parvin S., Ahmed M.U., Bin Sayeed M.S., Uddin M.M. et al. Effect of GSTP1 and ABC4 gene polymorphisms on response and toxicity of cyclophosphamide-epirubicin-5-fluorouracil-based chemotherapy in Bangladeshi breast cancer patients. *Tumour Biol*. 2015; 36(7): 5451-7.
49. Fridley B.L., Batzler A., Li L., Li F., Matimba A., Jenkins G.D. et al. Gene set analysis of purine and pyrimidine antimetabolites cancer therapies. *Pharmacogenet Genomics*. 2011; 21(11): 701-12.

50. Del Re M., Quaquerini E., Sottotetti F., Michelucci A., Palumbo R., Simi P. et al. Uncommon dihydropyrimidine dehydrogenase mutations and toxicity by fluoropyrimidines: a lethal case with a new variant. *Pharmacogenomics*. 2016; 17(1): 5-9.
51. Ludovini V., Antognelli C., Rulli A., Foglietta J., Pistola L., Eliana R. et al. Influence of chemotherapeutic drug-related gene polymorphisms on toxicity and survival of early breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*. 2017; 17(1): 502.
52. D'Alesio C., Bellese G., Gagliani M.C., Aiello C., Grasselli E., Marcocci G. et al. Cooperative antitumor activities of carnosic acid and Trastuzumab in ERBB2+ breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017; 36(1): 154.
53. Litton J.K., Rugo H.S., Ettl J., Hurvitz S.A., Gonçalves A., Lee K.H. et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 2018; 379(8): 753-63.
54. Pawar A., Prabhu P. Nanosoldiers: A promising strategy to combat triple negative breast cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019; 110: 319-41.
55. Xin Y., Huang Q., Tang J.Q., Hou X.Y., Zhang P., Zhang L.Z. et al. Nanoscale drug delivery for targeted chemotherapy. *Cancer Lett*. 2016; 379(1): 24-31.
56. Postnov V.N., Naumysheva E.B., Korolev D.V., Galagudza M.M. Nanoscale carriers for drug delivery. *Biotechnosfera*. 2013; 6: 16-27.
57. Li M., Du C., Guo N., Teng Y., Meng X., Sun H. et al. Composition design and medical application of liposomes. *Eur J Med Chem*. 2019; 164: 640-53.
58. Tran T.H., Nguyen H.T., Le N.V., Tran T.T., Lee J.S., Ku S.K. et al. Engineering of multifunctional temperature-sensitive liposomes for synergistic photothermal, photodynamic, and chemotherapeutic effects. *Int J Pharm*. 2017; 528(1-2): 692-704.
59. Bhatt P., Lalani R., Vhora I., Patil S., Amrutiya J., Misra A., Mashru R. Liposomes encapsulating native and cyclodextrin enclosed paclitaxel: Enhanced loading efficiency and its pharmacokinetic evaluation. *Int J Pharm*. 2018; 536(1): 95-107.
60. Salkho N.M., Paul V., Kawak P., Vitor R.F., Martins A.M., Al Sayah M. et al. Ultrasonically controlled estrone-modified liposomes for estrogen-positive breast cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018; 46(2): 462-72.
61. Zhang H., Yu N., Chen Y., Yan K., Wang X. Cationic liposome codelivering PI3K pathway regulator improves the response of BRCA1-deficient breast cancer cells to PARP1 inhibition. *J Cell Biochem*. 2019; 14: 4469-77.
62. Bogdanovic G., Djordjevic A. Carbon nanomaterials: Biologically active fullerene derivatives. *Srp Arh Celok Lek*. 2016; 144(3-4): 222-31.
63. Johnston H.J., Hutchison G.R., Christensen F.M., Aschberger K., Stone V. The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity. *Toxicol Sci*. 2010; 114(2): 162-82.
64. Bogdanović G., Kojić V., Djordjević A., Canadanović-Brunet J., Vojinović-Miloradov M., Baltić V.V. Modulating activity of fullerol C60(OH)22 on doxorubicin-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2004; 18(5): 629-37.
65. Foldvari M., Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomedicine*. 2008; 4(3): 183-200.
66. Wang L., Shi J., Jia X. NIR - pH-Responsive drug delivery of functionalized single-walled carbon nanotubes for potential application in cancer chemo-photothermal therapy. *Pharmaceutical Research*. 2013; 30(11): 2757-71.
67. Guo X.L., Kang X.X., Wang Y.Q., Zhang X.J., Li C.J., Liu Y. et al. Co-delivery of cisplatin and doxorubicin by covalently conjugating with polyamidoamine dendrimer for enhanced synergistic cancer therapy. *Acta Biomater*. 2019; 84: 367-77.

Сведения об авторах:

Бурденный А.М., канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; ФГБНУ «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН;

Лукина С.С., студент ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России;

Заварыкина Т.М., канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. химической физики биоаналитических процессов ФГБНУ «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН;

Пронина И.В., канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Бреннер П.К., ст. лаборант лаб. химической физики биоаналитических процессов ФГБНУ «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН; ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина»;

Капралова М.А., ст. лаборант лаб. химической физики биоаналитических процессов ФГБНУ «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН; ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина»;

Аткарская М.В., науч. сотр. лаб. химической физики биоаналитических процессов ФГБНУ «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН;

Филиппова Е.А., мл. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Иванова Н.А., мл. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Круглова М.П., ст. преподаватель каф. патологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России;

Белова М.В., доктор биол. наук, проф. каф. фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России;

Бахрушина Е.О., доцент, канд. фарм. наук, доцент каф. фармацевтической технологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России;

Брага Э.А., доктор биол. наук, проф., зав. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» РАН;

Логинов В.И., канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» РАН.

© Коллектив авторов, 2019

УДК 611.018.2:612.014.1

Шурыгина И.А.^{1,2}, Шурыгин М.Г.¹

Митогенактивируемые протеинкиназы как мишень для регуляции роста соединительной ткани

¹ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», 664003, г. Иркутск, Россия, ул. Борцов Революции, д. 1;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», 634050, г. Томск, Россия, Московский тракт, д. 2

В обзоре представлены современные представления о функции основных групп митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК) (ERK, JNK, p38). Показаны особенности функционирования каскадов. Представлена роль МАРК в регуляции функциональной активности фибробластов. Обобщены данные о влиянии активации и блокады внутриклеточных сигнальных каскадов на регуляцию роста соединительной ткани. Основное внимание как наиболее перспективному в плане регуляции роста соединительной ткани уделено семейству p38 МАРК. Представлен собственный опыт работы в данном направлении. В частности продемонстрировано, что стимуляция p38 МАРК при подавлении активности JNK каскада ведет к ускоренному образованию соединительной ткани в зоне послеоперационного хирургического рубца. Доказана возможность управления ростом соединительной ткани при воздействии на МАР-киназные каскады – пролонгированная блокада p38 МАРК снижает ширину кожного рубца и плотность коллагеновых волокон в зоне формирования послеоперационного рубца, снижает привлечение прогениторных клеток фибробластического ряда в зону формирования послеоперационного рубца, повышает фиброкластическую активность. Применение оригинального противоспаечного средства снижает интенсивность спайкообразования в брюшной полости при травме брюшины, усиливает апоптоз перитонеальных фибробластов. Таким образом, учитывая важную роль МАРК каскадов, доказанную возможность влиять на формирование соединительной ткани, использование стимуляторов и ингибиторов МАРК перспективно как новое направление в лечении многих заболеваний, патогенез которых связан с нарушением клеточной дифференцировки и пролиферации.

Ключевые слова: митогенактивируемая протеинкиназа; p38 МАРК; JNK МАРК; ERK МАРК; ингибитор МАРК; соединительная ткань.

Для цитирования: Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. Митогенактивируемые протеинкиназы как мишень для регуляции роста соединительной ткани. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 151-157.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.151-157

Для корреспонденции: Шурыгина Ирина Александровна, e-mail: irinashurygina@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания учредителя.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.04.2018

Shurygina I.A.^{1,2}, Shurygin M.G.¹

Mitogen-activated protein kinases as a target for regulating of the connective tissue growth

¹Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Bortsov Revolutsii str. 1, 664003, Irkutsk;

²Siberian State Medical University, Moskovsky tract 2, 634050, Tomsk,

The review presents modern ideas about the function of the main groups of mitogen-activated protein kinases (MAPK) (ERK, JNK, p38). The authors consider influence on these signaling cascades as a promising direction for activation of connective tissue growth. The main focus as the most promising in terms of regulating the growth of connective tissue is given to the p38 MAPK family. The authors represent their own experience in this area. In particular, the article shows that p38 MAP-kinase stimulation while JNK inactivation causes accelerated formation of connective tissue in the area of postoperative surgical scar. The authors proved the possibility of controlling the growth of connective tissue when exposed to MAP kinase cascades - prolonged p38 MAPK blockade reduces the width of the skin scar and the density of collagen fibers in the zone of postoperative scar formation, reduces the involvement of progenitor fibroblastic cells in the zone of post-operative scar formation, increases fibroclastic activity. The use of the original anti-adhesive agent reduces the intensity of adhesions in the abdominal cavity with peritoneal injury, enhances apoptosis of peritoneal fibroblasts. Thus, given the important role of MAPK cascades, a proven ability to influence the formation of connective tissue, the use of stimulants and MAPK inhibitors is promising as a new direction in the treatment of many diseases whose pathogenesis is associated with impaired cell differentiation and proliferation.

Keywords: mitogen-activated protein kinase; p38 MAPK; JNK MAPK; ERK MAPK; MAPK inhibitor; connective tissue.

For citation: Shurygina I.A., Shurygin M.G. Mitogen-activated protein kinases as a target for regulating of the connective tissue growth. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 151-157. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.151-157

For correspondence: *Irina A. Shurygina*, Doctor of Medical Sciences, prof. RAS, deputy director for Science, Federal State Budgetary Scientific Institution "Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology", Bortsov Revolutsii str. 1, Irkutsk, 664003, Russian Federation, e-mail: irinashurygina@gmail.com.

Information about authors:

Shurygina I.A., <https://orcid.org/0000-0003-3980-050X>

Shurygin M.G., <https://orcid.org/0000-0001-5921-0318>

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 13.04.2018

Введение

Замещение соединительной тканью функционально активных структур является важной проблемой саноногенеза при широко распространенных заболеваниях, вносящих существенный вклад в снижение качества жизни и продолжительности жизни (кардиосклероз, цирроз печени, контрактуры суставов, спаечная болезнь, пневмосклероз). Разработка новых направлений, касающихся контроля и регуляции роста соединительной ткани, представляется крайне актуальной.

Иркутский научный центр хирургии и травматологии в течение 10 лет разрабатывает новые подходы, направленные на регуляцию роста соединительной ткани при помощи воздействия на компоненты внутриклеточных сигнальных каскадов. В качестве мишеней могут рассматриваться компоненты каскадов, обеспечивающие передачу сигналов с мембранных рецепторов в ядро клетки, что позволяет значимо влиять на пролиферативную и синтетическую активность клеток в зоне повреждения. Наиболее перспективными в этом нам представляются митогенактивируемые протеинкиназы (МАРК). МАРК регулируют экспрессию генов в клетках под действием внешних стимулов и играют значимую роль при делении клеток, их дифференцировке, выживании, элиминации путем апоптоза [1].

Выделяют типичные (передача сигнала происходит трехуровневым путем за счет фосфорилирования белков-мишеней в цепочке из двух ферментов) и атипичные МАРК (двухуровневый путь активации).

В настоящее время у млекопитающих выделяют следующие типы МАРК:

1) группа ERK (extracellular signal-regulated kinases) (ERK1, ERK2) – наиболее хорошо изученная группа. ERK МАРК активируются различными внеклеточными сигналами – в основном факторами роста, но могут быть активированы цитокинами, канцерогенами [2, 3]

2) группа JNK (c-Jun N-terminal kinase) – это стресс-активируемые протеинкиназы, участвующие в

процессах клеточной дифференцировки, пролиферации, апоптозе и воспалении. Они активируются цитокинами и целым рядом других внешних воздействий, например, ультрафиолетовым облучением [4, 5].

3) группа р38 МАРК-киназ (МАРК11, МАРК12, МАРК13, МАРК14) – активируются при воздействии провоспалительных цитокинов, ультрафиолетового облучения, липополисахаридов, факторов роста. Отвечают за дифференцировку клеток, воспаление, апоптоз [6]. Киназы р38 и JNK, в отличие от относительно хорошо изолированного пути ERK1/2, имеют общие звенья активации и используют одни и те же цепочки внутриклеточных ферментов для передачи сигнала. Существует мало стимулов, которые могут вызвать активацию JNK без одновременной активации р38. Так, JNK имеют ряд субстратов, которые могут фосфорилировать только они. В то время как р38 МАРК также имеют некоторые уникальные мишени, обеспечивая необходимость участия в обоих каскадах (JNK и р38) для ответа на стрессовые стимулы.

4) ERK5 (extracellular signal-regulated kinase 5) – участвует в пролиферации клеток, активируется факторами роста. Она играет важную роль для развития сердечно-сосудистой системы и необходима для функционирования эндотелиальных клеток.

5) ERK3 и ERK4 – относятся к атипичным МАРК-киназам, транслоцируются в ядро при активации, вызывая фосфорилирование факторов транскрипции [7].

6) ERK7/8 – новейший член семейства МАРК-киназ, до настоящего времени недостаточно изучен. Он активируется стрессорными факторами и митогенами, суперэкспрессия может ингибировать клеточный цикл в S-фазе. Благодаря своей роли в защите целостности генома и подвижности клеток ERK7/8 является потенциальной мишенью для терапии рака [8, 9].

МАРК как система передачи информации в клетке. МАРК каталитически неактивны в своей основной

форме. Для активации они требуют (потенциально многократных) событий фосфорилирования в своих циклах активации, в результате чего относительно слабый сигнал, воздействующий на поверхностные рецепторы клеток, многократно усиливается, и информация поступает к ядру клетки. Результатом является формирование быстрого ответа на поступивший сигнал [10]. При этом активировать MAPK могут различные факторы: воздействие цитокинов, факторов роста, гормонов, ультрафиолетовое облучение, осмотический шок, ишемия-реперфузия, механическое воздействие [11].

После открытия MAPK целью исследователей являлся поиск соединений, позволяющих блокировать данные системы, желательнее с селективным характером воздействия. Единой химической классификации данных веществ на настоящий момент не существует, их делят по каскадам, на которые направлено воздействие. Одной только фирмой Tocris Bioscience (United Kingdom) производится 23 ингибитора p38 MAPK, 13 ингибиторов JNK MAPK и 8 – ERK MAPK.

MAPK как потенциальные регуляторы роста соединительной ткани. Круг публикаций, посвященный MAPK, достаточно широк. В US National Library of Medicine National Institutes of Health по запросу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=MAPK> на 09.07.19 г. найдено 53833 публикации. Ингибиторам MAPK посвящено 15852 работ. В то же время оценке роли MAPK в регуляции функции фибробластов и роста соединительной ткани уделено недостаточно внимания. Не обнаружено ни одной обзорной работы, посвященной этой теме. Данный обзор основан на анализе оригинальных исследований, в той или иной мере касающихся роста соединительной ткани при воздействии на MAPK каскады.

В частности показано, что при активации p38 MAPK за счет применения трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) наблюдается усиление фиброза [12]. При действии TGF $\beta 1$ на клетки, выделенные из мягкой мозговой оболочки крыс линии Sprague Dawley, наблюдалось значительное повышение экспрессии фактора роста соединительной ткани и p38 MAPK. Однако при применении блокатора p38 MAPK SB203580 (4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-1H-imidazol-4-yl]pyridine) в течение 1ч перед обработкой TGF $\beta 1$ удалось снизить экспрессию данных факторов. Об аналогичных наблюдениях в отношении гипертрофированной желтой связки сообщили Cao Y.L. et al. (2016) при применении ингибитора p38 SB 203580 [13], фибробластов оболочки глаза - Luo Y.H. et al. (2014). Интересно, что применение ингибитора JNK SP 600125 (Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-one) не оказывало подобного эффекта [13].

При изучении культуры гладкомышечных клеток коронарных артерий человека установлено, что активация p38 MAPK приводит к позитивному фиброзу. Введение ингибитора AGI-1067 не только резко ингибировало активацию MAPK p38, но также подавляло экспрессию TGF $\beta 1$, фактора роста соединительной ткани, коллагена I и VIII типа, снижало выраженность фиброза [14].

С учетом того, что JNK и p38 MAPK каскады тесно связаны, интересно наблюдение, демонстрирующее, что подавлении активности JNK каскада может демонстрировать стимуляцию p38 MAPK, при этом отмечается усиленное образование соединительной ткани в зоне повреждения кожи и подкожной клетчатки [15, 16]. Противоположную направленность в плане формирования соединительной ткани в отношении p38 и JNK MAPK демонстрируют Dolivo D.M. и соавт. [17]. Они показали, что ингибирование p38 MAPK с помощью малых молекул было достаточным для ослабления TGF β -опосредованной активации дермальных фибробластов человека и перехода этих фибробластов в миофибробласты. Напротив, блокада ERK или JNK усиливали такой переход. Ингибирование ERK и JNK заметно увеличивало экспрессию, а ингибирование p38 уменьшало экспрессию канонического маркера миофибробласта α -гладкомышечного актина. Фибробласты, культивируемые в присутствии ингибиторов ERK и JNK, продемонстрировали миофибробластическую морфологию, в то время как фибробласты, культивируемые в присутствии ингибитора p38, выглядели более удлиненными и не имели видимых стрессовых волокон актина [17].

Установлено, что активация p38, ERK1/2 и JNK усиливает фиброз при инфаркте миокарда [18]. На модели трансгенных мышей показано, что активация p38 при действии MKK6bE влияет на ремоделирование внеклеточного матрикса в миокарде и развитие контрактальной дисфункции, существенно усиливает фиброз. В то же время применение селективного блокатора p38 SB 239068 (trans-4-[4-(4-Fluorophenyl)-5-(2-methoxy-4-pyrimidinyl)-1H-imidazol-1-yl]cyclohexanol) перорально в течение 2 или 12 нед снижает интенсивность данного процесса [19].

Изучена роль активации MAPK в развитии легочного фиброза. Так, Weng J. et al. (2019) при обработке эмбриональных фибробластов легких человека амиодароном исследовали молекулярный механизм индуцированного амиодароном легочного фиброза. Установлено, что амиодарон стимулировал пролиферацию клеток и секрецию коллагена, индуцировал экспрессию α -гладкомышечного актина и мРНК виментина, что сопровождалось повышенным фосфорилированием

ем MAPK ERK1/2 и p38. Однако при обработке клеток SB203580 значительно снижался пролиферативный ответ и продукция α -гладкомышечного актина, виментина и коллагена [20].

С учетом вышеизложенного, в качестве мишени для целенаправленного изменения активности клеток в тканях при репаративных процессах с целью управления ростом соединительной ткани с нашей точки зрения наиболее интересна и перспективна группа p38 MAPK.

Эта перспективность доказана нами экспериментально при применении оригинальных пролонгированных способов доставки в послеоперационную рану блокатора p38 MAPK SB203560 в составе лекарственной пленки пролонгированного действия¹ – показано снижение ширины рубца на коже и плотности коллагеновых волокон при сохранении механической прочности в зоне формирования послеоперационного рубца, снижение привлечения прогениторных клеток фибробластического ряда в зону формирования послеоперационного рубца, повышение фиброкластической активности [21–25]. Применение оригинального противоспаечного средства Serogard[®] снижало интенсивность спайкообразования в брюшной полости при травме брюшины, усиливало апоптоз перитонеальных фибробластов² [26, 27].

Одной из актуальных проблем заживления ран кожи является формирование гипертрофических кожных рубцов. При данной патологии характерна гиперпродукция коллагена фибробластами [28]. Современные данные позволяют предположить, что активация MAPK (ERK1/2, p38, JNK) играет роль в патогенезе развития этого состояния. При этом активатором MAPK может выступать TGF β 1 [29–32].

При периодическом воздействии на культуру фибробластов, выделенных из гипертрофической рубцовой ткани пациентов, отрицательного давления с использованием вакуумного прибора, наблюдалось усиление фосфорилирования p38 MAPK, повышение экспрессии TGF β 1 и α -гладкомышечного актина. При этом предварительная обработка фибробластов блокатором p38 MAPK SB 203580 сводила на нет данные эффекты [33].

Перспективным является возможность применения воздействия на MAPK каскады при развитии фиброза

печени. Интересно исследование, касающееся возможного участия активации MAPK в развитии фиброза в печени. При инкубировании срезов печени человека (операционный материал) наблюдалось повышение экспрессии проколлагена типа 1A1, что авторы статьи расценивают как модель для изучения действия противофибротических средств. Применение же на этой модели ингибитора p38 MAPK SB 203580 продемонстрировало снижение уровня экспрессии проколлагена [34].

Как известно, формирование внеклеточного компонента зависит не только от уровня продукции коллагена фибробластами, но и от перестройки соединительнотканых волокон под действием специфических ферментов металлопротеиназа (MMP) [35–38].

MAPK каскады способны воздействовать на экспрессию металлопротеиназ [39, 40]. При этом p38 MAPK способны индуцировать металлопротеиназы, отвечающих за перестройку внеклеточного матрикса [41], а ERK, напротив, снижает их экспрессию в фибробластах [42].

Индукцию экспрессии MMP-13 ингибировали обработкой фибробластов специфическим ингибитором p38 SB 203580, в то время как блокирование пути ERK1/ERK2 с помощью селективного ингибитора PD 98059 существенно увеличивает экспрессию MMP-13. Кроме того, специфическая активация пути ERK1/ERK2 с помощью 12-О-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетата заметно подавляла экспрессию MMP-13 в дермальных фибробластах в коллагеновом геле. Эти результаты показывают, что коллаген-зависимая индукция MMP-13 в дермальных фибробластах требует активности p38 и ингибируется активацией ERK1/ERK2. Следовательно, баланс между активностью путей ERK1/ERK2 и p38 MAPK, по-видимому, имеет решающее значение для регуляции экспрессии MMP-13 в дермальных фибробластах, предполагая, что p38 MAPK может служить мишенью для селективного ингибирования деградации коллагена [41].

Одними из известных активаторов MAPK каскадов служат различные факторы роста. Так, фактор роста фибробластов (FGF) активирует сигнальные пути ERK1/ERK2, p38 и JNK [43–46]. F.V. Engel и соавт. показали, что их использование при одновременном применении ингибитора p38 MAPK SB 203580 (внутрибрюшинно 1 раз в 3 сут в течение 4 нед) и FGF1 однократно в пограничную зону инфаркта сразу после перевязки коронарной артерии наблюдается стимуляция митоза кардиомиоцитов, уменьшается размер и плотность постинфарктного рубца. Напротив, изолированная терапия с помощью SB203580 не восстанавливает функцию сердца, несмотря на усиление митоза кардиомиоцитов [47].

¹Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. *Лекарственная пленка пролонгированного действия, способ изготовления и способ ее применения*. Патент 2445074, РФ; 2010.

²Shurygin M.G., Shurygina I.A. *Compounds, pharmaceutical compositions and a method for the prophylaxis and treatment of the adhesion process*. Патент 2012156938, WO; 2012.

К сожалению, клиническое применение веществ, воздействующих на активность MAPK каскадов в настоящее время лимитируется недостаточной эффективностью ингибиторов p38. Это, вероятно, обусловлено невозможностью создания высоких локальных концентраций в зоне регенерации при системном применении препаратов и развитием побочных эффектов при повышении дозы препаратов. Недостаточная эффективность ингибиторов p38 MAPK может быть также связана с наличием у киназ p38 и JNK общих звеньев активации и одних и тех же цепочек внутриклеточных ферментов для передачи сигнала.

В частности, показана недостаточная клиническая эффективность при системном применении неселективных ингибиторов p38 MAPK Pamarimod (6-(2,4-Difluorophenoxy)-2-[[3-hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)propyl]amino]-8-methylpyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-one) и VX-702 (6-[(Aminocarbonyl)(2,6-difluorophenyl)amino]-2-(2,4-difluorophenyl)-3-pyridinecarboxamide) при ревматоидном артрите [48].

К побочным эффектам применения ингибитора p38 MAPK «Pamarimod» относят повышение уровня цитолитических ферментов, высыпания на коже и повышение восприимчивости к инфекционным заболеваниям [49]. Данные побочные эффекты не зарегистрированы для другого ингибитора p38 MAPK - «Iosmarimod» (6-[5-(cyclopropylcarbamoyl)-3-fluoro-2-methylphenyl]-N-(2,2-dimethylpropyl) pyridine-3-carboxamide) [50]. В исследовании III фазы, LATITUDE-TIMI 60, обнаружено, что лечение пациентов, госпитализированных с острым инфарктом миокарда Iosmarimod, не снижает риск серьезных неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [51].

Заключение

Учитывая важную роль и универсальность MAPK-киназных каскадов в регуляторных процессах, ответах клеток на внешние стимулы, перспективно изучение участия данных механизмов в универсальных биологических процессах, таких как воспаление, регенерация, трансформация соединительнотканых структур. Понимание роли MAPK каскадов в этих процессах открывает возможность разработки способов воздействия на рост соединительной ткани. Использование стимуляторов и блокаторов MAP-киназных механизмов перспективно как новое направление в лечении многих заболеваний, патогенез которых связан с избыточным или недостаточным развитием соединительнотканых структур. Важна разработка способов локальной доставки и создания локально высоких концентраций действующих веществ в зоне регенерации.

Литература (п.п. 1-9; 12-15; 17-20; 22; 24; 29; 31-36; 39; 41-45; 49-53 см. References)

- Атауллаханов Ф.И. Каскады ферментативных реакций и их роль в биологии. *Соросовский образовательный журнал*. 2000; 6(7): 2-7.
- Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б. Роль MAP-киназных механизмов в регуляции клеточного роста (обзор литературы). *Сибирский медицинский журнал*. 2009; 89(6): 36-40.
- Гранина Г.Б., Зеленин Н.В., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Лепехова С.А., Зеленин В.Н. Подавление активности Jnk MAPK в регуляции синтеза коллагена при раневом процессе. *Acta Biomedica Scientifica*. 2010; 5(75): 177-9.
- Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. *Лекарственная пленка пролонгированного действия, способ изготовления и способ ее применения*. Патент 2445074, РФ; 2010.
- Шурыгина И.А., Мантурова Н.Е., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б., Шурыгин М.Г. Использование блокатора p38 митогенактивируемой протеинкиназы для формирования послеоперационного рубца. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2014; 3: 41-5.
- Зеленин Н.В., Мантурова Н.Е., Шурыгин М.Г., Гранина Г.Б., Уманец В.А., Шурыгина И.А. Ингибирование сигнального каскада митогенактивированных протеинкиназ группы p38 как новая перспектива для улучшения качества послеоперационных рубцов. *Вопросы реконструктивной и пластической хирургии*. 2018; 21(4): 13-9.
- Шурыгина И.А., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б., Шурыгин М.Г. Влияние блокатора p38 MAPK на дифференцировку фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца. *Патогенез*. 2018; 16(2): 43-7.
- Shurygin M.G., Shurygina I.A. *Compounds, pharmaceutical compositions and a method for the prophylaxis and treatment of the adhesion process*. Patent 2012156938, WO; 2012.
- Шурыгина И.А., Аюшинова Н.И., Чепурных Е.Е., Шурыгин М.Г. Способ профилактики спаячной болезни брюшной полости. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2017; 146(10): 83-7.
- Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Аюшинова Н.И., Кая О.В. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани. *Сибирский медицинский журнал*. 2012; 110(3): 8-12.
- Ахмедов В.А., Долгих В.Т., Наумов Д.В., Нечипоренко Н.А. Клиническое значение матриксных металлопротеиназ при сердечно-сосудистой патологии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 57(2): 77-9.
- Ахмедов В.А., Долгих В.Т., Наумов Д.В., Нечипоренко Н.А. Участие матриксной металлопротеиназы-9 и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 в механизмах формирования пароксизмов фибрилляции предсердий у больных с метаболическим синдромом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 57(4): 46-50.
- Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., Кая О.В. Матриксная металлопротеаза 9 и ремоделирование при инфаркте миокарда. *Acta Biomedica Scientifica*. 2013; 90(2-1): 138-41.
- Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. Фактор роста фибробластов как стимулятор ангиогенеза при инфаркте миокарда. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2010; 30(6): 89-92.
- Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. Влияние уровня FGF2 на динамику фаз воспаления при постинфарктном кардиосклерозе.

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2010; 4: 34-7.

48. Портниченко А.Г. Факторы роста и адаптация миокарда к гипоксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 4: 35-44.

References

1. Kyriakis J.M., Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol. Rev.* 2012; 92(2): 689–737.
2. Yao Y., Li W., Wu J., Germann U.A., Su M.S., Kuida K. et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(22): 12759–64.
3. Pages G., Guerin S., Grall D., Bonino F., Smith A., Anjuere F. et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science.* 1999; 286(5443): 1374–7.
4. Bode A.M., Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Mol. Carcinog.* 2007; 46(8): 591–8.
5. Waetzig V., Herdegen T. Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; 26(9): 455–61.
6. De Boer W.I. Perspectives for cytokine antagonist therapy in COPD. *Drug Discov. Today.* 2005; 10(2): 93–106.
7. Kant S., Schumacher S., Singh M.K., Kispert A., Kotlyarov A., Gaestel M. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(46): 35511–9.
8. Coulombe P., Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1773(8): 1376–1387.
9. Boutros T., Chevet E., Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2008; 60(3): 261–310.
10. Ataullakhanov F.I. The cascades of enzymatic reactions and their role in biology. *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zh.* 2000; 6(7): 2–10. (in Russian)
11. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Zelenin N.V., Granina G.B. Role of MAP-kinase mechanisms in the regulation of cell growth (review). *Sibirskiy Medicinskiy J.* 2009; 89(6): 36–40. (in Russian)
12. Yue X.J., Guo Y., Yang H.J., Feng Z.W., Li T., Xu Y.M. Transforming growth factor-β1 induces fibrosis in rat meningeal mesothelial cells via the p38 signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 2016; 14(2): 1709–13.
13. Cao Y.L., Duan Y., Zhu L.X., Zhan Y.N., Min S.X., Jin A.M. TGF-β1, in association with the increased expression of connective tissue growth factor, induce the hypertrophy of the ligamentum flavum through the p38 MAPK pathway. *Int. J. Mol. Med.* 2016; 38(2):391–8.
14. Liu Z., Shi S., Zhu H., Chen Y., Zhang Y., Zheng Z., Wang X. Novel ASK1 inhibitor AGI-1067 attenuates AGE-induced fibrotic response by suppressing the MKKs/p38 MAPK pathway in human coronary arterial smooth muscle cells. *Int. Heart J.* 2018; 59(6): 1416–24.
15. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Granina G.B., Zelenin N.V. Application of mitogen-activated protein kinase inhibitor SP 600125 for wound healing control. *J. Regenerative Medicine Tissue Engineering.* 2013; 2.
16. Granina G.B., Zelenin N.V., Shurygina I.A., Shurygin M.G., Lepekhova S.A., Zelenin V.N. Suppression of activity of Jnk MAPK in regulation of collagen synthesis at wound process. *Acta Biomedica Scientifica.* 2010; 5: 177–9. (in Russian)
17. Dolivo D.M., Larson S.A., Dominko T. FGF2-mediated attenuation of myofibroblast activation is modulated by distinct MAPK sig-

- nal pathways in human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 2017; 88(3): 339–48.
18. Li C., Li J., Xue K., Zhang J., Wang C., Zhang Q. et al. MicroRNA-143-3p promotes human cardiac fibrosis via targeting sprouty3 after myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2019; 129: 281–92.
19. Li M., Georgakopoulos D., Lu G., Hester L., Kass D.A., Hasday J. et al. p38 MAP kinase mediates inflammatory cytokine induction in cardiomyocytes and extracellular matrix remodeling in heart. *Circulation.* 2005; 111(19): 2494–502.
20. Weng J., Tu M., Wang P., Zhou X., Wang C., Wan X. et al. Amiodarone induces cell proliferation and myofibroblast differentiation via ERK1/2 and p38 MAPK signaling in fibroblasts. *Biomed. Pharmacother.* 2019; 115: 108889.
21. Shurygin M.G., Shurygina I.A. *Prolonged-release medicated film, method for preparing and applying it.* Patent 2445074, RF; 2010. (in Russian)
22. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Granina G.B., Zelenin N.V., Ayushinova N.I. Using laser confocal microscopy to assess the activity of map kinase systems in the reparative process. *Bul. Russian Academy of Sciences: Physics.* 2016; 80(1): 14–6.
23. Shurygina I.A., Manturova N.E., Zelenin N.V., Granina G.B., Shurygin M.G. Using p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor for the formation of the postoperative scar. *Annaly plasticheskoy i esteticheskoy khirurgii.* 2014; 3: 41–5. (in Russian)
24. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I., Granina G.B., Zelenin N.V. Mechanisms of connective tissue formation and blocks of mitogen activated protein kinase. *Front. Chem. Sci. Eng.* 2012; 6(2): 232–7.
25. Zelenin N.V., Manturova N.E., Shurygin M.G., Granina G.B., Umanets V.A., Shurygina I.A. Inhibition of signaling cascade of group p38 mitogen-activated protein kinase as a new promise for improvement of quality of postoperative scars. *Voprosy rekonstruktivnoy i plasticheskoy khirurgii.* 2018; 21(4): 13–9. (in Russian)
26. Shurygina I.A., Zelenin N.V., Granina G.B., Shurygin M.G. Influence of p38 MAPK inhibitors on fibroblast differentiation in the area of postoperative scar formation. *Patogenez.* 2018; 16(2): 43–7. (in Russian)
27. Shurygin M.G., Shurygina I.A. *Compounds, pharmaceutical compositions and a method for the prophylaxis and treatment of the adhesion process.* Patent 2012156938, WO; 2012.
28. Shurygina I.A., Ayushinova N.I., Chepurnyh E.E., Shurygin M.G. Method of prevention of abdominal cavity adhesive disease. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya.* 2017; 146(10): 83–7. (in Russian)
29. Shurygina I.A., Aushinova N.I., Shurygin M.G. Effect of p38 MAPK inhibition on apoptosis marker expression in the process of peritoneal adhesion formation. *Int. J. Biomedicine.* 2018; 8(4): 342–6.
30. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I., Kanya O.V. Fibroblasts and their role in the development of connective tissue. *Sibirskiy Meditsinskiy J.* 2012; 110(3): 8–12. (in Russian)
31. Liang C.J., Yen Y.H., Hung L.Y., Wang S.H., Pu C.M., Chien H.F. et al. Thalidomide inhibits fibronectin production in TGF-β1-treated normal and keloid fibroblasts via inhibition of the p38/Smad3 pathway. *Biochem. Pharmacol.* 2013; 85(11): 1594–602.
32. Song J., Xu H., Lu Q., Xu Z., Bian D., Xia Y. et al. Madecassoside suppresses migration of fibroblasts from keloids: involvement of p38 kinase and PI3K signaling pathways. *Burns.* 2012; 38(5): 677–84.
33. He S., Liu X., Yang Y., Huang W., Xu S., Yang S. et al. Mechanisms of transforming growth factor beta(1)/Smad signalling mediated by mitogen-activated protein kinase pathways in keloid fibroblasts. *Br. J. Dermatol.* 2010; 162(3): 538–46.

34. Xia W., Longaker M.T., Yang G.P. p38 MAP kinase mediates transforming growth factor-beta2 transcription in human keloid fibroblasts. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006; 290(3): 501–8.
35. Du Q.C., Zhang D.Z., Chen X.J., Lan-Sun G., Wu M., Xiao W.L. The effect of p38MAPK on cyclic stretch in human facial hypertrophic scar fibroblast differentiation. *PLoS One.* 2013; 8(1): e75635.
36. Westra I.M., Mutsaers H.A., Luangmonkong T., Hadi M., Oosterhuis D., de Jong K.P. et al. Human precision-cut liver slices as a model to test antifibrotic drugs in the early onset of liver fibrosis. *Toxicol. In Vitro.* 2016; 35: 77–85.
37. Akhmedov V.A., Dolgikh V.T., Naumov D.V., Nechiporenko N.A. The clinical significance of matrix metalloproteinases in heart and vascular pathology. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2013; 2: 77–9. (in Russian).
38. Akhmedov V.A., Dolgikh V.T., Naumov D.V., Nechiporenko N.A. The participation of matrix metalloproteinases-9 and TIMP-1 in formation of atrial fibrillation paroxysms in patients with metabolic syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2013; 4: 46–50. (in Russian).
39. Rohani M.G., Parks W.C. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol.* 2015; 44–46: 113–21.
40. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dremina N.N., Kanya O.V. Matrix metalloproteinase 9 and remodeling after myocardial infarction. *Acta Biomedica Scientifica.* 2013; 90(2-1): 138–41. (in Russian)
41. Holmstrom K.M., Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2014; 15(6): 411–21.
42. Nelson K.K., Melendez J.A. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 37(6): 768–84.
43. Ravanti L., Heino J., López-Otín C., Kahari V.M. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(4): 2446–55.
44. Westermark J., Li S.P., Kallunki T., Han J., Kahari V.M. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21(7): 2373–83.
45. Coumoul X., Deng C.X. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases. *Birth. Defects Res. C Embryo Today.* 2003; 69(4): 286–304.
46. Shurygin M.G., Shurygina I.A. Fibroblast growth factor as a stimulator of angiogenesis at myocardial infarction. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossijskoj akademii medicinskih nauk.* 2010; 30(6): 89–92. (in Russian)
47. Shurygin M.G., Shurygina I.A. Influence of FGF2 level on the inflammation phase dynamics at the postinfarction cardiosclerosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2010; 4: 34–7. (in Russian).
48. Portnychenko A.G. Growth factors and adaptation of myocardium to hypoxia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2012; 4: 35–44. (in Russian).
49. Engel F.B., Hsieh P.C., Lee R.T., Keating M.T. FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(42): 15546–51.
50. Kytтары V.C. Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs. *Drug Des. Devel. Ther.* 2012; 6: 245–50.
51. Cohen S.B., Cheng T.T., Chindalore V., Damjanov N., Burgos-Vargas R., Delora P. et al. Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(2): 335–44.
52. Kragholm K., Newby L.K., Melloni C. Emerging treatment options to improve cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndrome: focus on losmapimod. *Drug Des. Devel. Ther.* 2015; 9: 4279–86.
53. Tun B., Frishman W.H. Effects of anti-inflammatory medications in patients with coronary artery disease: a focus on losmapimod. *Cardiol. Rev.* 2018; 26(3): 152–6.

Сведения об авторах:

Шурыгина Ирина Александровна, доктор мед. наук, проф. РАН, заместитель директора по научной работе, зав. лаб. клеточных технологий и регенеративной медицины ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: shurygina@rambler.ru;

Шурыгин Михаил Геннадьевич, доктор мед. наук, зав. научно-лабораторным отделом ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: shurygin@rambler.ru

© Семенов Д.Г., Беляков А.В., 2019

УДК 612.821.2+616.8-092

Семенов Д.Г., Беляков А.В.

Модификация ПКЛ-теста для оценки поведенческой активности и памяти крыс

ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
199034, г. Санкт-Петербург, Россия, наб. Макарова, д. 6

Поведенческое тестирование лабораторных грызунов в приподнятом крестообразном лабиринте широко применяется в доклиническом тестировании препаратов, в психоневрологических исследованиях, при разработке профилактических и терапевтических мер коррекции неврологических расстройств.

Цель исследования – разработка и испытание модифицированного протокола тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте, повышающего возможность оценки индивидуальных поведенческих характеристик и уровня долговременной памяти крыс.

Методика. На крысах Вистар применено двойное тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте для определения изменений индивидуальных индексов тревожности и характеристик локомоторной и исследовательской активности в повторном тесте. Параллельно определялся индивидуальный индекс долговременной памяти методом «transfer latency». Первичное тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте показало нормальное распределение индекса тревожности для большинства из 130 тестируемых животных. Животные с предельно высоким индексом тревожности и крайне низкой активностью (12%) были исключены из последующего анализа. Основная группа была разделена на 4 подгруппы, в которых крысы повторно тестировались в крестообразном лабиринте через 24 ч (1-я и 2-я подгруппы) и через 72 ч (3-я и 4-я подгруппы).

Результаты. В контроле (1-я и 3-я подгруппы) повторный тест снижал исследовательскую и локомоторную активность, что «имитирует» повышение тревожности. При этом значение индекса долговременной памяти в контроле при трехсуточном интервале (3-я подгруппа) было несколько ниже, чем при суточном (1-я подгруппа). Животные экспериментальных подгрупп между тестами были подвергнуты двум вариантам гипоксии (тяжелая гипоксия для 2-й подгруппы и три сеанса умеренной гипоксии для 4-й подгруппы). Тяжелая гипоксия нивелировала характерный для контроля тормозный паттерн поведения и снижала индекс долговременной памяти. Умеренная гипоксия не давала подобных эффектов, что позволило видеть причину тормозного феномена двойного тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте скорее в развитии габитуации, основанной на долговременной памяти, чем в повышении тревожности.

Заключение. Предлагаемый протокол имеет ряд достоинств в сравнении с однократным тестированием в приподнятом крестообразном лабиринте. Он допускает изначальное поведенческое фенотипирование животных, что позволяет: 1) скорректировать протоколы последующих воздействий; 2) учитывать индивидуальные реакции животных на экспериментальное воздействие с возможностью исключения артефакта двойного тестирования; и 3) включить оценку долговременной памяти.

Ключевые слова: поведение; парное тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте; transfer latency-тест; габитуация; пространственная память.

Для цитирования: Семенов Д.Г., Беляков А.В. Модификация ПКЛ-теста для оценки поведенческой активности и памяти крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 158-164.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.158-164

Для корреспонденции Семенов Дмитрий Германович, e-mail: dsem50@rambler.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.05.2019

Semenov D.G., Belyakov A.V.

A modification of EPM test for evaluation of behavioral activity and memory of rats

I.P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences,
Naberezhnaya Makarova 6, St. Petersburg 199034, Russia

Behavioral testing of laboratory rodents in the elevated plus maze (EPM) is widely used in preclinical pharmacology and psychoneurology to develop preventive and therapeutic approaches for correction of neurological disorders. The aim of the work was to develop and test a modified EPM protocol to enhance evaluation of individual behavioral characteristics and the long-term memory in rats. A double EPM test was used in Wistar rats to study changes in individual anxiety indexes (AI) and locomotor and

exploratory activities in the second test. Also, individual Long-term Memory Indexes (LMI) were determined using the «transfer latency» method. The primary EPM test showed a normal distribution of AI for a majority of 130 rats except for 12% of animals with extremely high AI and low activity; these animals were excluded from the analysis. The main group was divided into 4 subgroups, which were subjected to the repeated test either in 24 hours (subgroups 1 and 2) or in 72 hours (subgroups 3 and 4). In the control subgroups (1 and 3), the second EPM test showed a decrease in exploratory and locomotor activities, which «mimicked» increased anxiety. The LMI value in subgroup 3 was somewhat lower than in subgroup 1. The experimental subgroups were exposed to different hypoxic impacts between the tests (severe hypoxia or three sessions of moderate hypoxia in subgroups 2 and 4, respectively). Severe hypoxia abolished the inhibitory pattern of behavior characteristic in the control group and reduced LMI. Moderate hypoxia did not exert such effects. This suggested that habituation based on long-term memory rather than anxiety was a cause for the inhibitory phenomenon of double EPM. The proposed protocol has advantages over a single EPM. This protocol allows a for initial phenotyping of animals 1) to adjust protocols of subsequent exposures; 2) to take into account individual responses of animals to experimental impacts, which makes it possible to exclude the artifact of double testing; and 3) to include an assessment of long-term memory.

Keywords: rat behavior; habituation; repeated EPM test; transfer latency test; spatial memory.

For citation: Semenov D.G., Belyakov A.V. A modification of EPM test for evaluation of behavioral activity and memory of rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 158-164. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.158-164

For correspondence:

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 25.05.2019

Введение

Количественная оценка поведения лабораторных грызунов в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) является распространенным методом доклинических исследований фармакологических препаратов, в частности, транквилизаторов. Метод успешно используется в экспериментальной психофизиологии при изучении механизмов функционирования и повреждения различных отделов головного мозга. Обычно при исследовании в ПКЛ сравнивают усредненные поведенческие характеристики двух групп животных – экспериментальной и контрольной. Применение ПКЛ в одной группе дважды, до и после применяемого воздействия, целесообразно по нескольким причинам. Во-первых, парадигма повторяемого теста ПКЛ (пПКЛ) позволяет еще до экспериментального воздействия выявить индивидуальный уровень тревожности животных и при повторном тесте оценивать эффект самого воздействия с учетом исходной специфики каждого животного. Среди крыс линии Вистар были выделены две подпопуляции, различающиеся предпочтением к активной или пассивной тактике избегания, причем, у них были обнаружены различия в конститутивной активности определенных генов [1]. Во-вторых, пПКЛ позволяет оценить эффект воздействия, наносимого между тестами, для каждой особи путем количественной оценки индивидуальной разницы между характеристиками 1-го и 2-го тестирования. В таком

случае сравниваются и статистически обрабатываются выборки этих разностей, полученных в контрольной и экспериментальной сериях, а не два рандомизированных массива данных однократного ПКЛ тестирования контрольной и экспериментальной групп. В-третьих, пПКЛ открывает возможность одновременного применения дополнительного теста на «время перемещения» – «transfer latency» (TL), характеризующего долговременную пространственную память и, при этом, не интерферирующего с оценкой тревожности [1-4]. Тест TL заключается в начальном позиционировании крысы не в центре ПКЛ лабиринта, а на конце его открытого рукава, и регистрации времени, в течение которого животное находит убежище в закрытом рукаве. При первом посещении лабиринта (ПКЛ1) на это тратится время TL_0 , обычно, десятки секунд. При втором тестировании (ПКЛ2) через «t» часов или суток животное уходит в закрытый рукав быстрее (TLt), при условии сохраненной пространственной памяти. Степень снижения TLt относительно TL_0 характеризует «прочность» этой памяти у данного животного для данного отрезка времени «t» между тестами.

Вместе с тем, парадигма пПКЛ имеет недостаток. Было замечено, что при повторном пребывании в ПКЛ животные демонстрируют сниженную посещаемость открытых рукавов по сравнению с первичным тестированием [5]. Этот феномен ранее обратил на себя вни-

вание, когда применение анксиолитических препаратов после ПКЛ1 приводило к парадоксальному повышению, а не снижению, показателей тревожности, регистрируемых в ПКЛ2 [6, 7,]. Некоторые авторы склонны считать этот феномен результатом именно повышения тревожности после ПКЛ1 [8]. Иное объяснение предполагает ведущую роль торможения локomotorной и/или исследовательской активности животного и, как следствие, автоматическое сокращение посещаемости открытых участков лабиринта [9], т.е. главного показателя, характеризующего тревожность. Каков бы ни был механизм этого феномена, методически следует отделять эффект экспериментального воздействия от артефакта пПКЛ, для чего нужен соответствующий «Sham» – контроль. Мы склонны усматривать причину «анксиогенного» феномена пПКЛ в привыкании, в основе которого должна лежать сохраненная пространственная память о ПКЛ1. Один из способов проверки этого предположения состоит в применении теста TL и амнезирующих экспериментальных воздействий между ПКЛ1 и ПКЛ2.

Цель работы – разработка и испытание модифицированного протокола тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте, повышающего возможность оценки индивидуальных поведенческих характеристик и уровня долговременной памяти крыс.

Методика

В задачи исследования входило создание протокола пПКЛ, при котором: (1) по результатам первичного тестирования для каждого животного определяется уровень тревожности для выявления из общего массива возможных фенотипических групп, требующих при дальнейших экспериментальных воздействиях раздельного анализа; (2) при повторном тесте в ПКЛ после экспериментального воздействия (эксперимент) или без него (контроль) регистрируются характеристики тех же особей с установлением соответствующих индивидуальных различий их поведенческих показателей (ПКЛ2 – ПКЛ1), а так же определяются индивидуальные уровни пространственной памяти, сохраненной к моменту ПКЛ2, (3) результаты тестирования контрольных и экспериментальных групп сравниваются с целью выяснения эффекта воздействия, отделенного от артефакта повторного ПКЛ-теста. Для уточнения природы «анксиогенного» феномена пПКЛ применяются экспериментальные воздействия, предположительно по-разному влияющие на долговременную память (в нашем случае – 2 вида гипобарической гипоксии различной тяжести).

Животные. Работа проведена на 130 крысах линии Вистар (самцах массой 180–210 г), полученных в ЦКП

«Биоколлекция» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Все процедуры, связанные с содержанием и использованием животных, проводили с соблюдением директив Европарламента и Совета европейского союза (2010/63/EU), регламентирующих использование животных в научных целях. Экспериментальные протоколы рассмотрены и утверждены Институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных (протокол № 12/9 от 03.09.2018). Перед началом исследований животные, рассажены по 6 особей в стандартные полипропиленовые лабораторные клетки, размером 545x395x200 мм, проводили 4 сут в лабораторных условиях без пересортировки, при постоянной температуре 22 °С, режиме освещения 12 ч через 12 ч (со сменой в 7:00 и 19:00) и неограниченном доступе к воде и корму. Поведенческое тестирование проводили с 10:00 до 12:00.

Оборудование. Инструмент ПКЛ (рукава 50x14 см, высота стенок 30 см, высота над полом 90 см) был модифицирован встроенной светодиодной подсветкой полов открытых участков [10]. Эта модификация позволила сделать освещение обоих открытых рукавов одинаковым, стабильным для всех серий тестирования и четко регулируемым при настройке освещения. Кроме того, светящийся пол, в отличие от внешних софитов с лампами накаливания, не имеет теплового компонента и не дает тени. Яркость и градиент свечения полов предварительно были настроены так, чтобы добиться соотношения заходов в закрытые и открытые рукава приблизительно равного 3:1, т.е. типичного для лабиринтов с софитным освещением.

Измерения. Классификация, подсчет и хронометрирование поведенческих актов по видеозаписи, проводились лаборантом «вслепую», т.е. без ознакомления его с протоколами процедур, применявшихся к наблюдаемым группам животных. Тестирование в ПКЛ применяли дважды и оба раза начинали с посадки животного на конце открытого рукава (носом от центра) и определения показателя TL. Для количественной оценки индивидуальной пространственной памяти нами применен «индекс долговременной памяти» (ИДП), определяемый по формуле: $ИДП = 1 - TL_t / TL_0$, где TL_t и TL_0 латентность ухода при повторном (через t сут) и первичном (0 сут) посещении ПКЛ, соответственно. Животному, проникшему в закрытый рукав (всеми четырьмя лапами) после TL теста, предоставляли 5 мин на обследование всего лабиринта. При этом регистрировали поведенческие показатели, характеризующие тревожность: суммарное число посещений открытых рукавов и задержек в центральном участке (пОЦ), а также время в секундах, потраченное на это (тОЦ); характеризующие исследовательскую активность: общее чис-

ло стоек и свешиваний (nCC); и характеризующие локомоторную активность: число перемещений в закрытых рукавах с изменением направления движения (nПЗ). Ряд других учитываемых характеристик (дефекация, уринация, груминг, замирания и др.) не были взяты в расчет, т.к. проявлялись не у всех животных и не показали зависимости от применяемых воздействий. Метод пПКЛ применялся в двух вариантах, с межтестовым интервалом 24 ч и 72 ч. Для выявления эффектов пПКЛ для каждого животного в каждом варианте определяли разность между повторными и первично-тестовыми значениями. Для оценки изначальной индивидуальной тревожности, определяемой в ПКЛ1, для каждой особи рассчитывался индекс тревожности (ИТ).

$ИТ = 1 - 0,5(tОЦ/300 + nОЦ/nОЗ)$, где:

nОЗ - общее число посещений открытых и закрытых рукавов,

tОЦ – время (с), потраченное на суммарное число посещений открытых рукавов и задержек в центральном участке,

nОЦ – суммарное число посещений открытых рукавов и задержек в центральном участке.

Этот, разработанный нами индекс, является модификацией индекса тревожности Коена [9], но отличается тем, что число и время посещения открытых рукавов мы дополняем числом и временем задержек на открытом освещенном перекрестке, которые обычно сопровождаются свешиванием.

Тестовые воздействия. Для экспериментального воздействия на поведение и пространственную память часть крыс из группы, предназначенной для тестирования с 1 сут интервалом, была подвергнута однократной барокамерной 3-часовой тяжелой гипобарической гипоксии – ТГГ (180 ммHg) сразу после ПКЛ1. Тест ПКЛ2 применяли через 1 сут. по завершении воздействия. Процедура ТГГ известна своим амнестическим эффектом на крыс, тестируемых в лабиринте Морриса [11]. К части крыс, у которых тестировалось поведение и память с интервалом 3 сут, применяли серию из 3-ежедневных 2-часовых экспозиций барокамерной умеренной гипобарической гипоксии – ЗУГГ (360 ммHg). В такой серии первая экспозиция применялась сразу после ПКЛ1, а последующие две экспозиции с интервалом 1 сут. В данном случае, тест ПКЛ2 применяли через 1 сут после 3-й экспозиции. Процедура ЗУГГ ранее описана, как оказывающая нейропротективное воздействие на мозг [12, 13] и, предположительно, не должна была ухудшать процессы формирования долговременной памяти. Соответствующие подгруппы крыс, прошедших пПКЛ без гипоксии, служили контролем. Технические детали указанных гипобарических процедур описаны нами ранее [12].

Обработка данных. При сопоставлении количественных значений поведенческих характеристик каждой особи, полученных в ПКЛ1 и ПКЛ2 с интервалом 1 сут или 3 сут были получены соответствующие две группы разностей подгрупп 1 и 2. Тот же метод применен для животных, которым между тестами предъявляли ТГГ (межтестовый интервал 1 сут) или ЗУГГ (межтестовый интервал 3 сут) с получением разностей для подгрупп 3 и 4, соответственно. Для выявления эффектов ТГГ или ЗУГГ сравнивались между собой соответствующие пары – 1 с 3 и 2 с 4.

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики при помощи пакета программ «Statistica 10» с использованием параметрического t критерия Стьюдента для пар независимых выборок. Все 4 группы разностей соответствовали требованиям нормальности распределения по критерию Шапиро-Уилка. Пороговый уровень статистической значимости был принят равным 5%. На диаграммах представлены средние значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM).

Результаты испытания методики пПКЛ

Фенотипирование животных в ПКЛ1. При вычислении ИТ для каждой особи в ПКЛ1 получено разделение всей совокупности ($n=130$) на 2 кластера с $ИТ \leq 0,95$ ($n=114$) и $ИТ \geq 0,96$ ($n=16$), названных, соответственно, группами с «изначально нормальным уровнем тревожности» (Н) и с «изначально высоким уровнем тревожности» (Т) (рис. 1, а). Группы Н и Т статистически значимо различались не только по среднему ИТ, но и по характеристикам исследовательской и локомоторной активности (рис. 1, б).

Для повторного теста в ПКЛ с двумя интервалами времени без и с экспериментальным воздействием необходимо было разделить каждую из фенотипических групп на 4 подгруппы. При таком делении анализ поведения группы Т приводил к статистически незначимым результатам сравнения из-за малочисленности выборок. Кроме того, изначально крайне низкие значения характеристик крыс этой группы не позволяли выявить тормозных реакций, как на повторный тест, так и на гипоксию. В связи с этим «минорная» группа Т была изъята из рассмотрения. Приведенные далее результаты испытаний касаются группы Н.

Воздействие пПКЛ и гипобарической гипоксии на поведенческие характеристики крыс группы Н. В ПКЛ2 в обеих контрольных подгруппах 1 и 2 выявлено снижение показателей локомоторной (nПЗ) и исследовательской (nCC) активности. Поскольку эти показатели косвенно связаны с показателями, формирующими вели-

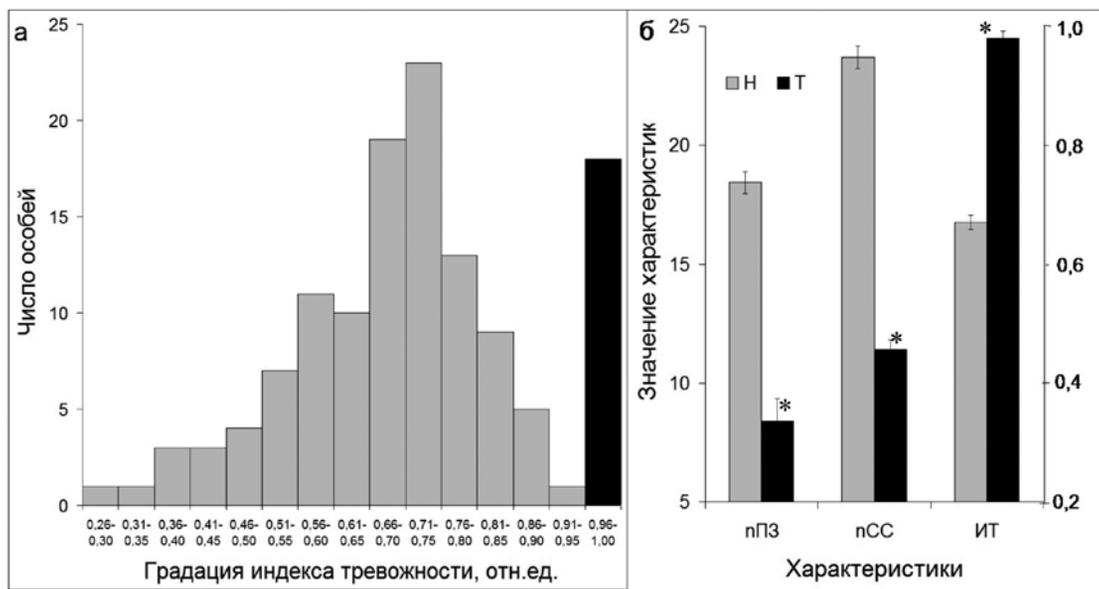


Рис. 1. Разделение животных с различными поведенческими фенотипами по результатам первичного теста ПКЛ.

а) Классификация животных по величине индекса тревожности. Серые столбики – группа Н (n=114), черные столбики – группа Т (n=16).

б) Усредненные характеристики поведения выделенных фенотипических групп. По оси абсцисс – поведенческие характеристики: пПЗ – число перемещений в закрытых рукавах и пСС – общее число стоек и свешиваний (значения на левой оси ординат). А так же ИТ – индекс тревожности (значения на правой оси ординат). (*) – статистически значимые различия характеристик Н и Т групп.

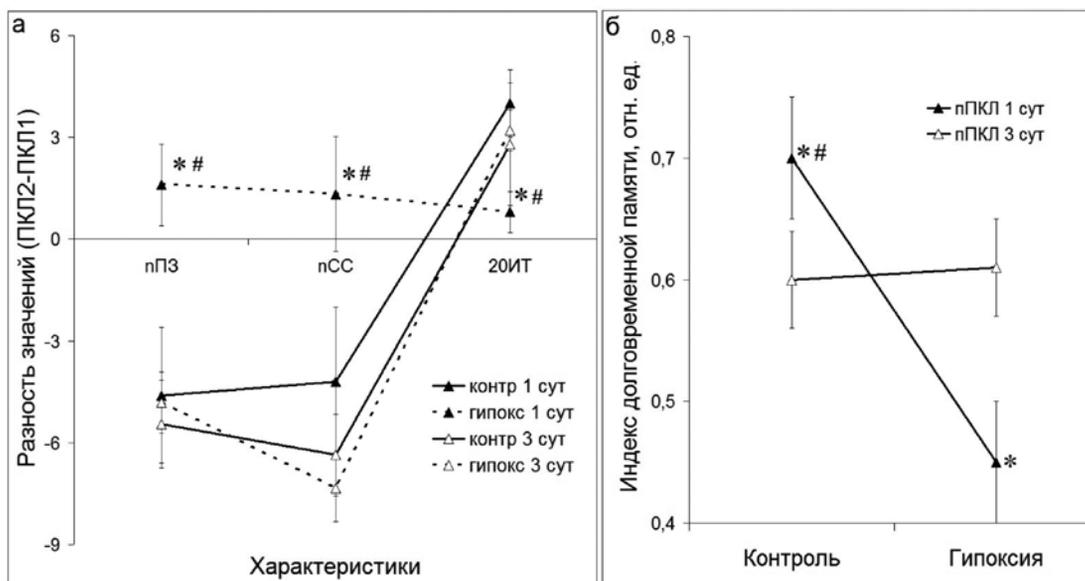


Рис. 2. Изменения поведенческих характеристик и долговременной памяти при двух интервалах пПКЛ тестирования крыс группы Н.

а) Разности поведенческих характеристик контрольных (n=14) и гипоксических (n=15) животных (сплошная и штриховая линии, соответственно), прошедших пПКЛ с интервалом 1 сут (черные треугольники), и разности характеристик контрольных (n=11) и гипоксических (n=21) животных (обозначения линий те же), прошедших пПКЛ с интервалом 3 сут (белые треугольники). (*) – статистически значимые различия групп «ТГГ (1 сут)» и «контроль (1 сут)». (#) – статистические значимые различия групп «гипоксия 1 сут» и «гипоксия 3 сут».

б) Значения Индекса долговременной пространственной памяти в контроле (n=13-14) и с применением гипоксии (n=16-17) для пПКЛ 1 су (черные треугольники) и пПКЛ 3 сут (белые треугольники). (*) – статистически значимые различия групп «пПКЛ 1 сут» и «пПКЛ 3 сут»; (#) – статистические значимые различия групп «гипоксия (ТГГ)» и «контроль».

чину ИТ, можно предположить, что рост последнего при контрольных пПКЛ (и даже в случае применения ЗУГГ между тестами) является следствием снижения локомоторной и исследовательской активности (рис. 2, а), показывая, таким образом, отчетливый тормозный след ПКЛ1, проявляющийся при втором тесте. Вместе с тем, если между тестами с интервалом 1 сут применялась ТГГ (подгруппа 3), то уровни характеристики, полученных при ПКЛ1 и ПКЛ2 существенно не различались (разности близки к «0») (рис. 2, а, пунктир с черными маркерами).

Воздействие пПКЛ и гипобарической гипоксии на долговременную пространственную память группы Н. В контроле средние величины индивидуальных ИДП, определявшиеся в подгруппе 2 (3 сут интервал) были несколько ниже, чем в подгруппе 1 (1 сут интервал), что представляется естественным. Применение ТГГ между тестами показало сильный амнестический эффект при межтестовом интервале 1 сут, а процедура ЗУГГ не влияла на память даже при 3 сут. интервале (рис. 2, б)

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что в парадигме пПКЛ тестирования животные как с 1 сут, так и 3 сут интервалом, демонстрируют снижение исследовательской и локомоторной активности, что, очевидно, отражается и на посещаемости открытых участков, симулируя феномен «анксиогенности». Поскольку ТГГ, как нами показано, подавляет долговременную память и блокирует феномен повторного теста, а ЗУГГ сохраняет память и не влияет на этот феномен, можно предположить, что основной причиной снижения показателей при повторном тесте ПКЛ является именно сохраненная пространственная память о первичном его посещении.

Заключение

Таким образом, испытанный протокол пПКЛ имеет ряд преимуществ в сравнении с традиционным однократным ПКЛ-тестированием. Он оценивает индивидуальные реакции каждого животного на воздействие в сравнении с его исходным состоянием, допускает «сортировку» животных по результатам исходного поведенческого фенотипирования, которая может скорректировать протоколы последующего воздействия, позволяет вычленить фоновый эффект повторяющегося тестирования из исследуемого экспериментального эффекта, дополнительно включает оценку долговременной пространственной памяти.

Работа проведена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук (направление 63).

Литература (п.п. 1-9; 11 см. References)

10. Семенов Д.Г., Беляков А.В. Патент РФ на ПМ № 159773. Устройство для тестирования уровня тревожности грызунов. *Оф. Бюл. «Изобретения. Полезные модели»*. 2016; № 5. <http://www.infran.ru/Documents/Innovation/RU159773.PDF>.
12. Беляков А.В., Дудкин К.Н., Рыбникова Е.А., Самойлов М.О., Семенов Д.Г. Способ улучшения когнитивных функций. Патент РФ на изобретение № 2593345. *Оф. Бюл. «Изобретения. Полезные модели»*. 2016; № 22. <http://www.infran.ru/Documents/Innovation/RU2593345.PDF>.
13. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2012; 98(1): 108–26. https://elibrary.ru/download/elibrary_17697773_92891518.pdf.

References

1. Landgraf R., Wigger A. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behav. Genet.* 2002; 32(5): 301–14. <https://doi.org/10.1023/A:1020258104318>.
2. López Hill X, Richeri A., Scorza C. Measure of anxiety-related behaviors and hippocampal BDNF levels associated to the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the modified elevated plus maze in rats. *Physiol. Behav.* 2015; 147: 359–63. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.05.013>.
3. López Hill X, Richeri A., Scorza M.C. Clozapine blockade of MK-801-induced learning/memory impairment in the mEPM: Role of 5-HT_{1A} receptors and hippocampal BDNF levels. *Physiol. Behav.* 2017; 179: 346–52. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.07.016>.
4. Nade V.S., Kawale L.A., Valte K.D., Shendye N.V. Cognitive enhancing effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on learning and memory. *Indian J. Pharmacol.* 2015; 47(3): 263–69. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4450550/>.
5. Walf A.A., Frye C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007; 2(2): 322–28. doi:10.1038/nprot.2007.44.
6. Pereira J.K., Vieira R.J., Konishi C.T., Ribeiro R.A., Frussa-Filho R. The phenomenon of «one-trial tolerance» to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sci.* 1999; 65(10): 101–7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499876>.
7. Gonzalez, L.E., File S.E. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* 1997; 17: 1505–11. <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/17/4/1505.full.pdf>.
8. Schneider P., Ho Y.-J., Spanagel R., Pawlak C.R. A novel elevated plus-maze procedure to avoid the one-trial tolerance problem. *Front. Behav. Neurosci.* 2011; 5: 1–8. <http://www.infran.ru/Documents/Innovation/RU159773>. *Ustrojstvo dlya testirovaniya urovnya trevozhnosti gryzunov.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3146044/pdf/fnbeh-05-00043.pdf>.
9. Cohen H., Liu T., Kozlovsky N., Kaplan Z., Zohar J., Mathe A. The neuropeptide Y (NPY)-ergic system is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacol.* 2012; 37: 350–63. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3242318/pdf/npp2011230a.pdf>.
10. Semenov D.G., Belyakov A.V. The device testing of anxiety level in rodents. Patent № 159773, RF; Patent RF на ПМ № 159773.

- Ustrojstvo dlya testirovaniya urovnya trevozhnosti gryzunov. *Off. Bull. «Izobreteniya. Poleznye modeli»*. 2016; № 5. (In Russian). <http://www.infran.ru/Documents/Innovation/RU159773.PDF>.
11. Vataeva L.A., Tyul'kova E.I., Samoilo M.O. Influence of Severe Hypoxia on Rat Emotional Behavior: The Modifying Effect of Preconditioning. *Doklady Biological Sciences*. 2004; 395: 109-11.
12. Belyakov A.V., Dudkin K.N., Rybnikova E.A., Samoilo M.O., Semenov D.G. *The way to improve cognitive functions. Patent № 2593345, RF; [Sposob uluchsheniya kognitivnyh funktsij. Patent RF na izobretenie № 2593345]. Of. Byul. «Izobreteniya. Poleznye modeli»*. 2016; № 22. *Off. Bull.* (In Russian). <http://www.infran.ru/Documents/Innovation/RU2593345.PDF>.
13. Samoilo M.O., Rybnikova E.A. Molecular-cellular and hormonal mechanisms of induced brain tolerance of extreme factors. *Russ. J. Physiol.* 2012; 98(1): 108-26. (In Russian). https://elibrary.ru/download/elibrary_17697773_92891518.pdf.

Сведения об авторах:

Семенов Дмитрий Германович, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., проф., лаб. регуляции функций нейронов мозга, e-mail: dsem50@rambler.ru;

Беляков Александр Витальевич, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. регуляции функций нейронов мозга ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, e-mail: belyakov07@gmail.com