

**Адрес редакции:**  
125315, Москва, ул. Балтийская, 8.  
ФГБНУ «НИИ общей патологии и  
патологии», к. 379

**E-mail:** path.physiol@yandex.ru

**Сайт:** www.pfiet.ru

Зав. редакцией Н.Р. Соболев  
+7 906 793 5467

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

Двулетний имакт-фактор  
по версии РИНЦ на 2018 г.: 0,517

Подписной индекс по каталогам:  
«Роспечать»: 71456  
«Урал-Пресс»: 71456

Формат издания: 205x265 мм  
Печать: цифровая  
Тираж 300 экз.  
Цена свободная

Сдано в набор 11.02.2020  
Подписано к печати 20.02.2020  
Опубликовано 25.02.2020

Отпечатано: ООО «ПКФ «СОЮЗ-ПРЕСС»  
Адрес типографии:  
150062, г. Ярославль,  
проезд Доброхотова, д. 16

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и экспер. тер.  
2020. Том 64. № 1. 1–162

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, 2020.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

Российская академия наук  
Общество патофизиологов  
«НИИ Общей патологии и патофизиологии»

# ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

Том 64 № 1 · 2020

Январь–Март

## Главный редактор:

Б.Б. Мороз, *акад. РАН, д.м.н., проф., ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, Москва*

## Заместители главного редактора:

И.С. Гушчин, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., Институт иммунологии, Москва*

В.К. Решетняк, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., НИИОПП, Москва*

## Ответственный секретарь:

Н.С. Гурко, *к.м.н., НИИОПП, Москва*

## Редакционная коллегия:

Ю.В. Архипенко, *д.б.н., проф., МГУ, Москва*

Е.И. Асташкин, *д.б.н., проф., Первый МГМУ, Москва*

С.В. Грачев, *акад. РАН, д.м.н., проф., Первый МГМУ, Москва*

Т.А. Гуськова, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ЯГПУ, Ярославль*

Г. Дауни, *д.б.н., проф., Университет Северного Техаса, Форт-Уэрт, Техас, США*

А.В. Ефремов, *д.м.н., проф., НГМУ, Новосибирск*

В.Б. Кошелев, *д.б.н., проф., МГУ, Москва* Н.А. Крупина, *д.б.н., НИИОПП, Москва*

А.А. Кубагиев, *акад. РАН, д.м.н., проф., НИИОПП, Москва*

П.Ф. Литвицкий, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., Первый МГМУ, Москва*

Р. Маллет, *д.м.н., проф., Университет Северного Техаса, Форт-Уэрт, Техас, США*

О. Мацуо, *д.б.н., проф., Университет Киндай, Хигасиосака, Япония*

В.В. Новицкий, *акад. РАН, д.м.н., проф., СибГМУ, Томск*

Г.В. Порядин, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., РНИМУ, Москва*

Р. Сьюелл, *д.б.н., проф., Университет Кардиффа, Кардифф, Великобритания*

## Редакционный совет:

Ю.В. Балякин, *д.м.н., проф., РНИМУ, Москва*

Ю.Ю. Бяловский, *д.м.н., проф., РязГМУ, Рязань*

В.Т. Долгих, *д.м.н., проф., ОГМУ, Омск*

А.М. Дыгай, *акад. РАН, д.м.н., проф., Томский НИМЦ РАН, Томск*

Д.А. Еникеев, *д.м.н., проф., БГМУ, Уфа*

В.П. Куликов, *д.м.н., проф., АМИПДО, Барнаул*

В.П. Михайлов, *д.м.н., проф., ЯГМУ, Ярославль*

В.Г. Овсянников, *д.м.н., проф., РостГМУ, Ростов-на-Дону*

С.Н. Орлов, *д.б.н., проф., МГУ, Москва*

Н.Н. Петрищев, *д.м.н., проф., ПСПбГМУ, Санкт-Петербург*

Л.А. Северьянова, *д.м.н., проф., КГМУ, Курск*

В. Шварц, *д.м.н., проф., Саарский Университет, Хомбург/Саар, Герман*

**Mailing address:**

Baltiyskaya str., 8, Moscow, 125315,  
Russian Federation,  
Institute of General Pathology  
and Pathophysiology, Room 379

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

Head of Editors N.R. Sobol  
+7 906 793 5467

**Publisher:** Dmitry Irishkin**E-mail:** genius-media@mail.ru

The Journal is Included in the List of Leading Peer-reviewed Scientific Journals and Publications, recommended by the Higher Attestation Commission of Russia for publication of significant results of the theses of applicants for a PhD and DSc degrees.

Two-year impact factor  
according to RSCI on 2018 was 0.517

Subscription Index in «Rospechat»: 71456  
Subscription Index in «Ural Press»: 71456

Publication format: 205 × 265 mm  
Printing: Digital Circulation: 300 copies  
The price is not fixed

Sent into set on 02/11/2020  
Signed for publication on 2/20/2020  
Published on 02/25/2020

Printed: LLC «PKF «SOYUZ-PRESS»  
Printing house address:  
16 Dobrokhотов passage  
150062, Yaroslavl, Russian Federation

**ISSN** 0031-2991

Pat Fiziol Eksp Ter  
2020. Volume 64. No 1. 1–162

Reprinting and use journal materials in any form, including electronic media, only possible with written permission of the publisher. The responsibility for the content of advertising publications is on the advertisers exclusively.

© IE Irishkin Dmitry Andreevich, 2020.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

Russian Academy of Sciences

Russian Society of Pathophysiologists

With the support of the Research 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. 64 № 1 · 2020  
January–March

**Editor in chief:**

B.B. Moroz, *Acad. RAS, DSc, Prof., Federal Med. Biophysical Center, Moscow, Russia*

**Assistant editors in chief:**

I.S. Gushchin, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Inst. of Immunology, Moscow, Russia*

V.K. Reshetnyak, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Inst. of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

**Executive editor:**

N.S. Gourko, *PhD, Inst. of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

**Editorial Board:**

Yu.V. Archipenko, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*

E.I. Astashkin, *DSc, Prof., First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*

H. Downey, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*

S.V. Grachev, *Acad. RAS, DSc, Prof., First Mos. State Med. University, Moscow, Russia*

T.A. Guskova, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Inst. of Immunology, Moscow, Russia*

A.V. Efremov, *DSc, Prof., Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*

V.B. Koshelev, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*

N.A. Krupina, *DSc, Inst. of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

A.A. Kubatiev, *Acad. RAS, DSc, Prof., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

P.F. Litvitskiy, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., Moscow State Med. Univ., Moscow, Russia*

R. Mallet, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*

O. Matsuo, *PhD, Prof., Kindai University, Higashiosaka, Japan*

V.V. Novitskiy, *Acad. RAS, DSc, Prof., Siberian Medical State University, Tomsk, Russia*

G.V. Poryadin, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., National Research Med. Univ., Mos., Russia*

R. Sewell, *PhD, Prof., Cardiff University, Cardiff, UK*

**Advisory Committee**

Yu.V. Balyakin, *DSc, Prof., National Research Medical University, Moscow, Russia*

Yu.Yu. Byalovskiy, *DSc, Prof., Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia*

V.T. Dolgikh, *DSc, Prof., Omsk State Medical University, Omsk, Russia*

A.M. Dygay, *Acad. RAS, DSc, Prof., Tomsk National Research Medical Center of RAS, Tomsk, Russia*

D.A. Enikeev, *DSc, Prof., Bashkir State Medical University, Ufa, Russia*

V.P. Kulikov, *DSc, Prof., Altai Medical Inst. of Postgraduate Education, Barnaul, Russia*

V.P. Mikhailov, *DSc, Prof., Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia*

V.G. Ovsyannikov, *DSc, Prof., Rostov State Med. University, Rostov-na-Donu, Russia*

S.N. Orlov, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*

N.N. Petrishchev, *DSc, Prof., First St.Petersburg State Med. Univ., St.Peterburg, Russia*

L.A. Severyanova, *DSc, Prof., Kursk State Medical University, Kursk, Russia*

V. Shvarz, *PhD, Prof., Saarland University, Homburg/Saar, Germany*

A.P. Yastrebov, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia*

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Азимова Ю.Э., Климов Е.А., Наумова Е.А., Кокаева З.Г., Зайцева А.И., Кондратьева Н.С., Анучина А.А., Рудько О.И., Скоробогатых К.В., Амелин А.В., Кукушкин М.Л.** Сочетанные генотипы генов, кодирующих белки холецистокинергической системы и ферменты фолатного цикла в значительной степени связаны с мигренью ..... 5
- Борзенко С.А., Захаров В.Д., Миридонова А.В., Куприянова А.Г., Колесник С.В., Островский Д.С., Горшков И.М., Колесник А.И., Арбуханова П.М.** Патфизиологические механизмы эпителиально-мезенхимальной трансформации идиопатического эпиретинального фиброза ..... 15
- Филиппова Е.О., Кривошеина О.И.** Особенности проявлений экспериментально индуцированной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы и эффективность клеточной терапии заболевания ..... 23
- Богданенко Е.В., Сергеевич Л.А., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А., Карнаухов В.Н.** Изучение регенеративного потенциала стволовых клеток цельного костного мозга для лечения механических травм кожи в модельных экспериментах на мышах ..... 31
- Логаткина А.В., Терехов И.В., Никифоров В.С., Бондарь С.С.** Взаимосвязи между продукцией тимозина 1α и состоянием внутриклеточных сигнальных механизмов в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови при артериальной гипертензии ..... 39
- Тарасова М.В., Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Волкова Е.Н., Морозов С.Г.** Активность фагоцитоза у больных atopическим дерматитом с подтвержденной контаминацией кожи дрожжами рода *Candida spp.* ..... 47
- Калиш С.В., Лямина С.В., Кузнецова Л.В., Буданова О.П., Малышева Е.В., Говоров А.В., Прилепская Е.А., Пушкарь Д.Ю., Малышев И.Ю.** М3 макрофаги останавливают деление клеток предстательной железы больного раком простаты ..... 54
- Адзерихо И.Э., Яцевич О.Н., Владимирская Т.Э., Михневич Д.Л.** Морфологические изменения в динамике легочной артериальной гипертензии, индуцированной монокроталином в эксперименте *in vivo.* ..... 60
- Донина Ж.А., Баранова Е.В., Александрова Н.П., Катунцев В.П., Баранов В.М.** Влияние периодической нормобарической гипоксии на функциональные резервы организма крыс в свободном двигательном режиме и при антиорто-статической гипокинезии ..... 67
- Ильин В.К., Царев В.Н., Скедина М.А., Соловьева З.О., Николаева Е.Н., Ковалёва А.А., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Усанова Н.А., Морозова Ю.А.** Состояние барьеров микробной колонизации зубочелюстной системы в условиях имитированной невесомости ..... 76
- Досова С.Ю., Стольников А.И., Червинец Ю.В., Червинец В.М.** Исследование вагинального микробиома женщин с привычным невынашиванием беременности, а также спектра выделяемых ими газовых сигнальных молекул ..... 84
- Мамедзаде А.Я., Алиев М.Х., Гусейнова Ш.М., Агамалиева У.Д., Ахмедзаде У.И., Шахвердиев Г.Г.** Эндотелиальная дисфункция и нарушение лимфатического дренажа тканей в патогенезе диабетических микроангиопатий ..... 91
- Куксгауз И.А., Кашкин В.А., Шекунова Е.В., Гуштин Я.А., Макаров В.Г., Макарова М.Н.** Изучение терапевтической эффективности препарата Алфлутоп на модели открытого перелома бедренной кости у крыс ..... 98

## ORIGINAL ARTICLES

- Azimova J.E., Klimov E.A., Naumova E.A., Kokaeva Z.G., Zaitseva A.I., Kondratieva N.S., Anuchina A.A., Rudko O.I., Skorobogatikh K.V., Amelin A.V., Kukushkin M.L.** Complex genotypes encoding the cholecystokininergetic system and the folate cyclesenchymal transition of idiopathic epiretinal fibrosis ..... 5
- Borzenok S.A., Zakharov V.D., Miridonova A.V., Kupriyanova A.G., Kolesnik S.V., Ostrovsky D.S., Gorshkov I.M., Kolesnik A.I., Arbukhanova P.M.** Pathophysiological mechanisms of epithelial-mesenchymal transition of idiopathic epiretinal fibrosis ..... 15
- Filippova E.O., Krivosheina O.I.** Features of the manifestations of experimentally induced endothelial-epithelial corneal dystrophy and the effectiveness of cell therapy of the disease ..... 23
- Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A., Karnaukhov V.N.** The regenerative potential of stem cells from the whole bone marrow for the treatment of skin mechanical trauma in a murine model ..... 31
- Logatkina A.V., Terekhov I.V., Nikiforov V.S., Bondar S.S.** Immunomodulating mechanisms of biological effect of thymosin 1α in arterial hypertension ..... 39
- Tarasova M.V., Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Volkova E.N., Morozov S.G.** Phagocytosis activity in patients with atopical dermatitis complicated by *Candida spp.* skin contamination ..... 47
- Kalish S.V., Lyamina S.V., Kuznetsova L.V., Budanova O.P., Malysheva E.V., Govorov A.V., Prilepskaya E.A., Pushkar D.Yu., Malyshev I.Yu.** M3 macrophages stop division of prostate cell from a patient with prostate cancer ..... 54
- Adzericho I.E., Jacevich O.N., Vladimirskaia T.E., Mihnevich D.L.** Morphological features in dynamics of monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension *in vivo* ..... 60
- Donina Zh.A., Baranova E.V., Aleksandrova N.P., Katuntsev V.P., Baranov V.M.** The influence of periodic normobaric hypoxia on the functional reserves of the rats at a free locomotion and antiorthostatic hypokinesia ..... 67
- Ilyin V.K., Tsarev V.N., Skedina M.A., Soloviova Z.O., Nikolaeva E.N., Kovaleva A.A., Rykova M.P., Antropova E.N., Usanova N.A., Morozova Yu.A.** The state of barriers for microbial colonization of the dentition in the conditions of simulated weightlessness ..... 76
- Dosova S.Yu., Stolnikova I.I., Chervinets Yu.V., Chervinets V.M.** The vaginal microbiome and the spectrum of gaseous signal molecules released by lactobacillus in women with habitual miscarriage ..... 84
- Mamedzade A.I., Aliyev M.Kh., Hyseynova Sh.M., Agamalieva U.D., Akhmedzade U.I., Zhakhverdiyev G.G.** Endothelial dysfunction and impairment of lymphatic drainage from tissues in the pathogenesis of diabetic microangiopathy ..... 91
- Kuksgauz I.A., Kashkin V.A., Shekunova E.V., Guschin Ya.V., Makarov V.G., Makarova M.N.** Alflutop therapeutic effects in the rat femoral fracture model ..... 98

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Стрелкова Л.Б., Курманов Р.К., Шейченко О.П.** Изучение противовоспалительной активности экстракта змееголовника молдавского ..... 108
- Хобракова В.Б., Халзанова А.В., Оленников Д.Н., Павлова С.И., Абидуева Л.Р.** Иммуномодулирующая активность экстракта сухого *Silene jenseensis* Willd при экспериментальном иммунодефиците ..... 113
- Арсюттов О.В., Арсюттов В.П., Черкесов Л.И., Вазанов А.А., Иванов Л.Н., Волков А.Н.** Пуриновый обмен у пациентов с острой хирургической патологией органов брюшной полости ..... 118
- Филинова С.О., Жариков А.Ю., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Баландович Б.А.** Показатели прооксидантного и антиоксидантного статусов в почках крыс при экспериментальном сахарном диабете ..... 124

### ОБЗОРЫ

- Воронков Н.С., Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н.** Роль киназ в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к гипоксии ..... 128
- Пальцын А.А.** Миокины ..... 135
- Цибульников С.Ю., Горбунов А.С., Прокудина Е.С., Семенцов А.С., Нестеров Е.А., Маслов Л.Н.** Мелатонин и его роль в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии ..... 142
- Ульяновская С.А., Баженов Д.В., Шестакова В.Г., Калинин М.Н.** Влияние климатогеографических факторов Севера на адаптивные реакции организма человека ..... 147

### МЕТОДИКА

- Яковлева А.А., Павлова Н.Г.** Экспериментальные модели сократительной активности миомеретрия ..... 155

### НЕКРОЛОГ

- Памяти Виталия Кузьмича Решетняка ..... 162

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Strelkova L.B., Kurmanov R.K., Sheichenko O.P.** Anti-inflammatory activity of the moldavian dragonhead extract ..... 108
- Khobrakova V.B., Khalzanova A.V., Olennikov D.N., Pavlova S.I., Abidueva L.R.** Immune-modulating activity of a dry extract from *Silene jenseensis* willd in experimental immunodeficiency ..... 113
- Arsyutov O.V., Arsyutov V.P., Cherkesov L.I., Vazanov A.A., Ivanov L.N., Volkov A.N.** Purine metabolism in patients with acute surgical pathology of abdominal organs ..... 118
- Filinova S.O., Zharikov A.Yu., Mazko O.N., Makarova O.G., Balandovich B.A.** Indicators prooxidant and antioxidant status in kidneys of rats with experimental diabetes ..... 124

### REVIEWS

- Voronkov N.S., Naryzhnaya N.V., Maslov L.N.** The role of kinases in the infarct-limiting effect of adaptation to hypoxia ..... 128
- Paltsyn A.A.** Myokines ..... 135
- Tsibulnikov S.Yu., Gorbunov A.S., Prokudina E.S. Sementsov A.S., Nesterov E.A., Maslov L.N.** Melatonin and its role in regulating heart resistance to ischemia and reperfusion ..... 142
- Ulyanovskaya S.A., Bazhenov D.V., Shestakova V.G., Kalinkin M.N.** Effect of the climatic and geographic factors of the North on adaptive reactions of the human body ..... 147

### METHODS

- Yakovleva A.A., Pavlova N.G.** Experimental models of myometrium contractile activity ..... 155

### OBITUARY

- In memory of Vitaliy Kuzmich Reshetnyak ..... 162

## Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.9

Азимова Ю.Э.<sup>1,2</sup>, Климов Е.А.<sup>3,4</sup>, Наумова Е.А.<sup>3</sup>, Кокаева З.Г.<sup>3</sup>, Зайцева А.И.<sup>3</sup>, Кондратьева Н.С.<sup>3</sup>,  
Анучина А.А.<sup>3</sup>, Рудько О.И.<sup>3</sup>, Скоробогатых К.В.<sup>1</sup>, Амелин А.В.<sup>5</sup>, Кукушкин М.Л.<sup>1</sup>

# Сочетанные генотипы генов, кодирующих белки холецистокининергической системы и ферменты фолатного цикла в значительной степени связаны с мигренью

<sup>1</sup>ООО «Университетская клиника головной боли»,

121467, г. Москва, Россия, ул. Молодогвардейская, д. 2, корп. 1;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

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

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,

119234, г. Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>4</sup>ООО «Университетская диагностическая лаборатория»,

117036, г. Москва, Россия, проспект 60-летия Октября, д. 18, к. 3;

<sup>5</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России,

197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6/8

Перспективным в изучении биомаркеров мигрени может быть многолокусный анализ, в частности, анализ частот сочетанных генотипов. **Цель исследования** – поиск составных генетических биомаркеров индивидуальной предрасположенности к мигрени, полученных на основе полиморфизмов генов, уже показавших статистическую значимость при однолокусном ассоциативном анализе. **Методика.** Обследовано 155 пациентов с мигренью (104 пациента с эпизодической мигренью, 51 – с хронической мигренью), наблюдавшихся в Университетской клинике головной боли (Москва). Все пациенты – представители белой расы, жители Московского региона. Возраст пациентов – 30-50 лет. Контроль составили 365 необследованных лиц (популяционный контроль). Выявление исследуемых 22 генов (всего 31 SNP) осуществляли методом ПЦР, ПЦР-ПДРФ, аллель-специфичной ПЦР и ПЦР в реальном времени. Выявление ассоциированных с мигренью сочетанных генотипов проводили с использованием программы анализа полигенных данных APSampler v3.6. **Результаты.** Выявлено 8 сочетанных генотипов с высокой статистически значимой ассоциацией с мигренью (ОШ>20,0). В состав сочетанных генотипов вошли гены: *CCAR*, *CKBR*, *COMT*, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*. Так же выявлено 4 защитных сочетанных генотипа (ОШ<0,02), основным в которых является ген *MAOA*. **Заключение.** Полученные данные об ассоциированных с мигренью сочетанных генотипах указывают на значимую роль в патогенезе заболевания 2 биохимических систем: 1) холецистокининергической системы, регулирующей выброс и обратный захват дофамина, и 2) фолатного цикла, в ходе работы которого гомоцистеин метаболизируется в метионин. Результаты, полученные в данном исследовании, позволяют говорить о защитной роли аллеля VNT:R4 гена *MAOA*.

**Ключевые слова:** мигрень; сочетанные генотипы; холецистокинин; фолатный цикл.

**Для цитирования:** Азимова Ю.Э., Климов Е.А., Наумова Е.А., Кокаева З.Г., Зайцева А.И., Кондратьева Н.С., Анучина А.А., Рудько О.И., Скоробогатых К.В., Амелин А.В., Кукушкин М.Л. Сочетанные генотипы генов, кодирующих белки холецистокининергической системы и ферменты фолатного цикла в значительной степени связаны с мигренью. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 5-14 .

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.5-14

**Для корреспонденции:** Азимова Юлия Эдвардовна, e-mail: azimova.j@mail.ru

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

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

**Поступила** 07.08.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Azimova J.E.<sup>1,2</sup>, Klimov E.A.<sup>3,4</sup>, Naumova E.A.<sup>3</sup>, Kokaeva Z.G.<sup>3</sup>, Zaitseva A.I.<sup>3</sup>, Kondratieva N.S.<sup>3</sup>, Anuchina A.A.<sup>3</sup>, Rudko O.I.<sup>3</sup>, Skorobogatikh K.V.<sup>1</sup>, Amelin A.V.<sup>5</sup>, Kukushkin M.L.<sup>1</sup>

## Composite genotypes encoding the cholecystokinergic system and the folate cycle are significantly associated with migraine

<sup>1</sup>University Clinic of Headache, LLC, Molodogvardeyskaya Str. 2, Bldg. 1, Moscow 121467, Russian Federation;

<sup>2</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya 8, Moscow 125315, Russian Federation;

<sup>3</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University, School of Biology, Leninskie Gory 1, Bldg. 12, Moscow 119234, Russian Federation;

<sup>4</sup>University Diagnostic Laboratory, LLC, Prospekt 60-letiya Oktyabrya 18, Bldg 3, Moscow 117036, Russian Federation;

<sup>5</sup>I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Ljva Tolstogo Str. 6/8, St. Petersburg 197022, Russian Federation

Multilocus analysis, specifically, analysis of combined genotype frequencies may be promising in studying migraine biomarkers. **The aim** of the study was to search for composite genetic biomarkers, which would predict individual predisposition to migraine, obtained on the basis of gene polymorphisms that have already shown a statistical significance in a single-locus associative analysis. **Methods.** 155 patients with migraine aging  $41.7 \pm 12.5$  who had been followed up at the University Clinic of Headache, Moscow, were evaluated (104 patients with episodic migraine and 51 with chronic migraine). All patients were white and residents of the Moscow region. The control group included 365 unexamined individuals (population control). Identification of The 22 genes under study (total, 31 SNPs) were identified by PCR, PCR-RFLP, allele-specific PCR, and real-time PCR. Combined genotypes associated with migraine were identified using the APSampler v3.6 software for polygenic data analysis. **Results.** Eight combined genotypes were identified with a highly significant association with migraine ( $OR > 20.0$ ). The combined genotypes included the CCKAR, CCKBR, COMT, MTHFR, MTR, and MTRR genes. Four protective combined genotypes were also identified ( $OS < 0.02$ ) with the MAOA gene as the major one. **Conclusion.** Our data on migraine-associated combined genotypes indicate a significant role in the migraine pathogenesis of two biochemical systems, i) the cholecystokinergic system that regulates the release and reuptake of dopamine, and ii) the folate cycle, where homocysteine is metabolized to methionine. The results obtained in this study suggest a protective role of the VNT: R4 allele of the MAOA gene.

**Keywords:** migraine; combined genotypes; cholecystokinin; folate cycle.

**For citation:** Azimova J.E., Klimov E.A., Naumova E.A., Kokaeva Z.G., Zaitseva A.I., Kondratieva N.S., Anuchina A.A., Rudko O.I., Skorobogatikh K.V., Amelin A.V., Kukushkin M.L. Composite genotypes encoding the cholecystokinergic system and the folate cycle are significantly associated with migraine. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 5-14 . (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.5-14

**For correspondence:** Azimova Julia, MD, PhD, Ch. scientific al. lab. fundamental and applied problems of pain, e-mail: azimova.j@mail.ru

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

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

### Information about authors:

Klimov E.A., <https://orcid.org/0000-0003-2674-5783>

Kokaeva Z.G., <https://orcid.org/0000-0002-5517-7423>

Rudko O.I., <https://orcid.org/0000-0001-9484-3014>

**Received** 07.08.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

Мигрень – комплексное нейрососудистое заболевание, имеющее генетическую предрасположенность. Выделяют несколько подтипов мигрени: мигрень с аурой (МА), мигрень без ауры, эпизодическую и хроническую мигрень [1]. Аура проявляется повторяющимися эпизодами очаговых неврологических симптомов продолжительностью от нескольких минут до часа. Выделяют несколько типов ауры: зрительную, сенсорную и дисфазическую. Так у 99% пациентов с МА встречается зрительная аура, которая проявляется в виде иллюзии мерцания и вспышек света, мерцательной скотомы – периодического пропадания изображения на

некоторых участках поля зрения, а также фортификационного спектра, при котором возникают зрительные иллюзии в форме зигзагов, распространяющиеся постепенно вправо или влево.

Генетические факторы вносят свой вклад в этиологию и патогенез мигрени. В последнее десятилетие отмечается повышенный интерес к генетическим исследованиям пациентов с мигренью [2]. Как следствие были определены гены, ответственные за развитие различных форм семейной гемиплегической мигрени [3]. Гемиплегическая мигрень – редкий подтип мигрени с аурой, при которой в структуре ауры кроме зритель-

ных и чувствительных нарушений возникает односторонняя мышечная слабость в конечностях.

По сравнению с общей популяцией, у родственников первого колена больных, риск развития мигрени без ауры выше 1,9 раз, а МА – в 1,4 раза [4]. Несмотря на умеренную наследуемость для обычной мигрени было проведено несколько десятков исследований [5], которые не привели к выявлению ассоциированных с ней генов, как и в случае с семейной гемиплегической мигренью. Исходя из понимания патогенеза мигрени, были изучены гены, которые могли повысить риск заболевания или влиять на течение. Таким образом была показана роль генов, регулирующих серотонинергическую и дофаминергическую нейротрансмиссию, гормональный статус, функционирование нейрональных каналов и эндотелия, но вклад каждого гена в развитие заболевания не был значительным.

С 2010 г. стали проводиться полногеномные ассоциированные исследования (GWAS) мигрени на больших выборках пациентов [6, 7]. В обзорной статье по данным различных GWAS по мигрени за последние годы выявлено порядка 38 генов, для которых с помощью функционального анализа g:Profiler128 (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>) определены значимые биохимические пути. Наибольшее количество выявленных генов связано с функциями сосудистого русла (17), равновесного состояния ионов металлов (7) и путей активности ионных каналов (4) [8]. Полученные данные подтвердили концепцию патогенеза мигрени как нейрососудистого заболевания, однако диагностическая значимость полученных SNP как биомаркеров заболевания была невелика.

Перспективным в изучении биомаркеров мигрени может быть многолокусный анализ, в частности, анализ частот сочетанных генотипов, полученный на основе полиморфизмов, уже показавших статистическую значимость при однолокусном ассоциативном анализе [2, 9-13].

Цель исследования – поиск составных (сочетанных, комплексных) генетических биомаркеров, предсказывающих индивидуальную предрасположенность к такому многофакторному полигенному заболеванию как мигрень.

### Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2004) и письменного информированного согласия пациентов. Работа одобрена этическим комитетом ФГБНУ НИИОПП.

В Университетской клинике головной боли были обследованы 155 пациентов с мигренью. Все пациенты, представители белой расы (возраст 30-50 лет), про-

живали в Московском регионе. Среди пациентов было 19 мужчин и 136 женщин. 104 пациента были с эпизодической мигренью, 51 – с хронической мигренью. Контрольную группу составили 365 необследованных лиц (популяционный контроль).

Выделение ДНК проводили согласно инструкциям производителя (ООО «Лаборатория Изоген», набор Magna™ DNAPrep 200). Праймеры, в случаях ПЦР, ПЦР-ПДРФ и АС-ПЦР, подобраны авторами вручную без использования специализированных программ или взяты из публикаций (ссылки см. **табл. 1**), в случае ПЦР-РВ – наборы зондов подобраны ООО «ДНК-Синтез» (Москва). Все праймеры и флуоресцентно-меченные зонды были синтезированы в ООО «ДНК-Синтез» (Москва).

ПЦР, ПЦР-ПДРФ и АС-ПЦР проводили с использованием коммерческого набора реагентов HSTaq ДНК полимеразы (ЗАО «Евроген», Москва) согласно инструкции. Реакцию ПЦР проводили в амплификаторе T100 (Bio-Rad, США) или амплификаторе для ПЦР-РВ CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей схеме: 1) предварительная денатурация (3 мин, 92 °С); 35-40 циклов: денатурация (30 с, 94 °С), отжиг праймеров (30 с, температура отжига указана в **табл. 1**), элонгация (30 с, 72 °С). При использовании метода ПЦР-ПДРФ рестриктицию продуктов ПЦР проводили с использованием эндонуклеаз производства НПО «СибЭнзим» (Новосибирск), ферменты указаны в **таблице 1**. Продукты ПЦР, АС-ПЦР и ПЦР-ПДРФ разделяли в 2.5 % агарозном геле.

Выявление связанных с мигренью сочетанных генотипов проводили с использованием программы анализа полигенных данных APSampler v3.6 [18]. Значимым результатом, позволяющим считать сочетанный генотип биомаркером заболевания, рассматривался статистический показатель отношения шансов (ОШ) свыше 20, а защитным – при показателе относительного риска ниже 0,02.

### Результаты

Сочетанные генотипы, связанные с мигренью, представлены в **таблице 2**. Несмотря на то, что связь с генетическими факторами при мигрени не подвергается сомнению, тем не менее, ранее были обнаружены только гены ответственные за развитие семейной гемиплегической мигрени, моногенного заболевания, характеризующегося тяжелой аурой [19]. Гены-кандидаты, изучаемые в ассоциативных исследованиях, незначительно влияли на развитие мигрени или её подтипов [20]. Метод изучения сочетанных генотипов показал, что наличие нескольких генов-кандидатов

Таблица 1

**Характеристика, последовательности пар праймеров и зондов исследованных в работе замен, параметры ПЦР**

Ген	Замена	Последовательность праймеров	T <sub>отж.</sub> , °C	Размер продукта (п.н.)	Рестрик-таза	Ссылка
ПЦР-ПДРФ						
BDNF	rs2049046	F: 5'-CAGGTGGGGCTTTGTCTTTCAAG-3'	56	249	Hinf I	авторы*
		R: 5'-GCATGTTCTCCCTTTAGGGACAT-3'				
BDNF	rs6265	F: 5'-GAGGACAAGGTGGCTTGGCCTA-3'	61	157	PspC I	авторы
		R: 5'-GGCCGAACCTTCTGGTCTC-3'				авторы
BDNF	rs11030107	F: 5'-CAGGTGGGGCTTTGTCTTTCAAG-3'	60	118	TaqI	
		R: 5'-GCATGTTCTCCCTTTAGGGACAT-3'				
CCK	rs11571842	F: 5'-CCAACGCTGACGCAGACTG-3'	64	168	Bsc4I	авторы
		R: 5'-GAAGCTTCTCGGATCCAGA-3'				
CCKAR	rs1799723	F: 5'-GCATATGTACACATGTGTGTAATAA AAGCAGCCAGAC-3'	64	103	Hinfl	авторы
		R: 5'-GCCCTTTCCTGGGCCAGACT-3'				
CCKAR	rs1800908	F: 5'-GCATATGTACACATGTGTGTAATAAA GCAGCCAGAC-3'	64	103	Hinfl	авторы
		R: 5'-GCCCTTTCCTGGGCCAGACT-3'				
CCKAR	rs1800857	F: 5'-ATCGTGGGTCCAGTGATGT-3'	63	472	PstI	авторы
		R: 5'-GGCTCCTTTGCTGTGATTGT-3'				
CCKBR	rs1805000	F: 5'-CATGGAGCTGCTAAAGCTGAAC-3'	60	203	BstDEI	авторы
		R: 5'-CTGGGGTACAGTGAGAAATAGC-3'				
CCKBR	rs1805002	F: 5'-CTGGCAGTCAGCGACCTCCT-3'	62	237	Bst4CI	авторы
		R: 5'-CACAAGCATCAGTGGGACTTC-3'				
CGRP	rs1553005	F: 5'-TGGGAAACAAGAGACGGAGCTG-3'	61	231	Mnl I	авторы
		R: 5'-CCTGTGCGGACCAGGAAACTCT-3'				
DBH	rs2097629	F: 5'-GGCTTGGTGTGGTTAGGATGA-3'	61	229	BstMA I	авторы
		F: 5'-CCAGGGTCTTGTGCCTCAC-3'				
DBH	rs1611115	F: 5'-CTAGTCCAGCTGGAGAGATCT-3'	61	166	FauI	авторы
		R: 5'-TTTGCCATCATCCACCCGTG-3'				
MTHFR	rs1801133	F: 5'-TTTGAGGCTGACCTGAAGCACTTGA-3'	61	163	Hinfl	авторы
		R: 5'-CCTGGATGGGAAAGATCCCG-3'				
MTR	rs1805087	F: 5'-TGTTCCAGCTGTTAGATGAAAATC-3'	61	211	Hae III	[14]
		R: 5'-GATCCAAGCCTTTTACACTCCTC-3'				
ANKK1	rs1800497	F: 5'-CTCTAGGAAGGACATGATGC-3'	61	198	TaqI	авторы
		R: 5'-GAACATCACGCAAATGTCCAC-3'				
DRD2	rs6275	F: 5'-ATGGAGATGCTCTCCAGCAC-3'	60	343	BssT1I	авторы
		R: 5'-ACCTTTCACAGACCGGGCTG-3'				
MTHFR	rs1801131	F: 5'-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTA -3'	58	163	MboII	[15]
		R: 5'-CACTTTGTGACCATTCGGTIT-3'				
MTRR	rs1801394	F: 5'-GCAAAGCCATCGCAGAAGACAT-3'	56	148	FauNDI	авторы
		R: 5'-CACTTCCCAACCAAATCTTCAAAG -3'				

Продолжение табл. 1 см. на стр. 9



Ген	Замена	Последовательность праймеров	T <sub>отж.</sub> , °C	Размер продукта (п.н.)	Рестрик-таза	Ссылка
<i>MTHFD1</i>	rs2236225	F: 5'-CCAATCCTGCTTCCGTCAC-3'	57	274	AclWI	авторы
		R: 5'-TGAAGCAGGATTGGCAGCTC-3'				
<i>SHMT1</i>	rs1979277	F: 5'-AGCAGCTCATCCATCTCTCAG-3'	58	270	Bst6 I	авторы
		R: 5'-TCTTGTGGCACAGGGATAGAG-3'				
<i>MIR-22</i>	rs6502892	F: 5'-GCCCAGCCTCCTCAGCAT-3'	61	105	FauI	авторы
		R: 5'- CTCACATTTCTGGACCTGAGGTAC-3'				
ПЦР						
<i>TYMS</i>	VNTR (повторы 2 или 3)	F: 5'-GTGGCTCCTGCGTTTCCCCC-3'	64	240 или 268		[16]
		R: 5'-TCCGAGCCGCCACAGGCA-3'				
<i>DBH</i>	rs141116007	F: 5'-GGCTTGGTGTGGTTAGGATGA-3'	59	120/101	-	авторы
		R: 5'-CCAGGGTCTTGTGCCTCACA-3'				
<i>MAOA</i>	VNTR (повтор в 30 п.н. 2,3,3.5,4,5 раз)	F: 5'-ACAGCCTCGCCGTGGAGAAG-3'	55	290, 320, 335, 350, 380	-	[17]
		R: 5'-GAACGGACGCTCCATTCGGA-3'				
<i>ACE</i>	rs4646994	F: 5'-CTCCATTTCTCTAGACCTG-3'	55	112/381	-	авторы
		R: 5'-GCTCACCTCTGCTTGTAAG-3'				
АС-ПЦР						
<i>DBH</i>	rs6271	CF: 5'-CTGGAACCTTCAACCG-3'	59	79	-	авторы
		TF: 5'-CTGGAACCTTCAACTG-3'				
		R: 5'-TGAGGACTTGTTCAGTG-3'				
ПЦР-РВ						
<i>NOS1</i>	rs41279104	F: 5'-AGGCCGAGCGACTGG-3'	50	101	-	ДНК-Синтез
		R: 5'-CCCCTGCCAAGGCTT-3'				
		G: 5'-VIC-CAGAGCCGCCTCCCA-BHQ1-3'				
		A: 5'-FAM-CAGAGCCACCTCCCA-BHQ1-3'				
<i>TPH1</i>	rs1800532	F: 5'-TGGTACCTGGCATGAAATACATGTTTC-3'	62	88	-	ДНК-Синтез
		R: 5'-GGAATACAAGCTTTATGCAGGCAG-3'				
		C :5'-FAM-CTATTAGGTGCTAGCTGCTAT-BHQ2-3'				
		A:5'-VIC-TAGGTGATAGCTGCTATTCTGAA-BHQ2-3'				
<i>COMT</i>	rs4680	F: 5'-ATCAACCCCGACTGTGCCG-3'	62	96	-	ДНК-Синтез
		R: 5'-CCAGGTCTGACAACGGGTCA-3'				
		5'-FAM-ATTTGCTGGCGATGAAGGAC-BHQ1-3'				
		5'-VIC-TCGCTGGCGTGAAGGAC-BHQ1-3'				
<i>NOS3</i>	rs2070744	F: 5'-ACCAGGGCATCAAGCTCTTC-3'	55	67	-	ДНК-Синтез
		R: 5'-GCAGGTCAGCAGAGAGACTAG-3'				
		G: 5'-VIC-AGGGTCAGCCGCCAG-BHQ1-3'				
		A: 5'-FAM-AGGGTCAGCCAGCCAG-BHQ1-3'				
<i>NOS2</i>	rs2779249	F: 5'-GCCTCTCAAAGTGCTAGGATTACAA-3'	56	88	-	ДНК-Синтез
		R: 5'-GGGAATACTGTATTTTCAGGCATTATA AGGA-3'				
		A: 5'- VIC-TAGCCACAATGCCCG-BHQ1-3'				
		C: 5'- FAM-TAGCCACCATGCCCG-BHQ1-3'				

Продолжение табл. 1 см. на стр. 10

Ген	Замена	Последовательность праймеров	T <sub>отж.</sub> , °C	Размер продукта (п.н.)	Рестрик-таза	Ссылка
MTDH	rs1835740	F: 5'-CTGACGAATATACTTATATTCCTTTTACAT-3'	57	132	-	ДНК-Синтез
		R: 5'-CTTGCATATTTGAGCAGACTTTG-3'				
		C: 5'-FAM-CCAATCTGCGTATGTAGA-BHQ2-3'				
		T: 5'-VIC-CAATCTGTGTATGTAG-BHQ2-3'				

**Примечание.** ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР-ПДРФ – полимеразная цепная реакция с последующей оценкой полиморфизма длин рестриционных фрагментов продуктов амплификации; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; АС-ПЦР – аллель специфичная полимеразная цепная реакция.

\* – праймеры и условия ПЦР подобраны авторами самостоятельно (без использования программ), ферменты рестрикции подобраны с использованием сервиса <http://www.restrictionmapper.org/>.

Таблица 2

**Патогенетически значимые сочетанные генотипы исследованных генов**

Сочетанный генотип	Кодируемые белки	ОШ, ДИ 95%
CCKBR_rs1805002:G; COMT_rs4680:G.	Рецептор холецистокинина В Катехол-О-метилтрансфераза	ОШ=62.32836 ДИ(95%)=[8.51341..456.31824]
CCKAR_rs1800857:T; CCKBR_rs1805000:T; MAOA_VNT:350	Рецептор холецистокинина А Рецептор холецистокинина В Моноаминоксидаза А	ОШ=22.35149 ДИ(95%)=[9.24247..54.05364]
BDNF_rs6265:G; CCKBR_rs1805000:T; MAOA_VNT:350	Нейротрофический фактор мозга Рецептор холецистокинина В Моноаминоксидаза А	ОШ=22.35149 ДИ(95%)=[9.24247..54.05364]
MTHFR_rs1801133:T; BDNF_rs11030107:T; DBH_rs6271:C; MTRR_rs1801394:A.	Метилен-тетрагидрофолатредуктаза Нейротрофический фактор мозга Дофамин-бета-гидроксилаза Метионин-синтетаза	ОШ=22.00000 ДИ(95%)=[5.11189..94.68130]
COMT_rs4680:G,G; MTHFD1_rs2236225:T	Катехол-О-метилтрансфераза Метилентетрагидрофолатдегидрогеназа	ОШ=20.83311 ДИ(95%)=[11.25258..38.57054]
MTHFR_rs1801133:T; BDNF_rs11030107:T; MTR_rs1805087:A; MTRR_rs1801394:A	Метилен-тетрагидрофолатредуктаза Мозговой нейротрофический фактор Метилтрансфераза Метионин-синтетаза	ОШ=20.64615 ДИ(95%)=[4.79711..88.85851]
COMT_rs4680:G; CCKAR_rs1800857:T; CCKBR_rs1805000:T;	Катехол-О-метилтрансфераза Рецептор холецистокинина А Рецептор холецистокинина В	ОШ=20.20507 ДИ(95%)=[10.64611..38.34685]
CCKAR_rs1800857:T; CCKBR_rs1805000:T; TPH1_rs1800532:C	Рецептор холецистокинина А Рецептор холецистокинина В Триптофан гидроксилаза I	ОШ=18.91793 ДИ(95%)=[9.58845..37.32492]

**Примечание.** Отношение шансов (ОШ) – статистический показатель, позволяющий сравнивать частоту воздействия факторов риска на развитие мигрени,  $p < 0,001$  (значение после 1000 пермутаций) для всех выявленных сочетанных генотипов, ДИ – доверительный интервал. Наличие одного аллеля замены в составе сочетанного генотипа говорит о её доминантном типе наследования (гомозиготный и гетерозиготный генотипы замены имеют одинаковый эффект).

совместно в значительной степени повышают риск развития мигрени. Это гены, кодирующие 1) ферменты регулирующие метаболизм моноаминов, 2) рецепторы холецистокинина и 3) ферменты, участвующие в фолатном цикле (табл. 2).

Важно отметить, что нами выявлены и защитные сочетанные генотипы. Статистически значимый эпистаз был обнаружен у 4 пар маркеров совместно с полиморфным вариантом гена MAOA\_VNT:R4. Сочетания аллелей представлены в табл. 3.

Таким образом, в данном исследовании впервые выявлена значимая взаимосвязь между комплексными генотипами генов-кандидатов и мигрени.

### Обсуждение

Исследованные в нашей работе гены были отображены исходя из их возможной связи с мигренью и/или нейрофизиологическими и биохимическими процессами, ассоциированными с мигренью. Критерием отбора полиморфных локусов в данных генах являлась частота минорного аллеля не менее 5%.

Между тем, половина исследованных SNP не вошли в состав комплексных генотипов. Это замены в генах: *ACE* (rs4646994), *BDNF* (rs2049046), *CCK* (rs11571842), *CCKAR* (rs1799723, rs1800908), *CGRP* (rs1553005), *DBH* (rs2097629, rs1611115, rs141116007), *DRD2* (rs6275), *MIR-22* (rs6502892), *MTDH* (rs1835740), *MTHFR* (rs1801131), *NOS2* (rs2779249), *SHMT1* (rs1979277), *TYMS* (VNTR).

Характеристика вошедших в состав комплексных генотипов генов и SNP представлена в **табл. 4**.

Таким образом, практически все вошедшие в состав комплексных генотипов гены и замены имеют функциональное значение. Это поможет в дальнейшем оценить их роль в изменении молекулярных сигнальных путей.

Полученные данные об ассоциированных с мигренью сочетанных генотипах указывают на значимую роль в патогенезе заболевания двух биохимических систем:

– холецистокининергической системы, регулирующей выброс и обратный захват дофамина, к этой системе можно отнести гены, кодирующие холецистокинин (*CCK*) и его рецепторы (*CCKAR* и *CCKBR*);

– фолатного цикла, в ходе работы которого гомоцистеин превращается в метионин. Были проанализированы все гены, кодирующие ферменты фолатного цикла. Четыре из изученных генов входят в статистически значимые ассоциированные маркёры заболевания: *MTHFD1*, *MTHFR*, *MTRR* и *MTR*.

В исследовании показано, что в составе ассоциированных с мигренью сочетанных генотипов выявляются полиморфные варианты генов рецепторов холецистокинина. Эти результаты получены впервые, данные об участии генов холецистокининергической системы в развитии мигрени в литературе не представлены. Между тем, мы можем предположить, что нарушение работы холецистокининергической системы приводит к дисбалансу выброса/обратного захвата дофамина. Увеличение содержания дофамина может быть причиной инициации приступа [35].

Получены также значимые ассоциации с генами фолатного цикла. Это свидетельствует о значимой роли метаболизма фолатов в патогенезе мигрени. Известно, что один из продуктов фолатного цикла – гомоцистеин – способен накапливаться при нарушении работы ферментного цикла, что в дальнейшем может приводить к образованию нитроксила и развитию финальной стадии приступа мигрени (головная боль и расширение сосудов) [36, 37].

Помимо ассоциированных с мигренью сочетанных генотипов, статистически значимый эпистаз был обнаружен у четырёх аллелей генов *NOS3*, *ANKK1*, *NOS1*, *DBH* совместно с полиморфным вариантом гена *MAOA*. Промоторный регион гена *MAOA*, расположенный на коротком плече X-хромосомы, содержит участок с переменным числом tandemных повторов (VNTR) длиной 30 п.н. с 2, 3, 3,5, 4 или 5 повторными

Таблица 3

#### Значимые защитные сочетанные генотипы и отношение шансов развития мигрени

Комплексный генотип	Кодируемые белки	ОШ, доверительный интервал ДИ 95%
DBH_rs6271:C; MAOA_VNT:R4	Дофамин-бета-гидроксилаза Моноаминоксидаза А	ОШ=0.01550 ДИ(95%)=[0.00214..0.11246]
nNOS1_rs41279104:C; MAOA_VNT:R4	Нейрональная NO-синтаза1 Моноаминоксидаза А	ОШ=0.01565 ДИ(95%)=[0.00216..0.11353]
MAOA_VNT:R4; ANKK1_rs1800497;	Моноаминоксидаза А ПротеинкиназаPKK2	ОШ=0.01599 ДИ(95%)=[0.00220..0.11606]
eNOS3_rs2070744:C; MAOA_VNT:R4	Эндотелиальная NO-синтаза Моноаминоксидаза А	ОШ=0.01609 ДИ(95%)=[0.00222..0.11675]

**Примечание.** ОШ – отношение шансов, значение  $p < 0,001$  (после 1000 пермутаций) для всех выявленных сочетанных генотипов. Наличие одного аллеля замены в составе сочетанного генотипа говорит о её доминантном типе наследования (гомозигонный и гетерозигонные генотипы замены имеют одинаковый эффект).

## Характеристика исследуемых в работе полиморфных вариантов исследованных генов

Ген	Связь с мигренью	SNP	Функция SNP
<i>ANKK1</i>	Протеинкиназа РКК2. Участвует в регуляции плотности рецепторов дофамина на мембране	rs1800497	Для носителей А аллеля показана сниженная плотность D2 рецепторов дофамина
<i>BDNF</i>	Нейротрофический фактор мозга. Обеспечивает рост и гомеостаз нейронов. Ассоциирован с мигренью (на уровне SNP и на уровне белка)	rs6265	Аллель Met ассоциирован с аномальной внутриклеточной упаковкой предшественника BDNF и снижением продукции зрелого BDNF в клетках [21, 22], носители одного или двух аллелей Met имеют пониженный уровень BDNF в плазме, по сравнению с носителями Val/Val генотипа (гомозиготы GG)
		rs11030107	Нет данных
<i>CCAR</i>	Рецептор холецистокинина А. Холецистокининергическая система – ведущий регулятор соотношения вне- и внутриклеточной концентрации дофамина	rs1800857	Аллель С может влиять на эффективность сплайсинга первичного транскрипта <i>CCAR</i> , что может привести к изменению уровня белка <i>CCAR</i> [23]
<i>CCKBR</i>	Рецептор холецистокинина В. Холецистокининергическая система - ведущий регулятор соотношения вне- и внутриклеточной концентрации дофамина	rs1805000	Изменяет аминокислотную последовательность рецептора [24]. Влияние на функционирование рецептора не известно
		rs1805002	Замена валина на изолейцин происходит во второй внеклеточной петле <i>CCKBR</i> , в результате это может повлиять на аффиность рецептора к его лигандам [26]
<i>COMT</i>	Катехол-О-метилтрансфераза. Один из основных ферментов деградации катехоламинов (включая дофамин)	rs4680	У гомозигот по аллелю А ферментативная активность снижена примерно на 40% [27]
<i>DBH</i>	Дофамин-бета-гидроксилаза. Один из основных ферментов дофаминергической системы. Дисбаланс дофамина к норэпинефрину приводит к дофаминергической гиперчувствительности, что выражается в более высокой восприимчивости к мигрени (Обрегón и соавт., 2017)	rs6271	Неконсервативные различия в первичной аминокислотной последовательности. Результаты исследований показывают, что аллельные варианты отвечают за изменения фермента [27]. <i>DBH</i> холофермент является гомотетрамером и замена р.Arg535Cys может привести к образованию дисульфидного мостика и таким образом, изменить активность <i>DBH</i> [28]
<i>MAOA</i>	Моноаминоксидаза А. Катализируют окислительное дезаминирование катехоламинов (дофамин). Полиморфные варианты гена ассоциированы с мигренью	VNTR (повтор в 30 п.н. 2,3,3.5,4,5 раз)	Энзиматическая активность <i>MAOA</i> выше у носителей 3.5 и 4 повторов. Ассоциация 4R формы фермента с лучшим метаболизмом триптанов, по сравнению с другими формами [29]
<i>MTHFD1</i>	Фермент фолатного цикла	rs2236225	Замена в аминокислотной последовательности домена 10-формил-ТНФ-синтетазы [30]
<i>MTHFR</i>	Фермент фолатного цикла	rs1801133	Замена аланина на валин приводит к 30% уменьшению активности <i>MTHFR</i> у гетерозигот и 60% снижению <i>MTHFR</i> активности у гомозигот [31]
<i>MTR</i>	Фермент фолатного цикла	rs1805087	Замена аспарагиновой кислоты на глицин уменьшает активность фермента, что приводит к повышению гомоцистеина [32]
<i>MTRR</i>	Фермент фолатного цикла	rs1801394	Аллель G ассоциирован со снижением активности фермента <i>MTRR</i> в 4 раза
<i>NOS1</i>	Синтаза оксида азота, нейрональная. Оксид азота - сильный вазодилатор. Тонус сосудов ассоциируют с мигренью	rs41279104	Аллель Т ассоциирован с 30% снижением экспрессии при анализе репортерного гена [33]
<i>NOS3</i>	Синтаза оксида азота, эндотелиальная (экспрессируется в эндотелии сосудов). Оксид азота - сильный вазодилатор. Тонус сосудов ассоциируют с мигренью	rs2070744	Аллель С снижает промоторную активность гена <i>NOS3</i> [34]
<i>TPH1</i>	Триптофан гидроксилаза 1. Регулирует первую реакцию в цепи синтеза серотонина, экспрессируется в тройничном ганглии, связанном с патогенезом мигрени (28194570)	rs1800532	Замена локализована в 7 интроне гена <i>TPH1</i> . Аллель А ассоциирован с лучшей эффективностью сплайсинга

копиями. Количество повторов оказывает влияние на экспрессию гена [38]. Четырехкратный VNT(R4), приводит к наиболее эффективной из всех вариантов экспрессии данного гена и увеличению количества фермента [39]. Фермент MAOA обеспечивает один из путей деградации дофамина. Увеличение количества фермента MAOA приводит к снижению дофамина, что обеспечивает защиту от приступа мигрени.

Таким образом, выявленные нами сочетанные генотипы свидетельствуют в пользу дофаминовой теории инициации приступа мигрени и значимой роли гомоцистеина в развитии мигренозной атаки.

#### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Азимова Ю.Э., Климов Е.А., Кукушкин М.А., Амелин А.В.

Сбор и обработка материала – Азимова Ю.Э., Ско-робогатых К.В., Кокаева З.Г., Зайцева А.И., Кондра-тьева Н.С., Анучина А.А.

Статистическая обработка – Наумова Е.А., Рудь-ко О.И.

Написание текста – Азимова Ю.Э., Климов Е.А.

Редактирование – Климов Е.А., Кукушкин М.А., Амелин А.В.

#### Литература/References

- Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia*. 2018; 38(1): 1–211. <https://www.ichd-3.org/wp-content/uploads/2018/01/The-International-Classification-of-Headache-Disorders-3rd-Edition-2018.pdf>
- Kondratieva N, Azimova J, Skorobogatykh K, Sergeev A, Naumova E, Kokaeva Z, Anuchina A, Rudko O, Tabeeva G, Klimov E. Biomarkers of migraine: Part 1 - Genetic markers. *J Neurol Sci*. 2016;369:63-76. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022-510X\(16\)30487-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022-510X(16)30487-7)
- Russell MB, Ducros A. Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management. *Lancet Neurol*. 2011;10(5):457-70. [https://www.thelancet.com/journals/lanneur/article/PIIS1474-4422\(11\)70048-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanneur/article/PIIS1474-4422(11)70048-5/fulltext)
- Russell MB, Olesen J. Increased familial risk and evidence of genetic factor in migraine. *British Medical Journal*. 1995, 311: 541–4. <https://www.bmj.com/content/311/7004/541>
- Sutherland HG, Albury CL, Griffiths LR. Advances in genetics of migraine. *J Headache Pain*. 2019;20(1):72. <https://link.springer.com/article/10.1186/s10194-019-1017-9>
- Anttila V., et al. *Genetics of migraine. Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 148 (3rd series) Neurogenetics, Part II. D.H. Geschwind, H.L. Paulson, and C. Klein, Editors. 2018.
- Anttila V, Stefansson H, Kallela Met al. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet*. 2010; 42: 869–73. <https://www.nature.com/articles/ng.652>
- van den Maagdenberg AMJM, Nyholt DR, Anttila V. Novel hypotheses emerging from GWAS in migraine? *J Headache Pain*. 2019; 20(1): 5. <https://thejournalofheadacheandpain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s10194-018-0956-x>
- Rainero I, Vacca A, Roveta F, et al. Targeting MTHFR for the treatment of migraines. *Expert Opin Ther Targets*. 2019; 23(1): 29-37. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14728222.2019.1549544>
- Roecklein KA, Scher AI, Smith A, et al. Haplotype analysis of the folate-related genes MTHFR, MTRR, and MTR and migraine with aura. *Cephalalgia*. 2013; 33(7): 469-82. <https://read.qxmd.com/read/23430981/haplotype-analysis-of-the-folate-related-genes-mthfr-mtrr-and-mtr-and-migraine-with-aura>
- Chen H, Ji CX, Zhao LL, et al. Association Between Polymorphisms of DRD2, COMT, DBH, and MAO-A Genes and Migraine Susceptibility: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(47):e2012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5058966/>
- Ghosh J, Pradhan S, Mittal B. Identification of a novel ANKK1 and other dopaminergic (DRD2 and DBH) gene variants in migraine susceptibility. *Neuromolecular Med*. 2013;15(1):61-73. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12017-012-8195-9>
- Palmirotta R, Barbanti P, Ludovici G., et al. Association between migraine and ACE gene (insertion/deletion) polymorphism: the BioBIM study. *Pharmacogenomics*. 2014;15(2):147-55. [https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/pgs.13.186?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rft\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&](https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/pgs.13.186?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rft_dat=cr_pub%3Dpubmed&)
- Luo L, Chen Y, Wang L, Zhuo G, Qiu C, Tu Q, Mei J, Zhang W, Qian X, Wang X. Polymorphisms of Genes Involved in the Folate Metabolic Pathway Impact the Occurrence of Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Reprod Sci*. 2015; 22(7): 845-51. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1933719114565033>
- Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard E, Theoret Y, Moghrabi A, Sinnett D. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2004; 103(1): 252-7. <https://ashpublications.org/blood/article/103/1/252/17593>.
- Kumamoto K, Ishibashi K, Okada N, Tajima Y, Kuwabara K, Kumagai Y, Baba H, Haga N, Ishida H. Polymorphisms of GSTP1, ER-CC2 and TS-3'UTR are associated with the clinical outcome of mFOLFOX6 in colorectal cancer patients. *Oncol Lett*. 2013;6(3):648-654. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2013.1467>
- Lung FW, Tzeng DS, Huang MF, Lee MB. Association of the MAOA promoter uVNTR polymorphism with suicide attempts in patients with major depressive disorder. *BMC Med Genet*. 2011;12:74. <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-12-74>
- Favorov A.V., Gelfand M.S., Gerasimova A.V., et al. A Gibbs sampler for identification of symmetrically structured, spaced DNA motifs with improved estimation of the signal length. *Bioinformatics*, Volume 21, Issue 10, Pages 2240–2245. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/21/10/2240/206744>
- Russell MB, Ducros A. Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management. *Lancet Neurol*. 2011;10(5):457-70. [https://www.thelancet.com/journals/lanneur/article/PIIS1474-4422\(11\)70048-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanneur/article/PIIS1474-4422(11)70048-5/fulltext)
- de Vries B, Anttila V, Freilinger T., et al. Systematic re-evaluation of genes from candidate gene association studies in migraine using a large genome-wide association data set. *Cephalalgia*. 2016; 36(7): 604-14. [https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0333102414566820?rft\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=cepa](https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0333102414566820?rft_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=cepa)
- Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, Lee FS. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of

- wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci.* 2004;4(18):4401-4411. <https://www.jneurosci.org/content/24/18/4401.long>
22. Egan M.F., Kojima M., Callicott J.H., Goldberg T.E., Kolachana B.S., Bertolino A., Zaitsev E., Gold B., Goldman D., Dean M., Lu B., Weinberger D.R. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function // *Cell.* 2003;112(2):257-269. [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(03\)00035-7?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867403000357%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(03)00035-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867403000357%3Fshowall%3Dtrue)
  23. Ocklenburg S., Arning L., Gerding W.M., Epplen J.T., Güntürkün O., Beste C. Cholecystokinin A receptor (CCKAR) gene variation is associated with language lateralization // *PLoS One.* 2013;8(1):P.e53643. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0053643>
  24. Okubo T., Harada S. Polymorphisms of the CCK, CCKAR and CCKBR genes: an association with alcoholism study. *J Stud Alcohol.* 2001 Jul. V.62: 413-21. <https://www.jsad.com/doi/10.15288/jsa.2001.62.413>
  25. Kato T., Wang Z.W., Zoega T., Crowe R.R. Missense mutation of the cholecystokinin B receptor gene: lack of association with panic disorder. *Am J Med Genet.* 1996;67(4):401-415. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291096-8628%2819960726%2967%3A4%3C401%3A%3AAID-AJMG14%3E3.0.CO%3B2-N>
  26. Vai B, Riberto M, Poletti S, Bollettini I, Lorenzi C, Colombo C, Benedetti F. Catechol-O-methyltransferase Val(108/158)Met polymorphism affects fronto-limbic connectivity during emotional processing in bipolar disorder. *Eur Psychiatry.* 2017;41:53-59. [https://www.europsy-journal.com/article/S0924-9338\(16\)30157-2/fulltext](https://www.europsy-journal.com/article/S0924-9338(16)30157-2/fulltext)
  27. Tang Y., Anderson G.M., Zabetian C.P., Köhnke M.D., Cubells J.F. Haplotype-controlled analysis of the association of a non-synonymous single nucleotide polymorphism at DBH (+ 1603C → T) with plasma dopamine beta-hydroxylase activity. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005; 139(1): 88-90. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajmg.b.30220>
  28. Ates O., Celikel F.C., Taycan S.E., Sezer S., Karakus N. Association Between 1603C>T Polymorphism of DBH Gene and Bipolar Disorder in a Turkish Population. *Gene.* 2013; 519(2): 356-59. <https://www.science-direct.com/science/article/abs/pii/S037811913000723?via%3Dihub>
  29. Gentile G, Borro M, Lala N, Missori S, Simmaco M, Martelletti P. Genetic polymorphisms related to efficacy and overuse of triptans in chronic migraine. *J Headache Pain.* 2010;11(5):431-5. <https://thejournalofheadacheandpain.biomedcentral.com/articles/10.1007/s10194-010-0241-0>
  30. Hol F. A., Put N. M., Geurds M., Heil S. G., Trijbels F. J., Hamel B. C., Blom H. J. Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD in patients with neural tube defects. *Clin Genet.* 1998; 53(2): 119-25. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-0004.1998.tb02658.x?sid=nlm%3Apubmed>
  31. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost.* 1997; 78(1): 523-6.
  32. Matsuo K, Suzuki R, Hamajima N, Ogura M, Kagami Y, Taji H, et al. Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood.* 2001; 97: 3205-9. <https://ashpublications.org/blood/article-lookup/doi/10.1182/blood.v97.10.3205>
  33. Saur D., Vanderwinden J.M., Seidler B., Schmid R.M., De Laet M.H., Allescher H.D. Single-nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(6): 1662-7. <https://www.pnas.org/content/101/6/1662.long>
  34. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M., Shimasaki Y., Kugiyama K., Ogawa H., Motoyama T., Saito Y., Ogawa Y., Miyamoto Y., Nakao K. T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* 1999; 99(22): 2864-70. [https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.cir.99.22.2864?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rft\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed](https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.cir.99.22.2864?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rft_dat=cr_pub%3Dpubmed)
  35. Barbanti P, Fofi L, Aurilia C, Egeo G. Dopaminergic symptoms in migraine. *Neurol Sci.* 2013 May; 34Suppl 1: S67-70. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10072-013-1415-8/>
  36. Eberhardt M., Dux M., Namer B., et al. H2S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat Commun.* 2014 Jul 15. V.5:4381. <https://www.nature.com/articles/ncomms5381/>
  37. Dux M., Will C., Vogler B., et al. Meningeal blood flow is controlled by H2 S-NO crosstalk activating a HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Br J Pharmacol.* 2016 Feb.; 173(3): 431-45. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4728414/>
  38. Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet.* 1998; 103: 273-9. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004390050816>
  39. Guo G., Ou X.M., Roettger M., Shih J.C. The VNTR 2 repeat in MAOA and delinquent behavior in adolescence and young adulthood: associations and MAOA promoter activity. *Eur J Hum Genet.* 2008 May; 16(5): 626-34. <https://www.nature.com/articles/5201999>

#### Сведения об авторах:

**Азимова Ю.Э.**, канд. мед. наук, врач-невролог, вед. науч. сотр., ООО «Университетская клиника головной боли», ФГБНУ НИИОПП;

**Климов Е.А.**, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет;

**Наумова Е.А.**, науч. сотр., ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет;

**Кокаева З.Г.**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет;

**Зайцева А.И.**, студент, ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет;

**Кондратева Н.С.**, канд. биол. наук, ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет;

**Анучина А.А.**, выпускница магистратуры, ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет;

**Рудько О.И.**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет;

**Скоробогатых К.В.**, канд. мед. наук, врач-невролог, ООО «Университетская клиника головной боли»;

**Амелин А.В.**, доктор мед. наук, проф., ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России;

**Кукушкин М.Л.**, доктор мед. наук, проф., ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

**Борзенко С.А.<sup>1,2</sup>, Захаров В.Д.<sup>1</sup>, Миридонова А.В.<sup>1</sup>, Куприянова А.Г.<sup>1,3</sup>, Колесник С.В.<sup>1</sup>, Островский Д.С.<sup>1,4</sup>, Горшков И.М.<sup>1</sup>, Колесник А.И.<sup>1</sup>, Арбуханова П.М.<sup>1</sup>**

## Патофизиологические механизмы эпителиально-мезенхимальной трансформации при идиопатическом эпилетинальном фиброзе

<sup>1</sup>ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, 127486, г. Москва, Россия, Бескудниковский бульвар, д. 59А;<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России; 127473, г. Москва, Россия, ул. Делегатская, д. 20/1;<sup>3</sup>Научно-исследовательский Клинический Институт Педиатрии РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, 125412, г. Москва, Россия, ул. Талдомская, д. 2;<sup>4</sup>ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ) может лежать в основе перестройки дифференцированных клеток при репарации тканей и формировании фиброза. В основе патогенеза идиопатического эпилетинального фиброза (иЭРФ) могут также быть задействованы процессы дифференцировки и трансформации различных типов клеток. **Цель исследования** – выявление признаков мезенхимального фенотипа в клетках эпилетинальных мембран удаленных с поверхности сетчатки у пациентов с иЭРФ и различной остротой зрения. **Методика.** В исследование включено 60 пациентов (60 глаз) с диагнозом иЭРФ. Все пациенты были разделены на 3 группы по 20 пациентов в каждой, в зависимости от исходной максимально скорректированной остроты зрения (МКОЗ): 1-я группа имела МКОЗ 0,9 -0,7 н/к; 2-я – 0,6-0,3 н/к; 3-я – от 0,2 до 0,05. У всех пациентов удаляли эпилетинальную и внутреннюю пограничную мембраны (ЭРМ и ВПМ). ЭРМ и ВПМ удаляли послойно или единым блоком. Проводили иммуногистохимическое окрашивание образцов мембран, с целью выявления и визуализации следующих антигенов: виментина,  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ -SMA), и коллагенов IV и VI типов. **Результаты.** У пациентов 1-й группы во всех случаях ЭРМ удалялись отдельно от ВПМ. В образцах выявлялись единичные клетки экспрессирующие виментин,  $\alpha$ -SMA, коллагены IV и VI типов. У пациентов 2-й группы в 16 случаях (80%) ЭРМ с поверхности сетчатки удалялись единым блоком с ВПМ. В образцах выявлено увеличение числа клеток экспрессирующих  $\alpha$ -SMA и виментин, при этом имело место статистически значимое увеличение экспрессии коллагенов IV и VI типов. Во всех образцах 3-й группы ЭРМ и ВПМ в 100% случаях удалялись с поверхности сетчатки единым блоком. В 17 (85%) случаях мембраны имели один или несколько участков сращения с сетчаткой, в клетках превалировала экспрессия коллагенов VI и VI типов. Маркеры виментин,  $\alpha$ -SMA, коллагены VI и VI типов обнаруживали статистически значимую корреляционную связь с МКОЗ до операции. Причем, виментин имел сильную обратную корреляционную связь ( $r=-0,788$ ,  $p=0,004$ ), факторы  $\alpha$ -SMA и коллагены IV, VI типов – очень сильную обратную корреляционную связь ( $r<-0,9$ ,  $p<0,001$ ). **Заключение.** На примере прогрессирования идиопатического эпилетинального фиброза выявлена ЭМТ мембран. Данный феномен характеризуется приобретением клетками мембраны мезенхимального фенотипа: появлением экспрессии виментина и  $\alpha$ -SM актина а также и приобретением способности к продуцированию компонентов внеклеточного матрикса (коллагены IV и VI типов). Ключевым моментом в процессе формирования и прогрессирования ЭРФ является трансформация клеточного состава в миофибробластоподобные клетки. Повышенная экспрессия  $\alpha$ -SM актина непосредственно связана с сокращением мембраны и «натяжением» сетчатки миофибробластами, что в свою очередь приводит к прогрессирующему снижению остроты зрения и увеличению метаморфозов у пациентов ( $r<-0,9$ ,  $p<0,001$ ).

**Ключевые слова:** эпителиально-мезенхимальная трансформация; пролиферативный процесс; эпилетинальная мембрана; виментин; актин гладкомышечных клеток; коллаген IV и VI типов; миофибробластоподобные клетки.

**Для цитирования:** Борзенко С.А., Захаров В.Д., Миридонова А.В., Куприянова А.Г., Колесник С.В., Островский Д.С., Горшков И.М., Колесник А.И., Арбуханова П.М. Патофизиологические механизмы эпителиально-мезенхимальной трансформации при идиопатическом эпилетинальном фиброзе. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 15-22.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.15-22

Для корреспонденции: **Миридонова Анна Владимировна**, e-mail: Miridonova.anna@mail.ru

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-315-00357.

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

**Поступила** 02.11.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

**Borzenok S.A.<sup>1,2</sup>, Zakharov V.D.<sup>1</sup>, Miridonova A.V.<sup>1</sup>, Kupriyanova A. G.<sup>3</sup>, Kolesnik S.V.<sup>1</sup>, Ostrovsky D.S.<sup>1,4</sup>, Gorshkov I.M.<sup>1</sup>, Kolesnik A.I.<sup>1</sup>, Arbukhanova P.M.<sup>1</sup>**

## Pathophysiological mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in idiopathic epiretinal fibrosis

<sup>1</sup>S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Beskudnikovskiy Blvd. 59a, Moscow 127486, Russia;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, A.I. Evdokimov Moscow State University for Medicine and Dentistry; Delegatskaya Str. 20/1, Moscow 127473, Russia;

<sup>3</sup>Research Clinical Institute of Pediatrics at the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Taldomskaya Str. 2, Moscow 125412, Russia;

<sup>4</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

Epithelial-mesenchymal transition may underlie reorganization of mature differentiated cells and tissues during their repair and fibrosis. The pathogenesis of idiopathic epiretinal fibrosis may also involve processes of differentiation and transformation of different cell types. **Aim.** To identify signs of the mesenchymal phenotype in cells of idiopathic epiretinal membranes removed from the surface of the retina in patients with different visual acuity. **Methods.** Sixty eyes of 60 patients with idiopathic epiretinal fibrosis were divided into three groups: Group 1 included patients with best-corrected visual acuity (BCVA) 0.7-0.9; group 2 consisted of patients with BCVA 0.3-0.6; and group 3 consisted of patients with BCVA 0.1-0.3. In all patients, the internal limiting membrane (ILM) was peeled for idiopathic epiretinal membrane (IERM). Idiopathic ERM/ILM samples from vitrectomy were analyzed for vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), and type IV and VI collagens using flat-mount immunohistochemistry. **Results.** In patients of group 1, single cells expressing vimentin,  $\alpha$ -SMA, and type VI and VI collagens were found. In patients of group 2, the number of cells expressing  $\alpha$ -SMA and vimentin was increased with a statistically significant increase in the expression of type IV and VI collagens ( $p < 0.05$ ). Type VI and IV collagens prevailed ( $p < 0.05$ ) in all samples of group 3. Sometimes membranes had sites of rough fusion with extracellular matrix components. These membranes strongly adhered to ILM and were removed as a single block during vitrectomy. **Conclusion.** Using the example of progressive idiopathic epiretinal fibrosis this study found the epithelial-mesenchymal transition. This phenomenon was characterized by membrane cells that have acquired the mesenchymal phenotype due to appearance of vimentin and  $\alpha$ -SM actin expression ( $p < 0.05$ ) as well as the ability to produce components of extracellular matrix (type IV and VI collagens) ( $p < 0.05$ ). The key point in the process of ERM formation and progression was the transformation of the cellular composition into myofibroblast-like cells. The increased expression of  $\alpha$ -SM actin was associated with membrane contraction and tensioning of the retina by myofibroblasts, which resulted in impaired visual acuity and increased metamorphopsia ( $r < -0.9$ ,  $p < 0.001$ ).

**Keywords:** epithelial mesenchymal transition; proliferative process; epiretinal membrane; vimentin; smooth muscle actin; type IV and VI collagens; myofibroblast-like cells.

**For citation:** Borzenok S.A., Zakharov V.D., Miridonova A.V., Kupriyanova A.G., Kolesnik S.V., Ostrovsky D.S., Gorshkov I.M., Kolesnik A.I., Arbukhanova P.M. Pathophysiological mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in idiopathic epiretinal fibrosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 15-22. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.15-22

**For correspondence:** **A.V. Miridonova**, e-mail: miridonova.anna@mail.ru

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

**Acknowledgments.** The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-315-00357.

### Information about authors:

Miridonova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3784-711X>

Ostrovsky D.S., <https://orcid.org/0000-0002-2817-7102>

Kolesnik A.I., <https://orcid.org/0000-0002-6835-7204>

Arbukhanova P.M., <https://orcid.org/0000-0002-3304-6043>

**Received** 02.11.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020



## Введение

В последнее время большой интерес, в вопросах касающихся патогенетических механизмов формирования фиброза, вызывает теория эпителиально – мезенхимальной трансформации (ЭМТ) или эпителиально – мезенхимального перехода (ЭМП) [1, 2].

Согласно описанию в зарубежных литературных источниках, ЭМТ представляет собой временную утрату клетками эпителиального фенотипа и временное приобретение ими фенотипа мезенхимальных клеток. Это удавалось наблюдать в эмбриогенезе, а также в процессе опухолевого роста [3]. При изменении эпителиального фенотипа на мезенхимальный клетки приобретают повышенную подвижность и способность к инвазии, что позволяет им покинуть локальное микроокружение, переместиться в новые условия и дать начало другим типам клеток [4]. Кроме того, последние данные свидетельствуют, что эмбрионально-мезенхимальную трансформацию можно наблюдать в зрелых дифференцированных клетках при репарации тканей и формировании фиброза.

Известно, что в основе патогенеза идиопатического эпилеретинального фиброза также лежат процессы дифференцировки и трансформации различных типов клеток. Эпилеретинальный фиброз – это медленно прогрессирующая приобретенная патология органа зрения, которая сопровождается образованием тонкой полупрозрачной фиброзно-клеточной пленки в макулярной области. Эпилеретинальные мембраны (ЭРМ) обладают способностью к сокращению и могут приводить к искривлению поверхности витреомакулярного интерфейса, что в свою очередь обуславливает снижение остроты зрения и развитие метаморфопсий [5-7].

Основопологающую роль в развитии и прогрессировании иЭРМ играют клетки глиального происхождения (клетки Мюллера, астроциты) [8-13]. Находясь на поверхности витреоретинального интерфейса, данные клетки со временем активируются – подвергаются морфологическим изменениям, трансформации и начинают проявлять сократительную активность. Клетки выделяют маркер дифференцировки гладкой мускулатуры –  $\alpha$ -SM актин, обладающий сократительной активностью, что способствует усилению контракции ткани [14].

На сегодняшний день отмечается роль клеточных субпопуляций миофибробластов/фибробластов в формировании иЭРМ, проводятся исследования молекулярных медиаторов идиопатического эпилеретинального фиброза, что служит импульсом для разработки новых диагностических и прогностических критериев заболевания.

По мнению В.С. Репина и И.Н. Сабуриной, фибрирование структур сетчатки всецело зависит от факторов регионального микроокружения. Авторами высказано предположение, что чередование во времени эпителиальных и мезенхимальных признаков фенотипа является общей биологической закономерностью как в эмбриогенезе, так и в онтогенезе и связано с феноменом эпителиально-мезенхимальной пластичности, поэтому данный механизм является физиологическим и функционирует в норме [15, 16]. ЭМТ лежит в основе глобального фиброгенеза. Термин «ЭМТ», по определению, ограничен молекулярными событиями, происходящими в эпителиальных клетках, но наличие ЭМТ отражает более общий процесс, вовлекающий другие клеточные популяции [17].

Дальнейшее изучение ЭМТ в настоящее время представляется обоснованным и перспективным направлением медико-биологических исследований. Понимание механизмов ЭМТ может помочь в выявлении важных патогенетических особенностей развития и прогрессирования фиброза практически во всех органах.

**Цель исследования** – выявление признаков мезенхимального фенотипа в клетках идиопатических эпилеретинальных мембран удаленных с поверхности сетчатки у пациентов с различной остротой зрения.

## Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии».

Для данного исследования были отобраны 60 пациентов с диагнозом идиопатический эпилеретинальный фиброз. Критериями оценки степени выраженности патологического процесса служили жалобы на снижение остроты зрения и наличие метаморфопсий, данные оптической когерентной томографии (ОКТ) и чувствительность сетчатки в макулярной зоне по данным микропериметрии.

Все пациенты были разделены на 3 равные группы по 20 пациентов (20 глаз) в каждой в зависимости от исходной максимально скорректированной остроты зрения: 1-я группа от 0,7 до 0,9, 2-я от 0,3 до 0,6 и 3-я от 0,05 до 0,2.

Пациентам было выполнено хирургическое вмешательство – стандартная трехпортовая 25-27 Gauge хромовитректомиа. Контрастирование эпилеретиналь-

ной мембраны (ЭРМ) проводили с использованием красителя membrane blue dual (DORC, Нидерланды). Далее с помощью эндовитреального пинцета проводили удаление ЭРМ и внутренней пограничной мембраны (ВПМ). При этом обращали внимание на характер их удаления: раздельное (последовательное) или единым блоком. Данные образцы помещали в пробирки с 2,0 мл 4% параформальдегида. Через 4 ч их переносили в пробирки с 2,0 мл физиологического раствора. Затем мембраны фиксировали на предметном стекле с полилизинным покрытием. (Thermo SCIENTIFIC, USA). Проводили иммуногистохимическое окрашивание с целью выявления и визуализации антигенов: виментина,  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ -SMA), а также коллагена IV, VI типов. В качестве первичных антител применяли: анти-виментин в разведении 1:250 (номер по каталогу ab8978), анти- $\alpha$ -гладкомышечный актин в разведении 1:100 (номер по каталогу ab5694), антитела к коллагену IV типа в разведении 1:200 (номер по каталогу ab6311), анти-коллаген VI в разведении 1:250 (номер по каталогу ab6588) (Abcam; Cambridge, UK). В качестве вторичных антител использовали козы поликлональные антитела к антигенам мыши (AlexaFluor®594) в разведении 1:250 (номер по каталогу ab150116), козы поликлональные антитела к антигенам кролика (AlexaFluor®488) в разведении 1:250 (номер по каталогу ab150077) (Abcam; Cambridge, UK). Окрашенные препараты исследовали с помощью конфокального сканирующего микроскопа FLUOVIEW FV10i (OLYMPUS Corporation, Япония). Полученные снимки анализировали, используя программное обеспечение «CellProfiler», позволяющее выделять необходимые для анализа клеточные компоненты раздельно: ядра и цитоплазмы или клетки (ядро + цитоплазма), что давало возможность расчета интенсивности свечения каждой клетки или отдельных ее компонентов.

Статистическую обработку клинических исследований проводили с использованием компьютерных программ Statistica 10.0 («StatSoft», США) и Microsoft Office Excel 2007 («Microsoft», США). Для выявления соотношения между количественными показателями проводили множественный регрессионный анализ, а также корреляционный анализ по Спирмену. Силу корреляционной связи определяли в соответствии со шкалой Чеддока (по абсолютной величине): менее 0,10 – связь отсутствует, 0,1-0,3 – слабая, 0,3-0,5 – умеренная, 0,5-0,7 – средняя, 0,7-0,9 – высокая, 0,9 и более – очень высокая. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

У пациентов 1-й группы с максимальной коррекцией остроты зрения (МКОЗ) 0,7 – 0,9, во всех случаях эпиретинальная мембрана (ЭРМ) удалялась отдельно от внутренней пограничной мембраны (ВПМ). Это было обусловлено меньшей степенью адгезии ЭРМ с ВПМ и сетчаткой, что подтверждалось результатами иммуногистохимического исследования. В образцах мембран этой группы были выявлены единичные глиальные клетки, экспрессирующие виментин – маркер начальной стадии эпителиально-мезенхимальной трансформации. Его появление указывает на перестройку цитоскелета клетки с последующим изменением её функции. В образцах был также обнаружен  $\alpha$ -SMA – маркер дифференцировки гладкой мускулатуры и активированных миофибробластов (рис. 1, 4), наличие которого подтверждает переход данных клеток в мезенхимальный фенотип, обозначая начало пролиферативного процесса. Клетки, экспрессирующие  $\alpha$ -SMA проявляют сократительную активность, обуславливая сморщивание самой мембраны, что объясняет появление у пациентов жалоб на искаженное восприятие формы и величины предметов (метаморфопсию) при относительно высокой МКОЗ. В небольшом количестве в образцах выявлялась экспрессия коллагенов IV и VI типов.

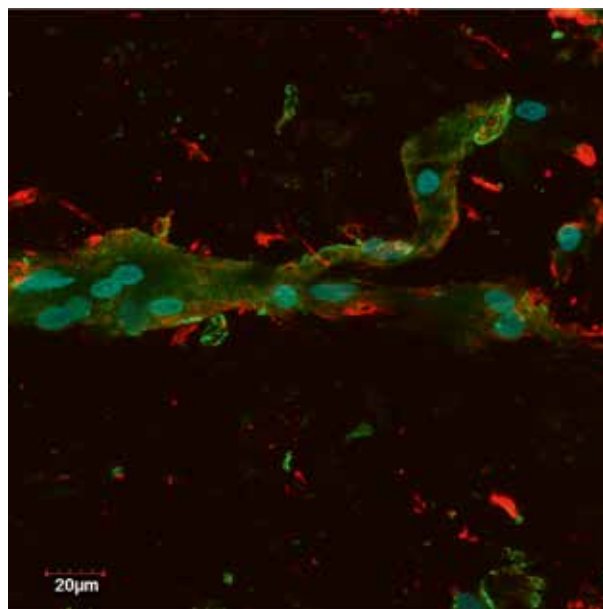
У пациентов 2-й группы выявлено увеличение количества клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -SMA и виментин, при этом наблюдалось статистически значимое увеличение экспрессии коллагенов IV и VI типов (рис. 2 А, Б; 4). В 16 случаях (80%) ЭРМ с поверхности сетчатки удаляли единым блоком с ВПМ, что свидетельствует о более плотной адгезии данных структур, вследствие изменения клеточных элементов ЭРМ и продукции коллагена. Увеличение количества активных пролиферирующих клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -SMA и синтезирующих коллаген, а также увеличение уровня маркера мезенхимальной дифференцировки виментина, свидетельствуют о прогрессировании патологического процесса. Увеличение в зонах фиброза гладкомышечного актина указывает на повышение пула мезенхимальных клеток, что клинически проявляется нарастанием жалоб на более выраженное искажение зрения и снижение его остроты.

Во всех образцах 3-й группы превалировали коллагены IV и VI типов ( $p < 0,05$ ) (рис. 3, 4). Количество клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -SMA, виментин также возросло, что свидетельствовало об увеличении числа мезенхимальных клеток. ЭРМ имели еще более плотную связь с сетчаткой и ВПМ, чем у пациентов 2-й группы

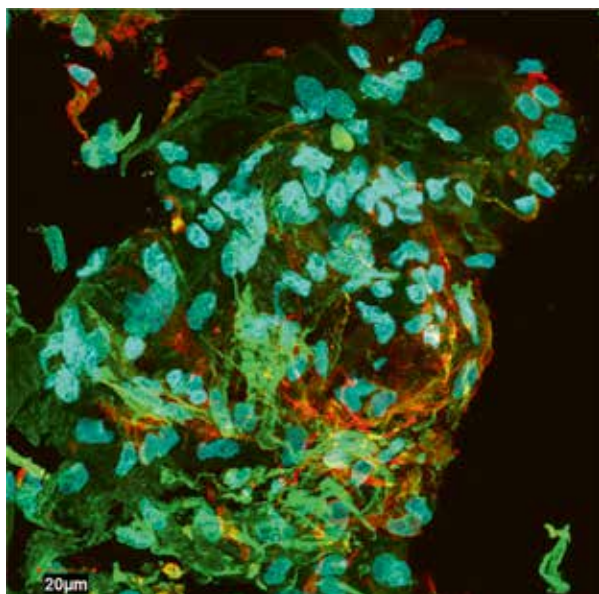
— практически во всех случаях выявлялся один или несколько участков сращения, в результате чего ЭРМ и ВПМ удалялись с поверхности сетчатки единым блоком. В 17 случаях (85%) сращение мембран с сетчаткой было настолько плотным, что удаление таких участков могло привести к повреждению последней. В связи с этим, в подобных участках проводили иссечение остатков ЭРМ витреотомом. Выявленные изменения мембран пациентов 3-й группы свидетельствовали о завершении процессов трансформации клеток, что приводило к грубым анатомо-функциональным нарушениям, в результате чего у пациентов данной группы острота зрения после операции улучшалась лишь незначительно.

Для выявления зависимости МКОЗ до операции у пациентов с идиопатическим эпиретинальным фиброзом и уровнем экспрессии виментина,  $\alpha$ -SMA, коллагенов VI и IV типов проводили корреляционный анализ Спирмена.

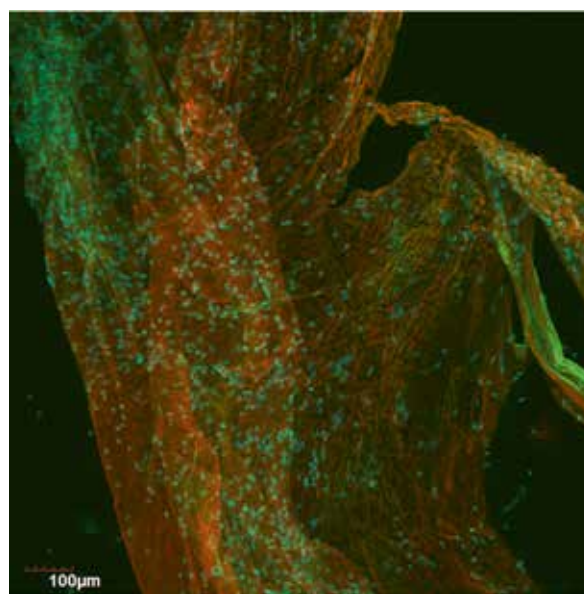
Выявлено, что все исследуемые факторы (виментин,  $\alpha$ -SMA, коллагены VI и VI типов) имели статистически значимую корреляционную связь с МКОЗ до операции у пациентов с иЭРМ ( $p < 0,001$ ). Причем, фактор виментин имел сильную обратную корреляционную связь ( $r = -0,788$ ,  $p = 0,004$ ), факторы  $\alpha$ -SMA, кол-



**Рис. 1.** Фрагмент удаленной эпиретинальной мембраны из 1-й группы. Иммунофлуоресцентное окрашивание:  $\alpha$ -SM актин (зеленое свечение), виментин (красное свечение), ядерная ДНК (Hoechst, синее свечение). Единичные миофибробластоподобные клетки экспрессирующие данные маркеры. Ув.  $\times 600$ .



**Рис. 2, А.** Фрагмент удаленной эпиретинальной мембраны из 2-й группы. Иммунофлуоресцентное окрашивание:  $\alpha$ -SM актин (зеленое свечение), виментин (красное свечение), ядерная ДНК (Hoechst, синее свечение). Прогрессирование патологического процесса. Значительное количество миофибробластоподобных клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -SM актин. Ув.  $\times 600$ .



**Рис. 2, Б.** Фрагмент удаленной эпиретинальной мембраны из 2-й группы. Иммунофлуоресцентное окрашивание: коллаген VI (зеленое свечение), коллаген IV (красное свечение), ядерная ДНК (Hoechst, синее свечение). Единичная экспрессия коллагена VI. Ув.  $\times 100$ .

лагены VI и VI типов имели очень сильную обратную корреляционную связь ( $r < -0,9, p < 0,001$ ).

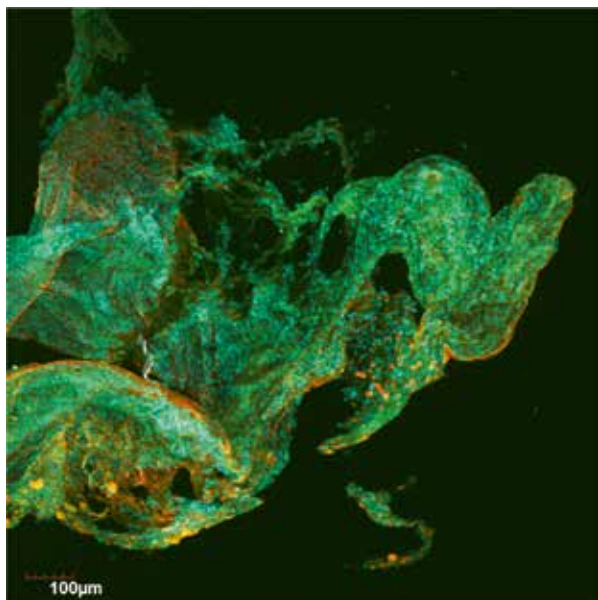
**Обсуждение**

Полученные данные подтверждают, что ключевым моментом в процессе формирования и прогрессирования иЭРФ является трансформация клеточного со-

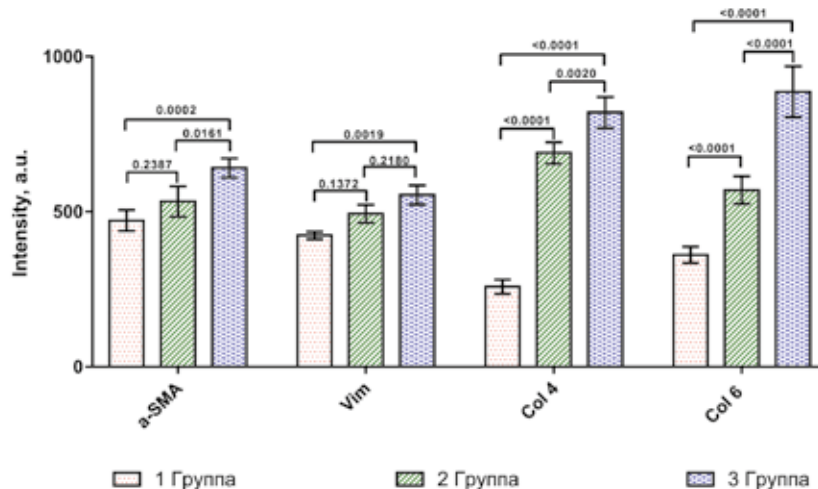
става в миофибробластоподобные клетки. Повышенная экспрессия  $\alpha$ -SM актина непосредственно связана с сокращением мембраны и натяжением сетчатки миофибробластами, что в свою очередь приводит к прогрессирующему снижению остроты зрения и увеличению метаморфозий у пациентов.

Кроме того, процесс фиброгенеза на поверхности сетчатки зависит от ремоделирования коллагена в результате ремоделирования внеклеточного матрикса [18]. В норме существует баланс между синтезом и распадом коллагена. Однако нарастание пула трансформированных клеток ЭРМ приводит к выраженному дисбалансу: продукция коллагена начинает существенно ( $p < 0,05$ ) превалировать над распадом, что и было продемонстрировано в данной работе.

С помощью проведенных иммуногистохимических исследований удалось проследить морфологические изменения клеточного состава ЭРМ. Обнаружение  $\alpha$ -SM актина во всех исследуемых образцах подтверждает факт того, что клетки ЭРМ начинают приобретать способность к сокращению и проявлять свойства миофибробластоподобных клеток, которым принадлежит одна из ведущих ролей в процессе фиброзного преобразования макулярной области сетчатки. Следует отметить, что на начальных этапах и по мере прогрессирования патологического процесса отмечается увеличение продукции виментина и  $\alpha$ -SM актина с вовлечением все большего количества клеток в процесс ЭМТ. На заключительной стадии фиброзирования сетчатки отмечалось статистически значимое превалирование количества коллагенов IV и VI типов. Такие изменения отмечали у пациентов



**Рис. 3.** Фрагмент удаленной эпиретинальной мембраны из 3-й группы. Иммунофлуоресцентное окрашивание: коллаген VI (зеленое свечение), коллаген IV (красное свечение), ядерная ДНК (Hoehst, синее свечение). Превалирующая экспрессия коллагенов VI, IV. Ув.  $\times 100$ .



**Рис. 4.** Уровень экспрессии маркеров  $\alpha$ -SM актин, виментин, коллагены VI и IV типов. Ось  $x$  – Интенсивность экспрессии в условных единицах.

3-й группы. Подобные изменения необратимы и свидетельствуют о завершении процесса ремоделирования ткани. При этом морфологические изменения данной области сетчатки на разных этапах патологического процесса коррелируют с изменением остроты зрения пациентов.

Таким образом, на примере прогрессирования идиопатического эпиретинального фиброза выявлена эпителиально-мезенхимальная трансформация клеточного состава в мезенхимальный фенотип, выражающаяся в постепенном вовлечении в процесс все большего количества клеток и проявляющаяся увеличением экспрессии виментина и  $\alpha$ -SM актина, а также появлением способности клеток к продуцированию компонентов внеклеточного матрикса. Внеклеточный матрикс представлен коллагенами IV и VI и типов характерных для мембранной архитектоники.

Таким образом, в основе прогрессирования патологического процесса лежит перестройка клеточных элементов ЭРМ с приобретением ими признаков мезенхимального фенотипа, что морфологически проявляется увеличением экспрессии виментина и  $\alpha$ -SMA миофибробластоподобными клетками.

На заключительных этапах формирования эпиретинального фиброза происходит избыточная продукция мембранных типов коллагена, приводящая к грубым морфологическим изменениям и соответствующим функциональным нарушениям.

#### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Борзенко С.А., Захаров В.Д., Куприянова А.Г., Колесник С.В., Горшков И.М., Колесник А.И., Миридонова А.В.

Сбор и обработка материала – Миридонова А.В., Колесник С.В., Островский Д.С., Колесник А.И., Арбуханова П.М.

Статистическая обработка – Миридонова А.В., Островский Д.С., Арбуханова П.М.

Написание текста – Миридонова А.В., Колесник С.В., Колесник А.И.

Редактирование текста – Борзенко С.А., Захаров В.Д.

#### Литература

1. Lee J.M., Dedhar S., Kalluri R. Thompson E.W. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell. Biol.* 2006; 172: 973-81.
2. Lee J.S., Semela D., Iredale J., Shah V.H. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: A new function for the liver-specific pericytes? *Hepatology*. 2007; 45: 817-25.
3. Kalluri R., Weinberg R.A. The basic of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 1420-28.

4. Лазаревич Н. Л. Эпителиально-мезенхимальный переход при прогрессии гепатокарцином. *Вестн. РОИЦ им. Н. Н. Блохина РАМН*. 2003; 3: 76-82.
5. Качалина Г.Ф., Дога А.В., Касмынина Т.А., Куранова О.И. Эпиретинальный фиброз: патогенез, исходы, способы лечения. *Офтальмохирургия*. 2013; 4: 108-10.
6. Сдобникова С.В., Козлова И.В., Дорошенко Е.В., Ронзина И.А., Алексеенко Д.С., Сидамонидзе А.Л. и др. Изменения поля зрения после витреомакулярной хирургии – критерий качества лечения. *Вестник Офтальмологии*. 2013; 5: 114-26.
7. Snead D.R., James S., Snead M.P. Pathological changes in the vitreoretinal junction 1: epiretinal membrane formation. *Eye*. 2008; 22: 1310-17.
8. Bringman A., Wiedemann P. Muller Glial cells in retinal Disease. *Ophthalmologica*. 2012; 227(1): 1 – 19.
9. Edwards M., McLeod D., Bhutto I. et al. Idiopathic preretinal glia in aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2016; 150: 44 – 61.
10. Guerin C., Wolfshagen R., Eifrig D., Anderson D. Immunocytochemical identification of Muller's glia as a component of human epiretinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990; 31: 1483 – 91.
11. Guidry C. Isolation and characterization of porcine Muller cells. Myofibroblastic dedifferentiation in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37: 740 – 52.
12. Guidry C., Bradley K., King J. Tractional force generation by human Muller cells: growth factor responsiveness and integrin receptor involvement. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 1355 – 63.
13. Горшков И.М., Колесник С.В., Шестопалов В.И., Миридонова А.В. Клинико-морфологические особенности клеточного состава идиопатических эпиретинальных мембран у пациентов с различной остротой зрения. *Офтальмохирургия*. 2017; 2: 6-10.
14. Bu S.C., Kuijter R., Van der Worp R.J. et al. Immunohistochemical Evaluation of Idiopathic Epiretinal Membranes and In Vitro Studies on the Effect of TGF- $\beta$  on Müller Cells iERMs, Müller Cells, and TGF- $\beta$ . *Investigative ophthalmology & visual science*. 2015; 56(11): 6506-14.
15. Репин В.С., Сабурова И.Н. Обратимые эпителио-мезенхимальные трансформации клеток в эмбриогенезе и постнатальном обновлении тканей. *Клет. трансп. и тканевая инженерия*. 2006; 1(3): 64-72.
16. Сабурова И.Н., Репин В.С. 3D-культивирование: от отдельных клеток к регенерационной ткани (к вопросу о феномене эпителио-мезенхимальной пластичности). *Клет трансп. и тканевая инженерия*. 2010; 5(2): 75-86.
17. Галишон П., Гертиг А. Эпителиально-мезенхимальная трансформация как биомаркер почечного фиброза: готовы ли мы применить теоретические знания на практике? *Нефрология*. 2013; 17(4): 9-16
18. Verzijl N., DeGroot J., Oldehinkel E., Bank R., Thorpe S., Baynes J. et al. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem. J*. 2000; 350: 381-87.

#### References

1. Lee J.M., Dedhar S., Kalluri R. Thompson E.W. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell. Biol.* 2006; 172: 973-81.
2. Lee J.S., Semela D., Iredale J., Shah V.H. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: A new function for the liver-specific pericytes? *Hepatology*. 2007; 45: 817-25.

3. Kalluri R., Weinberg R.A. The basic of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 1420–28.
4. Lazarevich N.L. *Epithelial-mesenchymal transition in hepatocarcinoma progression. Vestnik RONC im. N. N. Blohina RAMN.* 2003; 3: 76–82. (in Russian)
5. Kachalina G.F., Doga A.V., Kasmynina T.A., Kuranova O.I. Дора А.В., Эпиретинал фиброз: патогенез, исходы, методы лечения. *Ofial'mohirurgiya.* 2013; 4: 108–10. (in Russian)
6. Sdobnikova S.V., Kozlova I.V., Doroshenko E.V., Ronzina I.A., Alekseenko D.S., Sidamonidze A.L. et al. Field of view changes after vitreomacular surgery: a treatment quality criteria. *Vestnik Ofial'mologii.* 2013; 5: 114–26. (in Russian)
7. Snead D.R., James S., Snead M.P. Pathological changes in the vitreoretinal junction I: epiretinal membrane formation. *Eye.* 2008; 22: 1310–17.
8. Bringman A., Wiedemann P. Muller Glial cells in retinal Disease. *Ophthalmologica.* 2012; 227(1): 1–19.
9. Edwards M., McLeod D., Bhutto I. et al. Idiopathic preretinal glia in aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2016; 150: 44–61.
10. Guerin C., Wolfshagen R., Eifrig D., Anderson D. Immunocytochemical identification of Muller's glia as a component of human epiretinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990; 31: 1483–91.
11. Guidry C. Isolation and characterization of porcine Muller cells. Myofibroblastic dedifferentiation in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37: 740–52.
12. Guidry C., Bradley K., King J. Tractional force generation by human Muller cells: growth factor responsiveness and integrin receptor involvement. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 1355–63.
13. Gorshkov I.M., Kolesnik S.V., Shestopalov V.I., Miridonova A.V. Clinical and morphological features of cells implicated in the pathogenesis of idiopathic epiretinal membrane formation in patients with different visual acuity. *Ofial'mokhirurgiya.* 2017; 2: 6–10. (in Russian)
14. Bu S.C., Kuijer R., Van der Worp R.J. et al. Immunohistochemical Evaluation of Idiopathic Epiretinal Membranes and In Vitro Studies on the Effect of TGF- $\beta$  on Müller Cells iERMs, Müller Cells, and TGF- $\beta$ . *Investigative ophthalmology & visual science.* 2015; 56(11): 6506–14.
15. Repin V.S., Saburina I.N. Reversible epithelio-mesenchymal transformations of cells in embryogenesis and postnatal tissue regeneration. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya.* 2006; 1(3): 64–72. (in Russian)
16. Saburina I.N., Repin V.S. 3D culturing: from individual cells to blastemic tissue (Revisited the phenomenon of epithelial – mesenchymal plasticity). *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya.* 2010; 5(2): 75–86. (in Russian)
17. Galichon P, Hertig A. Epithelial to mesenchymal transition as a biomarker in renal fibrosis: are we ready for the bedside? *Nefrologiya.* 2013; 17(4): 9–16
18. Verzijl N., DeGroot J., Oldehinkel E., Bank R., Thorpe S., Baynes J. et al. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem. J.* 2000; 350: 381–87.

#### Сведения об авторах:

**Борзенко Сергей Анатольевич**, доктор мед. наук, проф., акад. РАЕН, рук. Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ НМИЦ «МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России; проф. каф. глазных болезней Московского государственного медико-стоматологического института им. А.И. Евдокимова, e-mail: mdborzenok@yandex.ru;

**Захаров Валерий Дмитриевич**, доктор мед. наук, проф., зав. отделом витреоретинальной хирургии и диабета глаза ФГАУ НМИЦ «МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: info@mntk.ru;

**Миридонова Анна Владимировна**, аспирант отдела витреоретинальной хирургии и диабета глаза ФГАУ НМИЦ «МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: Miridonova.anna@mail.ru;

**Куприянова Анна Геннадьевна**, канд. мед. наук, зав. лаб. патоморфологии и иммунологии Научно-Исследовательский Клинический институт Педиатрии РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России; вед. науч. сотр. лаб. трансплантологии и клеточной биологии ФГАУ НМИЦ «МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: annak2003@bk.ru;

**Колесник Светлана Валерьевна**, канд. мед. наук, науч. сотр. отдела витреоретинальной хирургии и диабета глаза ФГАУ НМИЦ «МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: svkolesnik83@gmail.com;

**Островский Дмитрий Сергеевич**, лаб. Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ НМИЦ «МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, аспирант НИИОПП, e-mail: dmitriy.ostrovskiy@gmail.com;

**Горшков Илья Михайлович**, канд. мед. наук, зав. отделением витреоретинальной хирургии и диабета глаза ФГАУ «НМИЦ «МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: soul@gambler.ru;

**Колесник Антон Игоревич**, канд. мед. наук, науч. сотр. отдела витреоретинальной хирургии и диабета глаза ФГАУ «НМИЦ «МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: doc\_ant@mail.ru;

**Арбуханова Патимат Магомедовна**, канд. мед. наук, мл. науч. сотр. Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ НМИЦ «МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: pm.arbukhanova@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 617.713-089.843

Филиппова Е.О.<sup>1,2</sup>, Кривошеина О.И.<sup>1</sup>

## Особенности проявлений экспериментально индуцированной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы и эффективность клеточной терапии заболевания

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»,

634050, г. Томск, Россия, Московский тракт, д. 2;

<sup>2</sup>Национальный Исследовательский Томский политехнический университет,

634050, г. Томск, Россия, просп. Ленина, д. 30

**Введение.** Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ЭЭД) роговицы – тяжелое, прогрессирующее заболевание, сопровождающееся хроническим отеком всех слоев ткани роговой оболочки, болевыми ощущениями и значительным снижением остроты зрения. Радикальным способом лечения ЭЭД является кератопластика, однако, любая операция сопряжена с высоким риском развития гнойных осложнений и отторжения трансплантата в послеоперационном периоде. Альтернативой радикальной хирургии является клеточная терапия. Среди клеточных популяций наиболее широко используются мононуклеарные лейкоциты крови, вырабатывающие свыше 120 видов биологически активных веществ – цитокинов. **Цель исследования** – изучение особенностей развития экспериментально индуцированной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы и оценка эффективности лечения заболевания методом наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность патологически измененной роговой оболочки. **Методика.** Исследования выполнены на 54 крысах-самцах Wistar. На 1-м этапе у всех животных моделировали ЭЭД путем повреждения и удаления эндотелиального слоя роговицы. На 2-м этапе у 6 крыс энуклеировали пораженный глаз для морфологического исследования. Остальных животных разделяли на основную группу и группу сравнения в зависимости от метода лечения: 24 крысам основной группы насаивали суспензию аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на поврежденную внутреннюю поверхность роговой оболочки, 24 крысам группы сравнения проводили инстилляции препаратов Корнерегеля 3 раза и Баларпана 2 раза в сутки. **Результаты.** Развитие ЭЭД роговицы *in vivo* подтверждалось при наружном осмотре и данными оптической когерентной томографии роговой оболочки и световой микроскопии. Наблюдалось увеличение толщины роговой оболочки за счет диффузного отека (до  $382 \pm 53$  мкм), развитие баллонной дистрофии переднего эпителия, гидратация и местами расслоение отечной жидкостью коллагеновых волокон собственного вещества роговицы. В эксперименте *in vivo* также установлено, что механическое повреждение и удаление эндотелия роговицы сопровождается вторичной альтерацией всех ее слоев с развитием ЭЭД в течение 2 нед. На модели ЭЭД роговицы апробирован новый метод лечения заболевания, показавший значительную эффективность. Установлено, что наложение суспензии способствует быстрому (в 13,0 раз) уменьшению гидратации основного вещества роговицы к 21-м сут от начала лечения, нормализации строения переднего эпителия и уменьшения его толщины (в 1,3 раза) на 21-е сут наблюдения. **Заключение.** Результаты морфологического и инструментального исследования подтверждают эффективность использования метода наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на поврежденную внутреннюю поверхность роговой оболочки больного глаза при лечении ЭЭД роговицы.

**Ключевые слова:** эндотелиально-эпителиальная дистрофия роговицы; аутологичные мононуклеарные лейкоциты; регенерация; крысы.

**Для цитирования:** Филиппова Е.О., Кривошеина О.И. Особенности проявлений экспериментально индуцированной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы и эффективность клеточной терапии заболевания. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 23-30.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.23-30

**Для корреспонденции:** Филиппова Екатерина Олеговна, e-mail: katerinabosix@mail.ru**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, Федеральной целевой программы (соглашение № 14.575.21.0140, уникальный идентификатор RFMEFI57517X0140).**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**Поступила** 08.07.2019**Принята к печати** 16.01.2020**Опубликована** 25.02.2020

Filippova E.O.<sup>1,2</sup>, Krivoshein O.I.<sup>1</sup>**Manifestations of experimental bullous keratopathy and the effectiveness of cell therapy**<sup>1</sup>Siberian State Medical University,  
Moskovskiy Trakt Str. 2, Tomsk 634050, Russia;<sup>2</sup>National Research Tomsk Polytechnic University,  
Prospekt Lenina 30, Tomsk 634050, Russia

**Introduction.** Bullous keratopathy is a serious, progressive disease, which involves chronic edema of the corneal tissue associated with a significant decrease in visual acuity and severe pain. Current treatment of corneal edema includes conservative and surgical methods. Keratoplasty is a radical treatment; however, this method is associated with a high risk of purulent complications and graft rejection in the postoperative period. Cell therapy is an alternative to the radical surgery. Among cell populations, the most widely used are mononuclear white blood cells producing more than 120 types of biologically active substances, such as cytokines. **The aim** was to study features of the development of experimentally-induced bullous keratopathy and to evaluate the effectiveness of treatment by layering a suspension of autologous mononuclear leukocytes on the inner surface of pathologically altered cornea. **Methods.** The study was performed on 54 Wistar male rats. At the 1<sup>st</sup> stage of experiment, bullous keratopathy was modeled on all animals by damaging and removing the corneal endothelium. At the 2<sup>nd</sup> stage of experiment the animals were divided into the main group and the comparison group based on the treatment method. In the main group ( $n=24$ ), a suspension of autologous mononuclear leukocytes was layered on the damaged surface of the cornea; in the comparison group ( $n=24$ ), Korneregel was instilled three times daily and Balarpan was instilled twice a day. **Results.** The development of experimental bullous keratopathy was confirmed by external examination, optical coherence tomography of the cornea, and light microscopy. Mechanical damage and removal of the corneal endothelium was associated with secondary alterations in all corneal layers with a rapid (within 2 weeks) development of bullous keratopathy. The new therapy tested on the model of corneal bullous keratopathy proved to be highly effective. The suspension layering provided a rapid (13.0 times faster than in comparison group) decrease in corneal hydration by day 21 of the treatment, improved the structure of anterior corneal epithelium, and decreased its thickness (1.3 times) by day 21 of follow-up. **Conclusion.** The study results obtained with morphological and instrumental methods confirmed the effectiveness of layering the suspension of autologous mononuclear leukocytes on the damaged inner surface of the cornea in the treatment of bullous keratopathy.

**Keywords:** bullous keratopathy; autologous mononuclear leukocytes; regeneration; rats.

**For citation:** Filippova E.O., Krivosheina O.I. Manifestations of experimental bullous keratopathy and the effectiveness of cell therapy. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 23-30. (In Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.23-30

**For correspondence:** **Filippova O. Ekaterina**, Candidate of Technical Sciences, Assistant of the Department of Ophthalmology, Assistant of the Department of Histology, Cytology and Embryology of Siberian State Medical University, 2 Moscovskii tract, Tomsk, Russian Federation; Engineer of the Laboratory of Plasma Hybrid Systems of Tomsk Polytechnic University, 30 Lenin Ave, Tomsk, Russian Federation, e-mail: katerinabosix@mail.ru.

**Acknowledgments.** This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, the Federal Target Program (agreement No. 14.575.21.0140, unique identifier RFMEFI57517X0140).

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

**Information about authors:**Filippova E.O., <https://orcid.org/0000-0003-0425-1213>Krivosheina O.I., <https://orcid.org/0000-0001-7509-5858>**Received** 08.07.2019**Accepted** 16.01.2020**Published** 25.02.2020**Введение**

Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ЭЭД) роговицы является тяжелым, прогрессирующим заболеванием, в основе которого лежит развитие хронического отека ткани роговой оболочки, что сопровождается значительным снижением остроты зрения и выраженными болевыми ощущениями. Фундаментальные

исследования патогенеза ЭЭД роговой оболочки проводятся с помощью экспериментального моделирования *in vivo*. Известны модели заболевания после полного удаления десцеметовой мембраны роговой оболочки или введения в переднюю камеру глаза экспериментального животного 0,05% раствора хлорида бензалкония



[1-3]. Критерием успешности моделирования ЭЭД роговицы является развитие диффузного отека всех слоев оболочки с последующими дистрофическими изменениями ткани роговицы. Однако выявление ЭЭД в разработанных моделях заболевания или не соответствует патогенетическим особенностям данного процесса, как, например, при моделировании с раствором хлорида бензалкония, или результаты весьма нестабильны [1-3]. Вследствие этого многие аспекты патогенеза ЭЭД роговицы до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Тем не менее, ведущими патогенетическими факторами заболевания считаются первичные и вторичные процессы дегенеративного и инфекционного характера, приводящие к прогрессирующему и необратимому уменьшению численности клеток эндотелия роговицы (менее 500 клеток на 1 мм<sup>2</sup>) с утратой барьерной и насосной функций [4].

Лечение ЭЭД роговицы в настоящее время проводится в двух направлениях: консервативном и хирургическом. Консервативное лечение заболевания недостаточно эффективно и обеспечивает лишь кратковременный положительный результат [4-6]. Радикальным способом лечения является кератопластика, позволяющая достичь лечебного и оптического эффектов [7], однако, как всякое хирургическое вмешательство, кератопластика сопряжена с высоким риском развития гнойных осложнений и отторжения трансплантата в послеоперационном периоде [8]. В последние 2-3 десятилетия в клинической офтальмологии для коррекции воспалительно-репаративных реакций в тканях глазного яблока при различной патологии органа зрения активно используется клеточная терапия. Среди клеточных популяций наиболее широко используются мононуклеарные лейкоциты крови, вырабатывающие свыше 120 видов биологически активных веществ – цитокинов [8, 9].

**Цель исследования** – изучение особенностей проявлений экспериментально индуцированной ЭЭД роговицы и оценка эффективности лечения заболевания методом наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность патологически измененной роговой оболочки.

### Методика

Содержание и все манипуляции, которым подвергались животные во время эксперимента, соответствовали правилам лабораторной практики, утвержденным приказом министра здравоохранения и социального развития от 23 августа 2010 г. N 708н «Об утверждении правил лабораторной практики», а также с соблюдением принципов конвенции по защите позвоночных

животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой Европейским союзом в 1986 г., и директивы 86/609 ЕЭС.

Эксперименты выполнены на базе лаборатории биологических моделей ФГБОУ ВО СибГМУ. Протокол проведения эксперимента утвержден локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России от 24.11.2014, регистрационный № 3898. Исследования выполнены на 54 половозрелых крысах - самцах Wistar массой 250 г. На I этапе эксперимента у всех животных моделировали ЭЭД повреждением и удалением эндотелиального внутреннего слоя роговицы одного из глаз (54 глаза). На II этапе апробировали новый метод хирургического лечения ЭЭД роговицы, разработанный на основе выявленных закономерностей развития заболевания, и проводили оценку его эффективности в сравнении с традиционной фармакотерапией.

Для воспроизведения ЭЭД роговицы в условиях операционной под общей анестезией всем животным (54 крысы) с помощью иглы калибра 25 G, заостренный конец которой загнут под углом 90 градусов, повреждали и удаляли эндотелиальный слой роговой оболочки одного из глаз. На II этапе эксперимента через 2 нед после развития ЭЭД роговицы в зависимости от планируемого лечения животные были разделены на 2 группы: основную и группу сравнения. В условиях операционной животным основной группы (24 крысы) под общей анестезией в периферических отделах роговицы большого глаза выполняли два парацентеза, в один из которых устанавливали ирригационную систему с подачей стерильного воздуха в переднюю камеру. Через второй парацентез в переднюю камеру большого глаза на границе между внутренней поверхностью роговицы и воздухом с помощью шприца вводили 0,5 мл суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов крови, аккуратно наслаивая ее на поврежденную внутреннюю поверхность роговой оболочки. Далее ирригационную систему удаляли, края парацентезов гидратировали.

Мононуклеарные лейкоциты экспериментальных животных выделяли из крови методом фракционирования в градиенте плотности на разделяющем растворе фиколл-верографин (плотность 1,067-1,077 г/мл). Чистота клеток составляла 96-98%, процент окрашенных (погибших) клеток составлял 1,5-2%, что не превышало допустимое (не более 3%) количество.

Животным группы сравнения (24 крысы) проводили консервативное лечение (инстилляций Корнерегеля 3 раза в сутки, Баларпана 2 раза в сутки).

Общая продолжительность эксперимента составила 35 сут. Через 2 нед после развития ЭЭД роговицы,

на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сут от начала лечения проводили наружный осмотр животных обеих групп, выполняли оптическую когерентную томографию роговицы (ОКТ), а также выводили из эксперимента по 6 животных с последующей энуклеацией поврежденного глаза для морфологического исследования. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по методу Ван Гизона с последующей микроскопией при 50-, 200- и 400-кратном увеличении. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета IBM SPSS Statistics 20. Нормальность распределения показателей проверяли при помощи закона Колмогорова-Смирнова. В связи с несоответствием распределения данных нормальному закону распределения использовали непараметрический критерий Уилкоксона. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты

По данным наружного осмотра первые признаки экспериментально индуцированной дистрофии роговой оболочки в виде диффузного отека и помутнения роговицы в сочетании со светобоязнью, слезотечением и расширением сосудов конъюнктивы больного глаза обнаруживались у всех 54 животных уже через 2 нед после моделирования заболевания.

Данные наружного осмотра подтверждались результатами ОКТ роговицы больного глаза: у всех экспериментальных животных (54 крысы) отмечалось утолщение роговой оболочки за счет диффузного отека до  $382 \pm 53$  мкм при нормальном показателе толщины роговицы здоровой крысы 160 мкм (**рис. 1, А**).

Гистологические исследования, проведенные у 6 животных через 2 нед после моделирования ЭЭД роговицы, позволили верифицировать заболевание: в 100% случаев через 2 нед после моделирования заболевания при световой микроскопии в переднем эпителии роговой оболочки выявлялись признаки баллонной дистрофии (вакуолизация цитоплазмы, гиперхромия ядер). Количество дистрофически измененных эпителиоцитов составляло  $21,1 \pm 1,0$  клеток в поле зрения. Толщина переднего эпителия роговицы находилась в пределах  $39,3 \pm 0,5$  мкм при нормальном значении данного показателя у здоровых крыс  $28 \pm 2,8$  мкм ( $p < 0,05$ ). Собственное вещество роговой оболочки было представлено резко гидратированными и местами расслоенными отечной жидкостью коллагеновыми волокнами. Общая площадь тканевых щелей в строме роговицы составляла  $593 \pm 12$  мкм<sup>2</sup>. Задняя пограничная мембрана была неравномерно утолщена, эндотелий роговицы отсутствовал на всем протяжении.

После инструментального и морфологического подтверждения диагноза ЭЭД роговой оболочки переходили к II этапу эксперимента.

Согласно данным наружного осмотра, уже на 3-и сут от начала лечения у 22 животных (92%) основной группы после наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность роговой оболочки отмечалось существенное уменьшение светобоязни, блефароспазма и слезотечения. У 20 животных (83%) было зафиксировано уменьшение отека роговицы больного глаза. Полное рассасывание отека и восстановление прозрачности роговой оболочки происходили в основной группе на 21-е сут (**рис. 1, Б**) после вмешательства, в то время как в группе сравнения у всех крыс на протяжении 35 сут эксперимента сохранялись диффузный отек роговой оболочки, светобоязнь и слезотечение.

Показатели ОКТ роговицы больных глаз животных коррелировали с данными наружного осмотра. До лечения у животных обеих групп отмечалось увеличение толщины роговицы с экспериментально индуцированной ЭЭД в 2,4 раза по сравнению с нормой. На 7-е сут от начала лечения у животных обеих групп отмечались признаки уменьшения отека роговицы больного глаза, происходившего, однако, более быстрыми темпами в основной группе (**табл. 1, рис. 1**).

На 14-е сут от начала лечения показатель толщины роговицы больного глаза по данным ОКТ у животных основной группы уменьшился в 1,7 раза от показателя «до лечения» ( $p < 0,05$ ), в то время как у животных группы сравнения, получавших консервативное лечение — лишь в 1,1 раза ( $p > 0,05$ ) (**табл. 1**). На 21-е сут от начала лечения у животных основной группы после наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность роговицы показатель толщины роговой оболочки больного глаза фактически приближался к нормальному значению, сократившись в 2,02 раза от уровня до лечения ( $p < 0,05$ ). У животных группы сравнения, получавших консервативное лечение, показатель толщины роговицы больного глаза, по данным ОКТ, на 21-е сут уменьшился только в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ) (**табл. 1**).

Проведенные гистологические исследования также показали эффективность нового метода лечения ЭЭД роговицы. До начала лечения у животных обеих групп (54 крысы) в переднем эпителии роговой оболочки больного глаза обнаруживались дистрофически измененные клетки (до  $21,1 \pm 1,0$  клеток в поле зрения). На 3-и сут от начала лечения у животных основной группы отмечено уменьшение количества дистрофических эпителиоцитов в 1,7 раза от исходного уровня ( $p < 0,05$ ), на 7-е сут данный показатель уменьшился в 2,2 раза

( $p < 0,01$ ), на 14-е сут – в 6,8 раза ( $p < 0,01$ ) соответственно (табл. 2). На 21-е сут после проведенного лечения передний эпителий роговицы больного глаза у животных основной группы, по данным световой микроскопии, имел нормальное строение. У животных группы сравнения уменьшение количества дистрофических клеток переднего эпителия роговицы больного глаза в 1,4 раза от исходного уровня выявлено только на 7-е сут консервативного лечения ( $p > 0,05$ ) (табл. 2). На 14-е сут данный показатель в группе сравнения уменьшился 1,7 раза от первоначального значения ( $p < 0,05$ ), на 21-е сут – в 7,5 раз соответственно ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Нормализация толщины переднего эпителия роговицы больного глаза у животных основной группы начиналась на 14-е сут после лечения новым хирургическим методом (табл. 2), сократившись в 1,2 раза ( $p > 0,05$ ) от исходного уровня. На 21-е сут данный показатель уменьшился в 1,3 раза от исходного уровня ( $p < 0,05$ ) (табл. 2). В группе сравнения нормализация толщины переднего эпителия роговицы больного глаза начиналась только на 21-е сут, сократившись в 1,1 раза от первоначального уровня ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

Уменьшение отека собственного вещества роговицы больного глаза у животных основной группы выявлялось уже на 3-и сут после наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность патологически измененной роговой оболочки (табл. 2). На 7-е сут данный показатель в основной группе статистически значимо сократился в 1,7 раза,  $p < 0,05$  от исходного ( $593 \pm 12$  мкм<sup>2</sup>) уровня (рис. 2), на 14-е сут – в 3,04 раза (рис. 3) и на 21-е сут – в 13,0 раз ( $p < 0,01$ ) соответственно (табл. 2).

У животных группы сравнения, получавших консервативное лечение, уменьшение отека собственного вещества роговицы больного глаза начиналось только на 14-е сут фармакотерапии (рис. 4), сократившись в 1,4 раза от исходного уровня и статистически значимо на 21-е сут – в 2,0 раза ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

### Обсуждение

Таким образом, воспроизведение в эксперименте *in vivo* ЭЭД роговицы путем повреждения и удаления эндотелиального слоя роговой оболочки сопровождается вторичной альтерацией остальных слоев ткани с

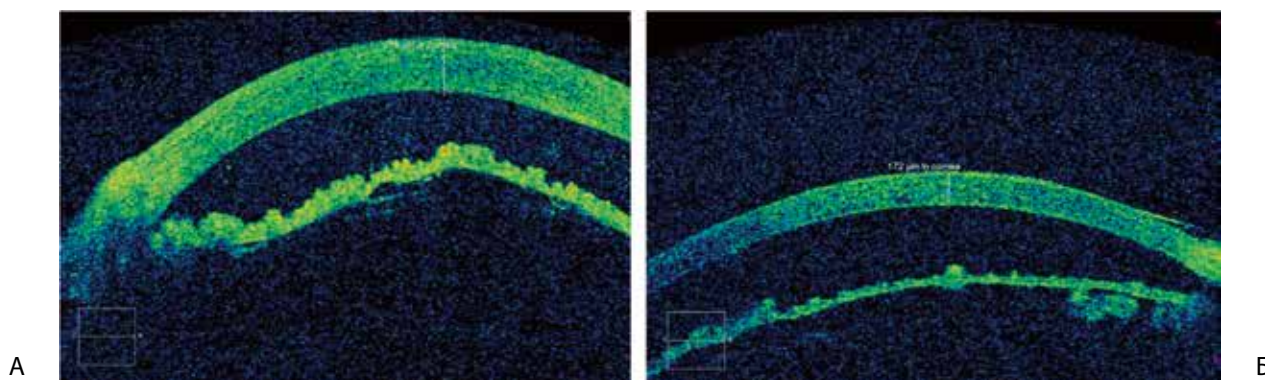


Рис. 1. Результаты оптической когерентной томографии роговицы экспериментального животного основной группы с индуцированной ЭЭД роговой оболочки. А – отек и утолщение среза роговицы на 7-е сут лечения (наложения на внутреннюю поверхность роговой оболочки суспензии аутологичных лейкоцитов); Б – восстановление прозрачности и толщины среза роговицы на 21-е сут лечения.

Таблица 1

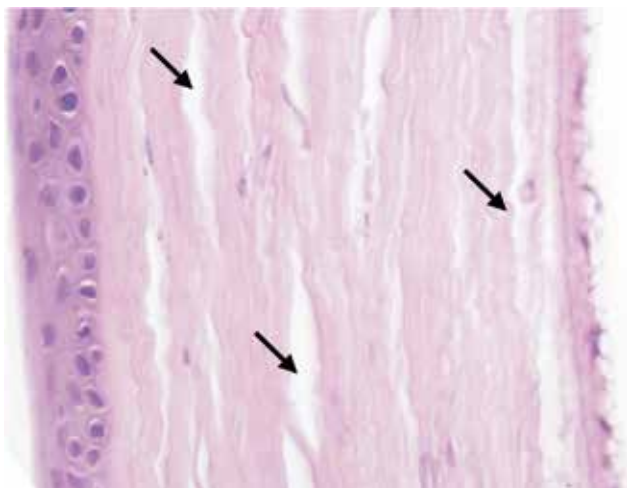
Динамика толщины роговицы (мкм) у животных с экспериментально индуцированной ЭЭД роговой оболочки в зависимости от метода лечения, М $\pm$ т

Группы исследования	До лечения	Сроки наблюдения			
		3-и сут	7-е сут	14-е сут	21-е сут
Основная группа (n = 24)	382,0 $\pm$ 1,3	360,0 $\pm$ 1,3	305,0 $\pm$ 1,2 *	221,0 $\pm$ 1,2 **	189,0 $\pm$ 1,2 **
Группа сравнения (n = 24)	381,0 $\pm$ 1,3	366,0 $\pm$ 1,3	357,0 $\pm$ 1,2	329,0 $\pm$ 1,2*	301,0 $\pm$ 1,2*

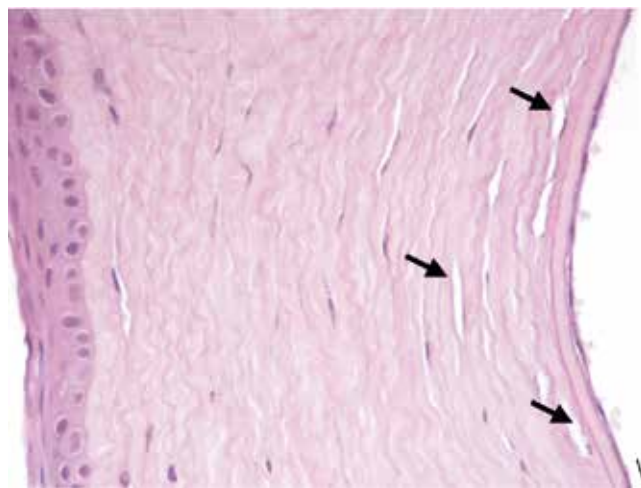
Примечание. \* – уровень значимости различий по сравнению с исходными данными  $p < 0,01$ ; \*\* – уровень значимости различий по сравнению с исходными данными  $p < 0,05$ . Толщина роговицы глаза у здоровых крыс – 160 мкм.

быстрым (в течение 2 нед) развитием заболевания. При этом сроки развития инструментальных и морфологических признаков экспериментально индуцированной ЭЭД роговицы сопоставимы с таковыми при спонтанном течении заболевания в клинической практике. Это свидетельствует об адекватности разработанной модели ЭЭД роговой оболочки у крыс-самцов Wistar. Можно предположить, что в условиях отсутствия эндотелия роговицы внутриглазная жидкость, диф-

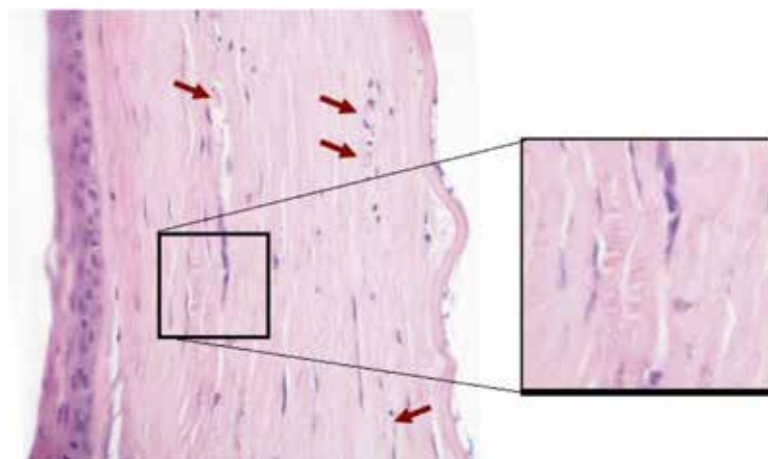
фундируя в строму, способствует дезорганизации ткани основного вещества роговой оболочки с последующей деструкцией коллагеновых волокон. Прогрессирование отека на субклеточном уровне, вероятно, сопровождается повреждением митохондрий и рибосом, разрушением лизосом и высвобождением ферментов. Как следствие, развивается ацидоз с увеличением дисперсности коллоидов и повышением их способности притягивать и удерживать воду. В строме



**Рис. 2.** Отек собственного вещества роговицы (косые стрелки) экспериментального животного основной группы с индуцированной ЭЭД роговой оболочки на 7-е сут после наложения суспензии аутологических мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность роговицы. Окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 200$ .



**Рис. 3.** Незначительный отек собственного вещества роговицы (косые стрелки) у экспериментального животного основной группы с индуцированной ЭЭД роговицы на 14-е сут после наложения суспензии аутологических мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность роговой оболочки. Окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 100$ .



**Рис. 4.** Дистрофически измененные клетки (стрелки), деструкция коллагеновых волокон (ув.  $\times 400$ ) у экспериментального животного группы сравнения с индуцированной ЭЭД роговицы на 14-е сут от начала консервативного лечения. Окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 100$  и  $\times 400$ .

**Динамика морфометрических показателей роговицы животных с экспериментально индуцированной ЭЭД роговой оболочки в зависимости от метода лечения (M±m)**

Группы исследования	Сроки эксперимента	Морфометрические показатели		
		Количество дистрофических клеток переднего эпителия	Толщина переднего эпителия, мкм	Площадь отека роговицы, мкм <sup>2</sup>
Основная группа (n = 24)	3-и сут	12,1± 0,1**	37,5± 1,4	475± 23
	7-е сут	9,4± 0,2*	35,6± 2,3	349± 23**
	14-е сут	3,1± 0,4*	31,6± 2,1	195± 14*
	21-е сут	0,1± 0,1*	30,8± 1,9*	45± 10*
Группа сравнения (n = 24)	3-и сут	20,0± 1,3	38,1± 1,8	589± 33
	7-е сут	15,3± 1,4	37,9± 0,9	534± 26
	14-е сут	12,5± 0,2	37,3± 0,8	430± 23
	21-е сут	2,8± 0,2	35,7± 0,7	290± 19

**Примечание.** \* – уровень значимости различий по сравнению с группой сравнения  $p < 0,01$ ; \*\* – уровень значимости различий по сравнению с группой сравнения  $p < 0,05$ .

роговицы нарастает уровень содержания  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , прогрессирует гиперосмия, что способствует усилению отека и вторичным дистрофическим изменениям всех слоев роговой оболочки.

Наслоение суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю, лишенную эндотелия поверхность роговицы, особенно в ранние сроки заболевания уменьшает явления отека ткани и препятствует развитию и прогрессированию гидропической дистрофии роговой оболочки.

Результаты исследований, полученных на II этапе эксперимента, показали эффективность предложенного метода лечения ЭЭД роговицы. Наслоение суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность роговой оболочки больного глаза способствует более быстрому уменьшению отека всех слоев роговицы, что подтверждается данными ОКТ и световой микроскопии. Согласно полученным данным, применение нового метода хирургического лечения ЭЭД роговицы способствует быстрому (в 13,0 раз) уменьшению гидратации основного вещества роговицы к 21-м сут от начала лечения, нормализации строения переднего эпителия и уменьшению его толщины (в 1,3 раза) на 21-е сут наблюдения.

### Заключение

Таким образом, в эксперименте *in vivo* установлено, что механическое повреждение и удаление эндотелия роговицы сопровождается вторичной альтерацией всех ее слоев с быстрым (в течение 2 нед) развитием

ЭЭД. Результаты морфологического и инструментального методов исследования подтверждают эффективность метода наслоения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на поврежденную внутреннюю поверхность роговой оболочки больного глаза при лечении ЭЭД роговицы.

### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Филиппова Е.О., Кривошеина О.И.;

Сбор и обработка материала – Филиппова Е.О., Кривошеина О.И.;

Статистическая обработка – Филиппова Е.О.;

Написание текста – Филиппова Е.О., Кривошеина О.И.;

Редактирование – Филиппова Е.О.

### Литература

1. Menegmeng Wang Effect of Glyceraldehyde Cross-Linking on a Rabbit Bullous Keratopathy Model Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Ophthalmology*. 2015; 5: 1-5.
2. Bredow L., Schwartzkopff J., Reinhard T. Regeneration of corneal endothelial cells following keratoplasty in rats with bullous keratopathy. *Molecular vision*. 2014; 20: 683-90.
3. Melles G.R.J., Wijdh R.H.J., Nieuwendaal C.P. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea*. 2004; 23: 286-88.
4. Bhandari V., Reddy J.K., Siddharthan K.S. Simultaneous Descemet's membrane endothelial keratoplasty and posterior iris-claw fixated intra ocular lens implantation (IOL) in management of aphakic bullous keratopathy. *International Ophthalmology*. 2016; 36: 305-11.

5. Acar B.T., Akdemir M.O., Acar S. Visual acuity and endothelial cell density with respect to the graft thickness in descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: One year results. *International Journal of Ophthalmology*. 2014; 7: 974-9.
6. Hirano K., Kachi S., Matsuura M., Kawase K., Park W.S. Non-Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty for Bullous Keratopathy in Buphthalmic Eye. *Case Rep. Ophthalmology*. 2016; 7: 279-84.
7. Pereira N.C., Diniz E.R., Ghanem R.C., Cunha Filho R., Prazeres T.M., Nose W3, Forseto A.D.S. Descemet membrane endothelial keratoplasty in multifocal pseudophakic eyes. *Arq. Bras. Oftalmol*. 2018; 81 (3): 183-7.
8. Каспаров А.А., Каспарова Е.А. Фадеева Л.Л. Персонализированная клеточная терапия ранней буллезной кератопатии (экспериментальное обоснование и клинические результаты). *Вестник офтальмологии*. 2013; 5: 53-61.
9. Каспарова Е.А., Суббот А.М. Проллиферативный потенциал заднего эпителия роговицы человека. *Вестник офтальмологии*. 2013; 3: 82-8.
3. Melles G.R.J., Wijdh R.H.J., Nieuwendaal C.P. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea*. 2004; 23: 286-8.
4. Bhandari V., Reddy J.K., Siddharthan K.S. Simultaneous Descemet's membrane endothelial keratoplasty and posterior iris-claw-fixated intra ocular lens implantation (IOL) in management of aphakic bullous keratopathy. *International Ophthalmology*. 2016; 36: 305-11.
5. Acar B.T., Akdemir M.O., Acar S. Visual acuity and endothelial cell density with respect to the graft thickness in descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: One year results. *International Journal of Ophthalmology*. 2014; 7: 974-9.
6. Hirano K., Kachi S., Matsuura M., Kawase K., Park W.S. Non-Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty for Bullous Keratopathy in Buphthalmic Eye. *Case Rep. Ophthalmology*. 2016; 7: 279-84.
7. Pereira N.C., Diniz E.R., Ghanem R.C., Cunha Filho R., Prazeres T.M., Nose W3, Forseto A.D.S. Descemet membrane endothelial keratoplasty in multifocal pseudophakic eyes. *Arq. Bras. Oftalmol*. 2018; 81 (3): 183-7.

### References

1. Mengmeng Wang Effect of Glyceraldehyde Cross-Linking on a Rabbit Bullous Keratopathy Model Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Ophthalmology*. 2015; 5: 1-5.
2. Bredow L., Schwartzkopff J., Reinhard T. Regeneration of corneal endothelial cells following keratoplasty in rats with bullous keratopathy. *Molecular vision*. 2014; 20: 683-90.
8. Kasparov A.A., Kasparov E.A. Fadeeva L.L. Personalized cellular therapy of early bullous keratopathy (experimental substantiation and clinical results). *Vestnik Oftalmologii*. 2013; 5: 53-61. (in Russian)
9. Kasparova E.A., Subbot A.M. Proliferative potential of the posterior epithelium of the human cornea. *Vestnik Oftalmologii*. 2013; 3: 82-8. (in Russian)

### Сведения об авторах:

**Филиппова Екатерина Олеговна**, канд. технических наук, ассистент каф. офтальмологии и каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Сибирского государственного медицинского университета, инженер лаб. плазменных гибридных систем Томского политехнического университета;

**Кривошеина Ольга Ивановна**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. офтальмологии Сибирского государственного медицинского университета.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 577.3

Богданенко Е.В.<sup>1</sup>, Сергиевич Л.А.<sup>2</sup>, Карнаухова А.В.<sup>2</sup>, Карнаухова Н.А.<sup>2</sup>, Лизунова И.А.<sup>2</sup>, Карнаухова В.Н.<sup>2</sup>

## Изучение регенеративного потенциала стволовых клеток цельного костного мозга для лечения механических травм кожи в модельных экспериментах на мышах

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

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, Россия, ул. Институтская, д. 3

**Введение.** Культивированные мезенхимальные стромальные стволовые клетки (МССК), выделенные из костного мозга (КМ), можно использовать для лечения обширных ран, однако это очень дорого, трудоёмко и возможно только через несколько дней после их получения. При этом цельный донорский КМ можно вводить системно непосредственно после травмы без выделения МССК, так как они содержатся в нём естественным образом. Это важно для предотвращения гибели и инвалидизации пострадавших. **Цель исследования** – изучение терапевтического потенциала цельного донорского КМ, пересаживаемого мышам-реципиентам после нанесения им механических травм. **Методика.** Эксперимент выполнен на 38 животных. На следующий день после облучения в дозе 6,5 Гр 18 мышам-реципиентам линии C57BL/6 наносили резаную рану в межлопаточной области спины, а затем вводили внутривенно 100 мкл суспензии клеток донорского цельного КМ, несущих маркерный ген зеленого флуоресцентного белка EGFP. Реципиентов забивали через 1, 2, 3, 7, 11, 14, 21, 28 и 35 сут после трансплантации. Под флуоресцентным микроскопом изучали участки кожи, прилегающие к ране, а также дно раны и струп. Скорость заселения этих зон сравнивали со скоростью заселения участков кожи без раны на пояснице данных реципиентов и в межлопаточной и поясничной областях (20) у облучённых животных-реципиентов без травмы. **Результаты.** Уже на следующий день после трансплантации в участках кожи, прилегающих к ране, и на дне раны обнаруживали донорские клетки. Через 7 сут наблюдалось массивное заселение раны флуоресцирующими клетками различных типов; в то же время в участках кожи без раны на пояснице данных реципиентов донорские клетки появились в существенных количествах только через 11 сут. Донорские клетки сохранялись в коже по меньшей мере 35 сут после трансплантации без всяких признаков элиминирования. У животных без травмы заселение кожи донорскими клетками происходило медленнее, чем у травмированных, с похожим типом заселения обеих изучаемых зон (межлопаточной и поясничной). **Заключение.** Полученные результаты позволяют предположить, что повреждённые ткани выделяют цитокины, обладающие способностью привлекать большинство донорских клеток именно к ране. МССК цельного КМ заращивали рану с очень большой скоростью, из чего можно предположить, что его трансплантация сразу после получения различных травм по эффективности может быть не хуже, чем лечение культивированными МССК, а по оперативности воздействия и экономичности намного его превосходить.

**Ключевые слова:** мыши, цельный костный мозг, стволовые клетки, облучение, раны, травмы, кожа, трансплантация, EGFP.

**Для цитирования:** Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А., Карнаухова В.Н. Изучение регенеративного потенциала стволовых клеток цельного костного мозга для лечения механических травм кожи в модельных экспериментах на мышах. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 31-38.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.31-38

**Для корреспонденции:** Богданенко Елена Валентиновна, e-mail: lenabogdval@mail.ru

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

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

**Поступила** 10.07.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Bogdanenko E.V.<sup>1</sup>, Sergievich L.A.<sup>2</sup>, Karnaukhov A.V.<sup>2</sup>, Karnaukhova N.A.<sup>2</sup>, Lizunova I.A.<sup>2</sup>, Karnaukhov V.N.<sup>2</sup>

## The regenerative potential of stem cells from the whole bone marrow for the treatment of skin mechanical trauma in a murine model

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

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya Str. 3, Moscow Region, Pushchino 142290, Russia

**Introduction.** Cultured mesenchymal stromal stem cells (MSSC), isolated from the bone marrow (BM) may be used to treat extensive wounds, but this treatment is very expensive, time consuming and possible only in several days after the injury. However, donor whole BM can be systemically administered directly after an injury without isolating MSSC because they are naturally contained in the BM. This is important for preventing death and disability of accident victims. **The aim of the work** was to study the therapeutic potential of donor whole BM transplanted to recipient mice after inflicting a mechanical trauma. **Methods.** On the next day after irradiation at a dose of 6.5 Gy, recipient C57BL/6 mice were subjected to a cut wound in the interscapulum and then injected intravenously with 100 µl of cell suspension of the donor whole BM carrying a marker gene of the green fluorescent protein, EGFP. Recipients were sacrificed in 1, 2, 3, 7, 11, 14, 21, 28, and 35 days after transplantation. The bottom of the wound and the scab on it and also areas of the skin adjacent to the wound were examined by fluorescent microscopy. The rate of colonization of these zones was compared to the rate of colonization of non-injured lumbar skin areas of these recipients and interscapular and lumbar regions of irradiated recipients without traumas. **Results.** Already on the next day after transplantation, the donor cells were detected in skin areas adjacent to the wound and on the bottom of the wound. In 7 days, massive wound colonization with various types of fluorescent cells was observed; at the same time, substantial amount of donor cells appeared in the non-injured lumbar skin of these recipients only in 11 days. The donor cells remained in the skin for at least 35 days after transplantation without any signs of elimination. Colonization of skin with the donor cells was slower in animals without than with wounds with a similar type of colonization in both of the studied zones (interscapular and lumbar). **Conclusions.** The study results suggested that damaged tissues secrete cytokines that are capable of attracting the majority of donor cells specifically to the wound. MSSC of the whole BM healed the wound very fast, which indicated that the MSSC transplantation immediately after a trauma is not inferior in effectiveness to the treatment with cultured MSSC and may be much superior in both promptness of the effect and cost-efficiency.

**Keywords:** mice, whole bone marrow, stem cells, irradiation, wounds, injuries, skin, transplantation, EGFP.

**For citation:** Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A., Karnaukhov V.N. The regenerative potential of stem cells from the whole bone marrow for the treatment of skin mechanical trauma in a murine model. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 31-38. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.31-38

**For correspondence:** Bogdanenko Elena Valentinovna, leading scientist, D.Sc., PhD, laboratory of the ecological and physical and chemical pathophysiology, e-mail: lenabogdval@mail.ru

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

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

### Information about authors:

Bogdanenko E.V., <http://orcid.org/0000-0002-3351-3316>

**Received** 10.07.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

В последние годы одним из основных направлений в биомедицине является поиск эффективных методов восстановления патологически изменённых, травмированных или изношенных органов и тканей. Наряду с другими методами, использование с этой целью трансплантации цельного костного мозга (КМ) является весьма многообещающим. Её применение для лечения лейкозов является уже общеизвестным; в ряде стран созданы криохранилища для использования донорского аллогенного КМ в случаях, когда среди

родственников больного не находится совместимого донора КМ для его пересадки. Перспективными являются предложения использования трансплантации криосохранённого цельного КМ для продления жизни и половой функции женщин [1, 2]. Не так давно стало известно, что возможно использовать не только цельный костный мозг, но и одну из его фракций – мезенхимальные стромальные стволовые клетки (МССК). Показано, что МССК можно культивировать на подложке, а затем после отслаивания переса-



живать больным с обширными термическими ожогами кожи [3]. Кроме того, МССК способны дифференцироваться в остеогенном направлении, и это их свойство использовали для экспериментального лечения животных с дефектами костной ткани [4]. Инъекции или аппликации культивированных МССК ускоряли заживление ожоговых ран у мышей с индуцированным сахарным диабетом [5] и у людей с диабетическими трофическими язвами [6]. Успешность подобных операций не вызывает сомнения, однако методика выращивания клеток требует высокой стерильности, дорогостоящих питательных сред и посуды, участия квалифицированного высокооплачиваемого персонала. Кроме того, в течение нескольких дней ожоговый больной или человек с другими обширными травмами кожи оказывается уязвимым для инфекций и, в конечном счёте, может погибнуть раньше, чем мезенхимальные клетки будут выращены в объёме, необходимом для трансплантации. Поэтому представляется интересной идея использования для заживления ран кожи системного введения цельного КМ. С целью изучения эффективности такого метода мы проводили мониторинг заселения донорскими клетками и их распределения на мышцах линии C57Bl/6, которым непосредственно после получения травмы вводили цельный КМ от доноров с геном EGFP.

### Методика

Работа одобрена этическим комитетом ФГБНУ НИ-ИОПП. В эксперименте в качестве доноров использовались самки мышей в возрасте 6-10 мес., несущие ген зеленого флуоресцентного белка (Enhanced Green Fluorescent Protein – EGFP, Tg(ACTB-EGFP)10sb/J), разводимые на основе инбредной линии C57BL/6 EGFP<sup>-/-</sup>. Этот белок использовался как витальная метка для определения приживаемости клеток донора в организме реципиента линии C57BL/6. Животных содержали в виварии ИБК РАН по 1-4 мыши в клетке на рационе из гранулированного корма с дополнительной подкормкой зерносмесью.

Для подавления возможной иммунной реакции проводилось общее однократное облучение мышшей-реципиентов в дозе 6,5 Гр за 1 день до трансплантации костного мозга. Облучение животных проводилось на рентгеновской установке РУТ-250-15-2 (РУМ 17), I=15мА, U=200кВ, с фильтрами из меди и алюминия, толщиной по 1мм каждый, мощность излучения 1 Гр/мин.

Костный мозг получали из бедренных костей донора, несущего ген EGFP. Для этого донора забивали дислокацией шейных позвонков, очищали кости от мягких тканей и растирали их в фарфоровой ступке в

600 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Полученную массу фильтровали через капроновое сито с размером пор 70 мкм. Образовавшуюся суспензию довели буфером до нужного объёма (500 мкл). Костный мозг, полученный из двух бедренных костей одного донора, использовали для 3-4 реципиентов.

Перед трансплантацией реципиентам проводили общую анестезию введением внутривенно препарата «Авертин» в дозе 2 мг действующего вещества на 20 г массы животного, представляющего собой раствор 2,2,2-трибромэтанола в 2-метил-2-бутаноле. Затем в зоне между лопатками удаляли шерсть пинцетом, пока не получалась голая округлая площадка около 1,3 см в диаметре. Затем кожу приподнимали пинцетом и вырезали её глазными ножницами до фасции мышц так, чтобы срез имел форму двояковыпуклой линзы длиной около 1 см и максимальной шириной около 7 мм, по бокам которой оставалась голая кожа шириной 2-3 мм. После этого животному распаривали хвост в тёплой воде, чтобы сделать хорошо заметными кровеносные сосуды, и в боковую вену вводили суспензию клеток костного мозга донора в объёме 100 мкл (1,5x10<sup>7</sup> клеток) инсулиновым шприцем. До полного просыпания реципиент находился в отдельной клетке с подогревом во избежание развития гипотермии.

При освещении светом с длиной волны в диапазоне 395–475 нм пересаженные реципиентам клетки донора с EGFP флуоресцировали в тканях реципиентов в зеленой области спектра с максимумом флуоресценции на длине волны 508 нм. В работе использовали флуоресцентный микроскоп Axio-Imager Z1 с цветной цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

Мышей-реципиентов двух групп забивали дислокацией шейных позвонков в соответствии с инструкцией American Physiological Society (1995 г) через 1, 2, 3, 7, 11, 14, 21, 28 и 35 сут (животные с травмой) и через 1, 2, 3, 7, 11, 14, 21, 28, 35 и 50 сут (животные без травмы) после введения клеток КМ. Животных обеих групп перед трансплантацией КМ облучали.

Участки кожи без раны на пояснице животных-реципиентов с травмой являлись контролем для межлопаточного участка кожи этих же животных, а животные-реципиенты без травмы являлись контролем для животных-реципиентов с травмой. Наружные и внутренние поверхности кожи животных как с травмой, так и без неё, а также струп изучали без всякой фиксации, погружив в каплю ФСБ. Повреждённую кожу отрезали по контуру раны на расстоянии 2 мм от её края. Селезёнку исследовали, чтобы сравнить скорость её заселения клетками донора с таковой на участках повреждённой кожи.

Для этого селезёнку целиком помещали под микроскоп и просматривали при 50- и 100-кратном увеличении с двух сторон. После этого из её средней части вырезали лезвием поперечные слайсы, которые просматривали с 2-х сторон при таком же увеличении.

### Результаты

После облучения животных, нанесения им травмы и трансплантации донорских клеток краевые участки кожи, прилегающие к ране, просматривали целиком и в нарезанном на слайсы с помощью лезвия виде в свете флуоресценции. Использование флуоресцентного микроскопа для этой цели явилось достаточным, так как позволило просматривать исследуемые участки, меняя только глубину резкости прибора. Для изучения динамики заселения донорскими клетками в каждый из указанных выше сроков после трансплантации забивали по 2 мыши из сравниваемых групп. Результаты заселения представлены в **таблице**. Уже через одни сутки после трансплантации в крае кожи, прилежащем к ране, обнаруживались как отдельно лежащие, так и в виде небольших групп флуоресцирующие недифференцированные клетки округлой формы и одиночные фибробласты. Единичные круглые недифференцированные донорские клетки обнаруживались также на дне раны. При этом селезёнка подопытных животных, которая предположительно должна была сконцентрировать в себе максимум донорских клеток, имела на своей поверхности чуть больше недифференцированных клеток, чем кожа вокруг ра-

ны, а на поперечном разрезе – единичные фибробластоподобные клетки. Через 2 суток после трансплантации у одного из двух реципиентов было обнаружено появление единичных светящихся клеток на наружной поверхности кожи вокруг раны, а на внутренней – фибробластов и множества пролиферирующих круглых клеток. Дно раны не показывало изменений в заселении по сравнению с первыми сутками.

Через 3 сут после трансплантации на внутренней поверхности кожи и дне раны у обоих реципиентов обнаруживались как круглые клетки, так и фибробласты различной формы, причём наблюдалось выстраивание последних в цепочки. Около волосяных луковиц наблюдались небольшие скопления светящихся клеток. Такие же клетки появлялись у обоих реципиентов на наружной поверхности кожи, вырезанной для исследований, вокруг раны и струпа. Однако их общее количество было невелико по отношению ко всем клеткам исследуемых участков и за первые трое суток после трансплантации их прирост был мало заметен, поэтому для того, чтобы лучше увидеть разницу в заселении с течением времени, перед следующим исследованием был сделан 4-х-дневный перерыв. В то же время в коже без раны с поясничной области этих животных светящихся клеток обнаружено не было.

Спустя 1 нед после трансплантации количество донорских клеток в коже вокруг раны и струпе увеличивалось многократно. На дне раны имелись участки с целыми «вихрями» фибробластов (**рис. 1, а**). Между струпом и краем кожи образовывался вал, содержащий множе-

Таблица

**Результаты детекции клеток донорского цельного КМ, несущих маркерный ген зеленого флуоресцентного белка EGFP, у мышей-реципиентов с резаной раной.**

Типы клеток	Локализация	Количество суток после трансплантации					
		1	2	3	7	11	14
Круглые недифференцированные	кожа вокруг раны	+	+++	+++	+++	+++	+++
	дно раны	+	+	++	+++	+++	+++
	кожа на пояснице (без раны)	-	-	-	-	+++	+++
Фибробласты	кожа вокруг раны	+	+	++	+++	+++	+++
	дно раны	-	+	++	+++	+++	+++
	кожа на пояснице (без раны)	-	-	-	+	++	-
Дифференцированные различных типов	кожа вокруг раны	-	-	-	+	+	+++
	дно раны	-	-	-	+	+	+++
	кожа на пояснице (без раны)	-	-	-	-	-	+++

**Примечание.** Условные обозначения: - отсутствие клеток в поле зрения; + – единичные клетки в поле зрения; ++ – десятки клеток в поле зрения; +++ – сотни клеток в поле зрения.

ство светящихся клеток. В наружной части края кожи и струпа наблюдалось диффузное зелёное свечение, что говорило о заселении всей толщи этих участков. При этом в срезах неповреждённой кожи с поясницы флуоресцирующие клетки присутствовали в незначительных количествах (рис. 1, б). В период с 7-х по 11-е сут после трансплантации происходило экспоненциальное размножение донорских клеток, в результате которого различие в степени заселения ими раны и кожи на пояснице оказалось почти стёрто. В обеих зонах имелось множество клеток, однако на пояснице наблюдалось некоторое преобладание круглых недифференцированных клеток, а в области раны — фибробластов.

Через 2 нед после трансплантации заселение повреждённой и неповреждённой зон круглыми донорскими клетками ещё усилилось, но в неповреждённой зоне флуоресцирующие фибробласты обнаружены не были, в то время как на дне раны наблюдались множество таких клеток. В обеих зонах появились стержни волос, содержащие клетки донора, а вокруг раны — адипоциты. Через 3 нед после трансплантации раны почти затянулись; но если в повреждённой зоне преобладали фибробласты, причём сильно разветвлённые (рис. 1, в), то в неповреждённой — круглые клетки. Кроме того, в зоне раны наблюдались закладка флуоресцирующих потовых желёз (рис. 1, г) и наличие большого количества адипоцитов с EGFP. Через 28 сут после трансплантации в обеих зонах к этому прибавились флуоресцирующие миофибробласты (рис. 1, д) и кератиноциты. Донорские клетки появились в составе стенок кровеносных сосудов реципиентов (рис. 1, е). Зона раны заросла шерстью и стала незаметной. Через 35 сут наблюдалось массивное заселение кожи реципиентов флуоресцирующими клетками. Однако в неповреждённой коже концентрация круглых клеток и фибробластов была приблизительно в 5 раз ниже, чем в зоне раны.

У облучённых мышей без травмы через неделю после трансплантации и в межлопаточной, и в поясничной зонах наблюдались только единичные флуоресцирующие клетки (круглые и фибробласты), с типом заселения, схожим с тем, который был в коже без раны на пояснице травмированных мышей. Лишь к 11-м сут у животных без травмы заселение кожи донорскими клетками стало сравнимым с таковым у травмированных, но количество фибробластов было на порядок ниже, чем в области раны. Таким образом, скорость и характер заселения у нетравмированных животных отличались от тех, которые наблюдались у травмированных. Донорские клетки даже через 50 сут после трансплантации детектировались в коже этих животных, причём

давали такое мощное диффузное свечение, что со стороны волос с трудом можно было рассмотреть отдельные кератиноциты.

### Обсуждение

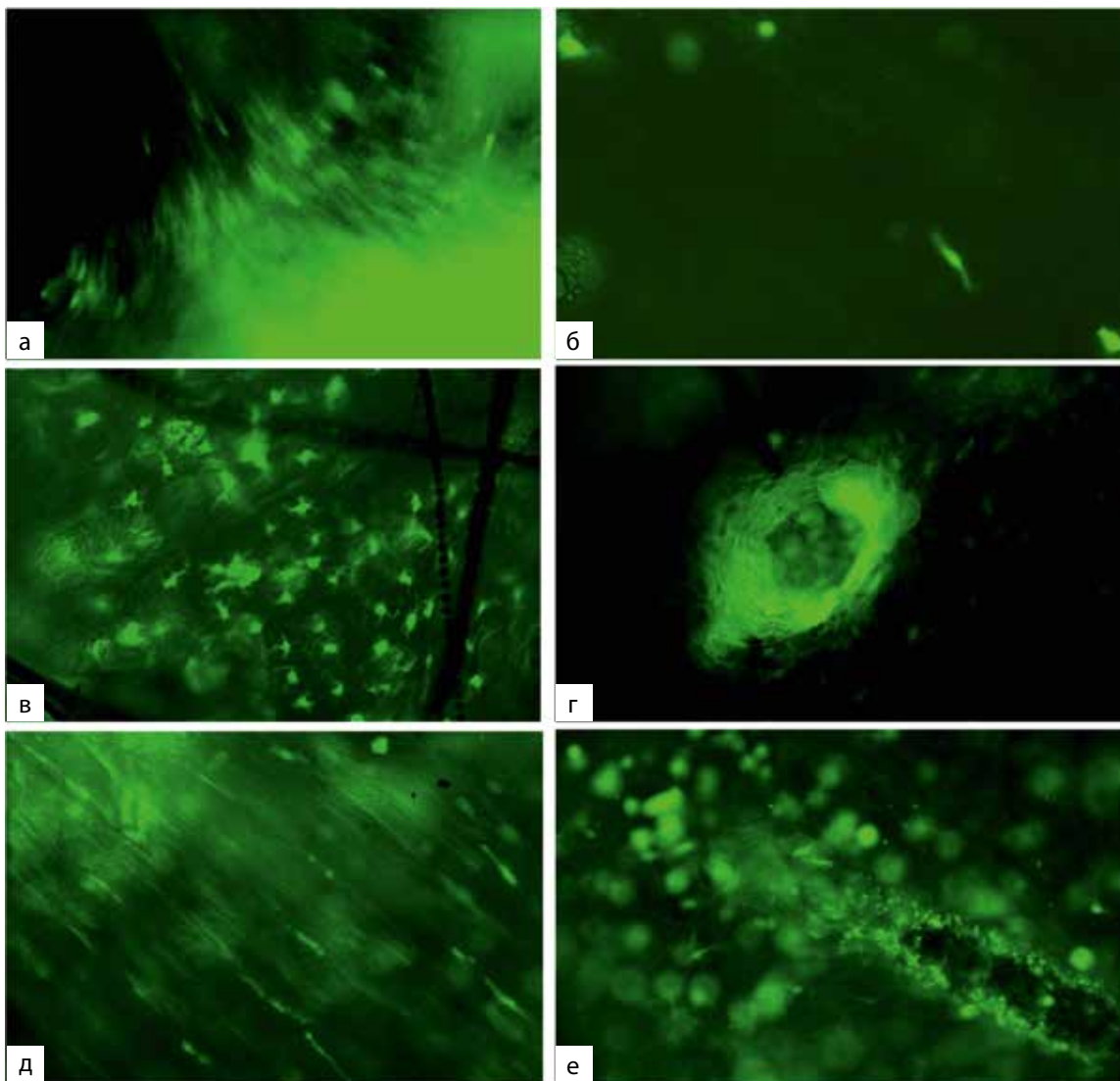
Работ по поиску возможностей использования цельного КМ для заместительной терапии как средства неотложной помощи при больших потерях кожи, которая может привести к инвалидности или даже смерти, практически нет. В ряде работ для восстановления кожи после травм (ожогов) и радиационного поражения предлагается использование культивированных *in vitro* мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток [5, 7-10]. Однако цельный костный мозг естественным образом содержит такие клетки, и его использование без разделения на фракции и культивирование могло бы стать экономичной альтернативой при оказании неотложной помощи. Для культивирования необходимо несколько дней, а такие материалы, как биодеградируемые мембраны «ЭластоПОБ» [7], коллагеновый гель с фибробластами или пласт кератиноцитов [9], возможно наносить только на очищенную от некротизированных тканей поверхность, а не в глубь раны, т.е. её зарастание невозможно в нормальном порядке — снизу вверх, и идет с потерей времени.

Тот факт, что в нашей работе уже через 1 сут после трансплантации количество донорских клеток в тканях раны сравнимо с их количеством в селезёнке, может означать, что этот орган кроветворения привлекает донорские клетки только незначительно сильнее, чем свежая рана. Вероятно, ткани раны выделяют цитокины, обладающие способностью привлекать донорские клетки в места повреждения. Поскольку установлено, что при наличии воспалительного процесса или ультрафиолетового облучения в коже синтезируются хемокины, способные привлечь к месту действия лейкоциты хозяина или предшественники клеток Лангерганса донора соответственно [11, 12], такое объяснение кажется вполне допустимым. В то же время оно противоречит утверждениям, что именно введение МССК может привлекать ранних эндотелиальных предшественников из кровяного русла и КМ хозяина благодаря выделяемым МССК цитокинам, ростовым факторам и хемоаттрактантам [5].

Присутствие донорских клеток в организме реципиентов уже через сутки после их введения, наблюдаемое в нашей работе, подтверждает данные об их обнаружении через такой же срок в мозге смертельно облучённых мышей [13]. Известны даже данные, что МССК могут обнаруживаться у реципиентов уже через 1 ч после внутривенного введения, причём без

применения облучения [14]. Массированное заселение донорскими клетками раны уже через 7 сут после их трансплантации и формирование за их счёт сначала адипоцитов и стержней волос, а затем потовых желёз, миофибробластов, кератиноцитов и даже стенок кровеносных сосудов говорит о высоком потенциале использования цельного КМ для неотложной заме-

стительной терапии, сопряжённом с относительной дешёвизной метода по сравнению с культивированием МССК. Полученные нами данные сравнимы с данными по трансплантации культивированных МССК в область вокруг ожоговых ран у мышей с индуцированным диабетом, которые вызывали развитие в них



**Рис. 1.** Заселение кожи реципиента с резаной раной спины клетками EGFP<sup>+</sup>-донора:

- а – 1 нед после трансплантации – вихри фибробластов на дне раны;
  - б – 1 нед после трансплантации – кожа с пояса;
  - в – 3 нед после трансплантации – сильно разветвлённые фибробласты на месте заживления раны;
  - г – 3 нед после трансплантации – потовая желёза в восстановленном слое кожи;
  - д – 4 нед после трансплантации – миофибробласты;
  - е – 3 нед после трансплантации – кровеносные сосуды.
- а, б, в, д – ув. × 100, г, е – ув. × 200.

грануляционной ткани, формирование волосяных фолликулов и эпителизацию [5].

Кроме того, заселение ран донорскими клетками было устойчивым и наблюдалось нами в течение 5 нед (а заселение нетравмированной кожи — 50 сут). Принимая во внимание работы, в которых наблюдается заселение донорскими EGFP-клетками цельного костного мозга ряда органов и пожизненный устойчивый химеризм реципиентов [15], можно предположить, что эти клетки могут выполнять свою функцию до тех пор, пока она необходима организму. Работы, в которых заселение свежeweделенными МССК таких органов необлучённых животных, как тимус [16] и поджелудочная железа [14], продолжалось по меньшей мере 1 месяц, подтверждают такую возможность.

### Выводы

1. Стволовые клетки цельного костного мозга способны активно заселять участок раны, начиная с первых суток после трансплантации.

2. Массовое заселение раны донорскими клетками происходит уже через 7 сут после трансплантации, что даёт быстрое заживление как с её краёв, так и с дна, т.е. осуществляется максимально естественным образом.

3. Первоочередное заселение раны, сравнимое с заселением такого кроветворного органа, как селезёнка, говорит о наличии механизмов привлечения к ней стволовых клеток донорского КМ, участвующих в заживлении.

### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Богданенко Елена Валентиновна

Сбор и обработка материала — Богданенко Елена Валентиновна, Сергиевич Лариса Анатольевна, Лизунова Ирина Анатольевна, Карнауов Алексей Валерьевич

Статистическая обработка — Богданенко Елена Валентиновна, Сергиевич Лариса Анатольевна

Написание текста — Богданенко Елена Валентиновна, Сергиевич Лариса Анатольевна, Карнауов Алексей Валерьевич, Карнауова Наталья Алексеевна, Карнауов Валерий Николаевич

### Литература

- Карнауов А.В., Карнауова Е.В., Сергиевич Л.А., Карнауова Н.А., Богданенко Е.В., Смирнов А.А. и др. Информационная теория старения: изучение влияния трансплантации костного мозга на продолжительность жизни мышей. *Биофизика*. 2014; 59(4): 790–5.
- Богданенко Е.В., Карнауов А.В., Карнауова Е.В., Сергиевич Л.А., Карнауова Н.А., Манохина И.А. и др. Изучение возможностей клеточной терапии для продления женской половой

функции в модельных экспериментах на мышах. *Патогенез*. 2015; 3: 13–7.

- Rasulov M.F., Vasilchenkov A.V., Onishchenko N.A., Krashennnikov M.E., Kravchenko V.I., Gorshenin T.L. et al. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2005; 1: 141–4.
- Зорин В.Л., Зорина А.И., Еремин И.И., Бозо И.Я., Соловьёва Е.В., Хромова Н.В. и др. Сравнительный анализ остеогенного потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток слизистой оболочки полости рта и костного мозга. *Гены и Клетки*. 2014; 9(1): 50–7.
- Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Миллер Т.В., Повещенко А.Ф., Суровцева М.А. и др. Перспективность использования клеточного продукта для терапии кожных дефектов при сахарном диабете. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2017; 3: 175–7.
- Максимова Н.В., Лյондуп А.В., Крашенинников М.Е., Помыткин И.А., Гадаев И.Ю., Мельниченко Г.А. Клинические случаи применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в лечении язв при синдроме диабетической стопы нейропатической формы. В кн: *Сахарный диабет: макро- и микрососудистые осложнения. Сборник тезисов II Всероссийской конференции с международным участием*. 2017: 51.
- Мороз Б.Б., Онищенко Н.А., Лебедев В.Г., Дешевой Ю.Б., Сидорович Г.И., Лыршикова А.В. и др. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на течение местных лучевых поражений у крыс после локального  $\beta$ -облучения. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2009; 49(6): 688–93.
- Расулов М.Ф., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Зайденов В.А., Зорин В.Л., Богатырев С.Р. Фибробластоподобные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга подобно эмбриональным фибробластам стимулируют заживление поверхностных ожоговых ран. *Вестн. транспл. и искусств. органов*. 2003; 3: 46–9.
- Мельникова Е.В., Меркулова О.В., Борисевич И.В., Меркулов В.А. От клеточных технологий к биомедицинским клеточным продуктам: опыт использования препаратов на основе жизнеспособных клеток человека в Российской Федерации. *Цитология*. 2018. 60(4): 231–40.
- Котенко К.В., Мороз Б.Б., Надежина Н.М., Галстян И.А., Онищенко Н.А., Еремин И.И., Дешевой Ю.Б., Лебедев В.Г. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при лечении лучевых поражений кожи. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2011; 55(1): 20–6.
- Katou F., Ohtani H., Nakayama T., Ono K., Matsushima K., Saaristo A. et al. Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and CCR4 are involved in the formation of T lymphocyte-dendritic cell clusters in human inflamed skin and secondary lymphoid tissue. *Am. J. Pathol.* 2001; 158: 1263–70.
- Dieu-Nosjean M.C., Massacrier C., Homey B., Vanberliet V., Pin J.J., Vicari A. et al. Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 705–18.
- Hess D.C., Abe T., Hill W.D., Studdard A.M., Carothers J., Masuya M. et al. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Experimental Neurology*. 2004; 186: 134–44.
- Миллер Т.В., Повещенко А.Ф., Лыков А.П., Повещенко О.В., Бондаренко Н.А., Петровская И.Ф. и др. Сравнительный анализ миграционной активности популяций клеток костного мозга в лимфоидные и нелимфоидные органы в норме и на моде-

- ли сахарного диабета. *Современные проблемы науки и образования*. 2016; 2: 137-143.
15. Сергиевич Л.А., Карнаухова Е.В., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Богданенко Е.В., Лизунова И.А. и др. Влияние криоконсервирования клеток костного мозга мышшей-доноров, несущих ген *egfp*, на продолжительность жизни мышшей при сингенной трансплантации. *Биофизика*. 2018; 63(3): 517–27.
  16. Porritt H.E., Gordon K., Petrie H.T. Kinetics of Steady-state Differentiation and Mapping of Intrathymic-signaling Environments by Stem Cell Transplantation in Nonirradiated Mice. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 6957–62
  7. Moroz B.B., Onischenko N.A., Lebedev V.G., Deshevoy Yu.B., Sidorovich G.I., Lirshikova A.V. et al. The influence of multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow on process of local radiation injury in rats after local  $\beta$ -irradiation. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2009; 49(6): 688–93 (in Russian)
  8. Rasulov M.F., Onischenko N.A., Krashennnikov M.E., Zaidenov V.A., Zorin V.L., Bogatirev S.R. Both embryonic fibroblasts and fibroblast-like mesenchymal bone marrow stem cells stimulate the regeneration of superficial burn wounds. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2003; 3: 46–9. (in Russian)
  9. Melnikova E.V., Merkulova O.V., Borisevich I.V., Merkulov V.A. From cellular technologies to biomedical cell products: practice in the use of drugs based on viable human cells in the Russian Federation. *Cytologiya*. 2018. 60(4): 231–40. (in Russian)
  10. Kotenko K.V., Moroz B.B., Nadezhina N.M., Galstyan I.A., Onischenko N.A., Eremin I.I. Mesenchymal stem cells transplantation in the treatment of radiation skin lesions. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2011; 55(1): 20–6. (in Russian)
  11. Katou F., Ohtani H., Nakayama T., Ono K., Matsushima K., Saaristo A. et al. Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and CCR4 are involved in the formation of T lymphocyte-dendritic cell clusters in human inflamed skin and secondary lymphoid tissue. *Am. J. Pathol.* 2001; 158: 1263–70.
  12. Dieu-Nosjean M.C., Massacrier C., Homey B., Vanbervliet B., Pin J.J., Vicari A. et al. Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 705–18.
  13. Hess D.C., Abe T., Hill W.D., Studdard A.M., Carothers J., Masuya M. et al. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Experimental Neurology*. 2004; 186: 134–44.
  14. Miller T.V., Poveshchenko A.F., Lykov A.P.I., Poveshchenko O.V., Bondarenko N.A., Petrovskaya I.F. et al. Comparative analysis of the migratory activity of populations of bone marrow cells in lymphoid and non-lymphoid organs in norm and in experimental models of diabetes. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; 2: 137-43. (in Russian)
  15. Serгиевич Л.А., Карнаухова Е.В., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Богданенко Е.В., Лизунова И.А., Карнаухов В.Н. A Study of the Regenerative potential of bone marrow cells of donor mice that carry the *egfp* gene in irradiated mice. *Biophysics*. 2018; 63(1): 84–92.
  16. Porritt H.E., Gordon K., Petrie H.T. Kinetics of Steady-state Differentiation and Mapping of Intrathymic-signaling Environments by Stem Cell Transplantation in Nonirradiated Mice. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 6957–62.

## References

1. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Serгиевич Л.А., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Smirnov A.A. et al. Information theory of ageing: Studying the effect of bone marrow transplantation on the life span of mice. *Biophysics*. 2014, 59(4): 646-50.
2. Bogdanenko E.V., Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Serгиевич Л.А., Karnaukhova N.A., Manokhina I.A. et al. Study of cell therapy possibilities for renewal of feminine sexual function on mouse model experiments. *Patogenez*. 2015; 3: 13-7. (in Russian)
3. Rasulov M.F., Vasilchenkov A.V., Onishchenko N.A., Krashennnikov M.E., Kravchenko V.I., Gorshenin T.L. et al. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Cell Technologies in Biology and Medicine*, 2005; 139(1): 141-4.
4. Zorin V.L., Zorina A.I., Eremin I.I., Bozo I.Y., Solovieva E.V., Hromova N.V. Comparative analysis of osteogenic potential of multipotent mesenchymal stromal cells derived from oral mucosa and bone marrow. *Geny i kletki*. 2014; 9(1): 50-7. (in Russian)
5. Lykov A.P., Bondarenko N.A., Poveshchenko O.V., Miller T.V., Poveshchenko A.F., Surovtseva M.A. et al. Prospect of using cell product for the therapy of skin defects in diabetes mellitus. *Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2017; 3: 266-8.
6. Maksimova N.V., Lyundup A.V., Krashennnikov M.Y., Pomytkin I.A., Gadayev I.Y., Mel'nicenko G.A. *Clinical cases of the use of autologous mesenchymal stem cells of the bone marrow in the treatment of ulcers in diabetic foot syndrome of a neuropathic form. In: Diabetes mellitus: macro- and microvascular complications. Collection of theses of the 2nd all-russian conference with international participation. [Klinicheskie sluchai primeneniya autologichnykh mezenkhimalnykh stvolovykh kletok kostnogo mozga v lechenii yazv pri sindrome diabeticheskoy stopyi neyropaticheskoy formy. V kn: Saharnyy diabet: makro- i mikrososudistyye oslozhneniya. Sbornik tezisov II Vserossiyskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem]*. 2017: 51. (in Russian)

## Сведения об авторах:

**Богданенко Елена Валентиновна**, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии, e-mail: lenabogdval@mail.ru;

**Сергиевич Лариса Анатольевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: larserg@mail.ru;

**Карнаухов Алексей Валерьевич**, канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. лаборатории микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: AlexeyKarnaukhov@yandex.ru;

**Карнаухова Наталья Алексеевна**, ст. науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: nakarnauhova@mail.ru;

**Лизунова Ирина Анатольевна**, мл. науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: Iri-man@mail.ru;

**Карнаухов Валерий Николаевич**, канд. биол. наук, зав. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: nakarnauhova@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.017.1

Логаткина А.В.<sup>1</sup>, Терехов И.В.<sup>1</sup>, Никифоров В.С.<sup>2</sup>, Бондарь С.С.<sup>1</sup>

## Взаимосвязи между продукцией тимозина 1α и состоянием внутриклеточных сигнальных механизмов в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови при артериальной гипертензии

<sup>1</sup>ФГОУ ВО «Тульский государственный университет» Минобрнауки России,

300012, г. Тула, Россия, просп. Ленина, д. 92;

<sup>2</sup>ФГОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России,

191015, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Кирочная, д. 41

**Цель** – изучение влияния тимозина 1 альфа на состояние внутриклеточных сигнальных механизмов, в частности, на состояние терминальных компонентов MAPK/SAPK и JAK/STAT-сигнальных путей в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови у пациентов с артериальной гипертензией. **Методика.** Методом иммуноферментного анализа в мононуклеарных клетках пациентов определяли уровень фосфорилирования факторов STAT5A, STAT6, ERK1/2, p38, а также содержание ядерного фактора транскрипции NF-κB. Взаимосвязи между исследованными факторами оценивали методом линейного регрессионного анализа. Критериями включения в исследование являлись: возраст 45–55 лет, информированное согласие на участие в исследовании, окружность талии более 80 см у женщин и более 94 см у мужчин, артериальная гипертензия (АД  $\geq$  140/90 мм рт. ст.), а также уровень С-реактивного белка в сыворотке крови, определяемого высокочувствительным методом, в пределах  $\geq$  2,5 и  $<$  5,0 мг/дл, отсутствие в течение предшествующих 3 мес госпитализации, острых бактериальных и вирусных инфекций. Критериями исключения из исследования являлись обострения воспалительных заболеваний внутренних органов, декомпенсация углеводного обмена, отказ от участия в исследовании. **Результаты.** Повышение сывороточной концентрации Tα1 ассоциируется с активацией в мононуклеарных клетках факторов STAT5A, STAT6, а также протеинкиназ ERK и p38 и ядерного фактора транскрипции NF-κB. Высокая концентрация Tα1 ассоциировалась с повышением активности ядерного фактора транскрипции NF-κB, STAT6 и ERK. На этом фоне повышенный уровень продукции Tα1 сопровождался усилением активности факторов STAT6, STAT5A, а также протеинкиназ ERK и p38, не влияя при этом на активность NF-κB. **Заключение.** В физиологических концентрациях (0,9–2,85 пг/мл) Tα1 является иммуномодулятором, регулирующим активность MAPK/SAPK и JAK/STAT сигнальных путей через изменение реактивности иммунокомпетентных клеток к сигналам цитокинов, факторов роста и гормонов, в том числе, лептину, инсулину, соматотропину, не обладая при этом прямым активирующим влиянием на продукцию цитокинов. Полученные результаты позволяют рассматривать Tα1 в качестве иммуностропного регулятора, потенциальные эффекты которого (иммуномодулирующие, либо противовоспалительные) определяются его концентрацией в сыворотке, способствуя либо ограничению, либо прогрессированию иммунометаболических нарушений, лежащих в основе патогенеза атеросклероза и артериальной гипертензии.

**Ключевые слова:** тимозин альфа-1; артериальная гипертензия; JAK/STAT, MAPK/SAPK; сигнальный путь.

**Для цитирования:** Логаткина А.В., Терехов И.В., Никифоров В.С., Бондарь С.С. Взаимосвязи между продукцией тимозина 1α и состоянием внутриклеточных сигнальных механизмов в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови при артериальной гипертензии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 39–46.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.39-46

**Для корреспонденции:** Терехов Игорь Владимирович, e-mail: trft@mail.ru

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

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

**Поступила** 10.11.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Logatkina A.V.<sup>1</sup>, Terekhov I.V.<sup>1</sup>, Nikiforov V.S.<sup>2</sup>, Bondar S.S.<sup>1</sup>

### Immunomodulating mechanisms of biological effect of thymosin 1α in arterial hypertension

<sup>1</sup>Tula State University, Prospekt Lenina 92, Tula 300012, Russia;<sup>2</sup>I.I. Mechnikov North-West State Medical University, Kirochnaya Str. 41, St. Petersburg 191015, Russia

**The aim** of this work was to study effects of thymosin 1 alpha on intracellular signaling mechanisms, specifically, the state of terminal components of MAPK/SAPK and JAK/STAT signaling pathways in peripheral blood mononuclear leukocytes of patients with arterial hypertension. **Methods.** The level of phosphorylation of factors STAT5A, STAT6, ERK1/2, and p38 and the content of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B were measured using the enzyme immunoassay. Relationship between the studied factors was assessed by the linear regression analysis. **Results.** The increase in serum Ta1 concentration was associated with activation of STAT5A and STAT6 as well as ERK and p38 protein kinases and the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B in mononuclear cells. A high concentration of Ta1 was associated with increased activity of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B, STAT6, and ERK. In this process, the increased production of Ta1 was associated with increased activity of STAT6 and STAT5A as well as ERK and p38 protein kinases but with unchanged activity of NF- $\kappa$ B. **Conclusion.** At physiological concentrations (0.9-2.85 pg/ml), Ta1 is an important immunomodulator that regulates activities of the MAPK/SAPK and JAK/STAT signaling pathways, thereby changing responses of immunocompetent cells to signals of cytokines, growth factors, and hormones, including leptin, insulin, and somatotropin without a direct activating effect on cytokine production by immunocompetent cells. The results of the study suggested that Ta1 is an immunomodulator potentially capable of correcting respective immunometabolic disorders in patients with hypertension.

**Keywords:** thymosin alpha1; arterial hypertension; immunocardiology; JAK/STAT; MAPK/SAPK signal pathway.

**For citation:** Logatkina A.V., Terekhov I.V., Nikiforov V.S., Bondar S.S. Immunomodulating mechanisms for biological effect of thymosin 1a in arterial hypertension. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 39-46. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.39-46

**For correspondence:** Igor V. Terekhov, Candidate of medical Sciences, Docent, «Tula State University of the Ministry of Education and Science of Russia»; 92 Lenin Str., Tula 300012, Russian Federation, e-mail: trft@mail.ru

**Information about authors:**

Logatkina A.V., <http://orcid.org/0000-0002-3397-136X>

Terekhov I.V., <http://orcid.org/0000-0002-6548-083X>

Nikiforov V.S., <http://orcid.org/0000-0001-7862-0937>

Khadartsev A.A., <http://orcid.org/0000-0002-6507-5877>

Bondar' S.S., <http://orcid.org/0000-0003-2749-8366>

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

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

**Received** 10.11.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

В настоящее время установлена важная роль состояния иммунной регуляции в развитии осложнений сердечно-сосудистой патологии. При этом поддержание провоспалительной активации иммунокомпетентных клеток, включая макрофаги и Т-лимфоциты, способствует поддержанию субклинического внутрисосудистого воспалительного процесса, ассоциирующегося с эндотелиальной дисфункцией, повышением его адгезивных свойств и снижением тромборезистентности [1-2]. Субклиническое воспаление, сохраняющееся после перенесенных острых инфекционно-воспалительных заболеваний, характеризуется существенными изменениями внутриклеточных сигнальных механизмов трансдукции рецепторных сигналов. Это может способствовать нарушению реакции клеток на различные внешние сигналы, в том числе, на сигналы, регулирующие клеточный метаболизм, что сопровождается длительной избыточной активацией иммунокомпетентных клеток (ИКК), требующей соответствующей

коррекции [3-6]. Активация Т-лимфоцитов определяет повышение продукции провоспалительных цитокинов, поддерживающих воспаление (ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-4, VEGF-A и др.) и процессы атерогенеза, а также усиливает действие гуморальных вазоконстрикторов, в том числе, ангиотензина-II [2, 5]. В свою очередь воспаление потенцирует эффекты симпатической нервной системы, способствуя прогрессированию артериальной гипертензии (АГ) [7]. При этом в регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов, играющих ключевую роль в формировании и поддержании адаптивного иммунного ответа, важную роль играют пептиды тимуса – тимозины, в их числе тимозин альфа 1 (Ta1). Известно так же положительное влияние Ta1 в отношении иммунной дисрегуляции, вызванной сепсисом, вирусными инфекциями, онкопатологией. При этом Ta1 модулирует механизмы иммунологической толерантности, стимулируя противовоспалительные и антипролиферативные процессы [8, 9]. Механизмы



биологических эффектов  $T\alpha 1$  определяются его влиянием на функциональную активность митоген-активируемого и стресс-активируемого сигнального пути (MAPK/SAPK), а также фактора транскрипции NF- $\kappa B$ , что сопровождается изменением клеточной реактивности в отношении внеклеточных сигналов разнообразной природы (цитокины, гормоны, ультрафиолетовое излучение и т. п.) [10, 11].

Таким образом, принимая участие в регуляции адаптивного иммунного ответа,  $T\alpha 1$  является фактором, способствующим межсистемной координации реакций саногенеза при различных состояниях, затрагивающих иммунную систему. Вместе с тем, несмотря на важную роль  $T\alpha 1$  в регуляции иммунного ответа, характер его влияния на иммунокомпетентные клетки у больных АГ, ассоциированной с субклиническим воспалительным процессом, исследован недостаточно.

Цель исследования – изучение влияния тимозина 1 альфа на состояние терминальных компонентов MAPK/SAPK и JAK/STAT-сигнальных путей в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови у пациентов с артериальной гипертензией.

### Методика

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

Обследованы 40 пациентов обоего пола с эссенциальной АГ I-II стадии с средним и высоким сердечно-сосудистым риском поступивших в клинику на плановое лечение. Возраст обследованных – 47-60 лет.

Все пациенты в период пребывания в клинике (в среднем  $13,0 \pm 2,0$  сут) получали гипотензивную терапию (лизиноприл, 10 мг, однократно утром), диуретики (индапамид-ретард, 1,5 мг однократно утром), аторвастатин (10 мг, однократно ежедневно). Назначенная при поступлении в стационар лекарственная терапия (средне-терапевтические дозы) за период стационарного лечения не корректировалась, побочных эффектов за период пребывания в стационаре отмечено не было.

Критериями включения в исследование являлись: возраст, информированное согласие на участие в исследовании, окружность талии более 80 см у женщин и более 94 см у мужчин, артериальная гипертензия (АД  $\geq 140/90$  мм рт. ст.), уровень С-реактивного белка в сыворотке крови, определяемого высокочувствительным методом, в пределах  $\geq 2,5$  и  $< 5,0$  мг/дл, отсутствие в течение 3 мес предшествующих госпитализации острых бактериальных и вирусных инфекций.

Критериями исключения из исследования являлись обострения воспалительных заболеваний внутренних органов, декомпенсация углеводного обмена, отказ от участия в исследовании.

Материалом для исследования служила венозная кровь, забираемая в утренние часы в первые 3 сут стационарного лечения. Для определения уровня внутриклеточных маркеров 1 мл цельной крови вносили в флакон, содержащий 4 мл среды DMEM, гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (0,6 мг/мл) с последующим выделением на градиенте фикоколл-верографина ( $\rho = 1,077$ ) мононуклеарных клеток (МНК) и приготовлением лизатов, для чего использовали 1 мл клеточной суспензии содержащей  $0,5 \times 10^6$  МНК. Выделенные МНК дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере, после чего лизировали, используя буфер следующего состава: 10 mM Tris, pH 7,4; 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM  $Na_4P_2O_7$ , 2 mM  $Na_3VO_4$ , 1% Triton X-100, 10% глицерола, 0,1% SDS, 0,5% деоксихолата, 1 mM PMSF (матричный 0,3 M раствор в DMSO). В лизирующий раствор добавляли (ex tempore) 1% коктейля ингибитора протеаз («Sigma-Aldrich», США), выдерживали на льду (при  $t = +4-5$  °C) в течение 15 мин. Ядерно-цитоплазматические лизаты центрифугировали в течение 10 мин при 15 000 об/мин, с последующим аликвотированием и замораживанием при  $-76$  °C.

Подсчет и анализ жизнеспособности клеток осуществляли с помощью счетчика TC20 (Bio-Rad, США). Жизнеспособность клеток подготовленных культур составляла не менее 90%.

В приготовленных ядерно-цитоплазматических лизатах методом иммуноферментного анализа (ИФА) оценивали концентрацию (нг/мл) ядерного фактора транскрипции NF- $\kappa B$ . Также в лизатах определяли степень фосфорилирования сигнального трансдуктора и активации транскрипции – STAT5A по тирозину в положении 694, STAT6 по тирозину в положении 641, уровень дважды фосфорилированной по треонину/тирозину в положении 180/182 формы митоген-активируемой протеинкиназы p38 $\alpha$ , а также протеинкиназы ERK изоформ 1 и 2 фосфорилированной по тирозину/треонину в положении 202/204 (ERK). Концентрацию тимозина 1 $\alpha$  в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием реактивов производства Cloud Clone (США). Используемый набор реагентов характеризовался чувствительностью определения 0,061 нг/мл в диапазоне концентраций от 0,61 до 10 нг/мл. При проведении ИФА использовали наборы реактивов Cusabio Biotech (КНР). Анализ проводили на анализаторе Personal LAB (Adaltis Italia S.p.A., Италия).

При статистической обработке данных использовали программы Statistica 7.0 (StatSoft, США). Результаты исследования представляли в виде среднего значения ( $\bar{x}$ ), 25 и 75 перцентилей и медианы (Me) выборки. Сравнение выборочных средних производили с помощью U-критерия Манна-Уитни. Исследование взаимосвязей изучаемых факторов проводили методом линейного корреляционного анализа.

**Результаты**

Исследование содержания в сыворотке тимозина альфа-1 показало, что среднее значение концентрации данного фактора у обследованных составляет 1,82 нг/мл. Уровень, соответствующий квартилям выборочной совокупности, составил 1,17 и 2,44 нг/мл, при величине медианы выборки 1,7 нг/мл. Таким образом, результаты анализа позволили сформировать 2 группы пациентов: с условно низким (подгруппа 1) и высоким (подгруппа 2) уровнем концентрации тимозина 1 $\alpha$  в образцах крови. При этом в 1-ю подгруппу ( $n=16$ ) были включены образцы сыворотки пациентов с концентрацией в них исследуемого фактора 1,7 нг/мл и менее, во 2-ю ( $n=24$ ) – образцы с уровнем фосфорилирования 1,7 нг/мл и более. Содержание

исследованных факторов в подгруппах представлено в **табл. 1**.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что повышение сывороточной концентрации T $\alpha$ 1 в 2,08 раза ( $p < 0,00001$ ) ассоциируется со статистически значимым повышением в МНК уровня фосфорилирования STAT5A на 38,9% ( $p = 0,00001$ ), STAT6 на 40,5% ( $p = 0,00001$ ), ERK на 47,5% ( $p = 0,00003$ ), p38 на 81,3% ( $p = 0,00001$ ). На этом фоне отмечено повышение содержания ядерного фактора транскрипции NF- $\kappa$ B на 15,5% ( $p = 0,006$ ). Таким образом, повышенный сывороточный уровень T $\alpha$ 1 ассоциирован с усилением активности в МНК факторов STAT5/6, а также протеинкиназ ERK и p38. Кроме этого повышение продукции T $\alpha$ 1 сопровождающееся повышением содержания в клетке фактора транскрипции NF- $\kappa$ B, может являться одним из механизмов влияния тимозина на трансдукцию рецепторных сигналов и чувствительность ИКК к внеклеточным сигналам, в том числе, цитокиновой природы, определяющим его биологические эффекты.

С учетом значимости выявленных различий, в соответствии с целью исследования был проведен анализ взаимосвязи исследуемых показателей в зависи-

Таблица 1

**Активность внутриклеточных сигнальных путей, протеинкиназ ERK, p38 и NF- $\kappa$ B в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови пациентов с АГ**

Фактор	Подгруппа 1		Подгруппа 2	
	$\bar{x}$	Me [25; 75]	$\bar{x}$	Me [25; 75] %
STAT6, ед/нг	3,85	3,61 [3,0; 4,29]	5,41	5,44 [5,37; 6,2]
STAT5A, ед/нг	2,76	2,51 [2,20; 3,0]	3,84	4,08 [3,03; 4,24]
ERK, ед/нг	2,83	2,60 [2,24; 3,37]	4,18	4,36 [3,95; 4,88]
p38, ед/нг	0,3	0,31 [0,24; 0,35]	0,54	0,53 [0,36; 0,65]
NF- $\kappa$ B, нг/мл	2,27	2,36 [1,74; 2,63]	2,62	2,71 [2,23; 3,02]
T $\alpha$ 1, нг/мл	1,18	1,17 [0,97; 1,46]	2,46	2,45 [1,96; 2,85]

Таблица 2

**Взаимосвязь исследуемых показателей в подгруппе с низким уровнем T $\alpha$ 1**

$r$	T $\alpha$ 1	STAT6	STAT5A	ERK	p38	NF- $\kappa$ B
T $\alpha$ 1	-	0,39	-0,39	0,42	0,11	-0,7
STAT6	0,39	-	-0,16	0,25	-0,08	-0,35
STAT5A	-0,39	-0,16	-	-0,25	-0,25	0,27
ERK	0,42	0,25	-0,25	-	0,37	-0,64
p38	0,11	-0,08	-0,25	0,37	-	-0,01
NF- $\kappa$ B	-0,7	-0,35	0,27	-0,64	-0,01	-

Взаимосвязь исследуемых показателей в подгруппе с высоким уровнем  $T\alpha 1$ 

<i>r</i>	$T\alpha 1$	STAT6	STAT5A	ERK	p38	NF- $\kappa$ B
$T\alpha 1$	-	0,81	0,7	0,65	0,52	0,03
STAT6	0,81	-	0,66	0,67	0,39	-0,02
STAT5A	0,7	0,66	-	0,63	0,33	0,12
ERK	0,65	0,67	0,63	-	0,76	-0,25
p38	0,52	0,39	0,33	0,76	-	-0,09
NF- $\kappa$ B	0,03	-0,02	0,12	-0,25	-0,09	-

мости от уровня в сыворотке  $T\alpha 1$ . Результаты анализа представлены в табл. 2 и 3.

Проведенный корреляционный анализ в группе с низким уровнем исследованного фактора, свидетельствует о наличии сильной отрицательной взаимосвязи  $T\alpha 1$  с содержанием в МНК фактора транскрипции NF- $\kappa$ B, а также умеренной отрицательной корреляции с активностью STAT5A. На этом фоне имела место умеренная положительная взаимосвязь активности STAT6 и ERK с уровнем  $T\alpha 1$ . Кроме этого проведенный анализ выявил сильную отрицательную взаимосвязь NF- $\kappa$ B с активностью протеинкиназы ERK, а также умеренную отрицательную – с уровнем фосфорилирования фактора STAT6.

В группе с высоким уровнем исследованного фактора, отмечается сильная положительная взаимосвязь активности STAT6 и STAT5A. Умеренная положительная взаимосвязь выявляется между содержанием  $T\alpha 1$  и активностью протеинкиназ ERK и p38. Так же проведенный анализ свидетельствует об умеренной положительной взаимосвязи STAT6 с активностью STAT5A и ERK, а также активности протеинкиназы ERK с уровнем фосфорилирования STAT6. Кроме этого, следует отметить сильную положительную взаимосвязь активности протеинкиназ p38 и ERK в группе с высокой продукцией  $T\alpha 1$ . На этом фоне выявлен независимый характер изменений  $T\alpha 1$  и содержания в МНК фактора NF- $\kappa$ B. Таким образом,  $T\alpha 1$  способствует сопряжению и синхронизации функциональной активности MAPK/SAPK- и JAK/STAT-сигнального пути, наблюдающейся на фоне ослабления связей между рассмотренными сигнальными путями и фактором транскрипции NF- $\kappa$ B.

### Обсуждение

Результаты исследований свидетельствуют о выраженном влиянии  $T\alpha 1$  на иммунокомпетентные клетки. Так, при концентрации данного фактора 100 нг/мл

показано стимулирующее влияние на активность в макрофагах протеинкиназы JNK [10]. Введение рекомбинантного  $T\alpha 1$  в дозе 30 нг/кг в модели липополисахарид-индуцированного повреждения печени способствует ограничению апоптоза и уменьшению воспаления за счет снижения продукции ФНО $\alpha$ , стимуляции продукции ИЛ-10 и фактора BCL2 [11]. Кроме того,  $T\alpha 1$  стимулирует активность сигнального трансдуктора и активатора транскрипции STAT6 [10]. Указанные механизмы определяют в целом иммуномодулирующий характер формирующихся биологических эффектов при использовании сравнительно высоких доз экзогенного  $T\alpha 1$ .

В настоящем исследовании оценивалось влияние эндогенных (физиологических) концентраций  $T\alpha 1$  в крови, результаты которого также свидетельствуют о выраженных сдвигах внутриклеточных биохимических процессов при изменении его уровня. При этом развитие эффектов при изменении продукции эндогенного  $T\alpha 1$ , достигается при концентрациях на порядок меньших, чем отмечено в исследованиях с введением рекомбинантного препарата.

Вместе с тем, проведенный анализ показал, что повышение продукции исследуемого фактора не просто сопровождается повышением активности внутриклеточных сигнальных путей, но также проявляется существенным изменением характера имеющихся между ними взаимосвязей. Наиболее тесной ассоциацией с уровнем  $T\alpha 1$  характеризуется активность STAT6, определяющая чувствительность клеток к ИЛ-4, ИЛ-13, а также лептину [12]. Помимо этого, активация STAT6 определяет стимуляцию экспрессии генов гамма рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (PPAR $\gamma$ ), контролирующими метаболические процессы в клетках. Таким образом, изменение активности фактора STAT6 определяет формирование модулирующих эффектов  $T\alpha 1$  не только в отношении иммунных процессов, но также и процессов обмена

глюкозы и жирных кислот, включая регуляцию чувствительности клеток к инсулину, лептину и соматотропину [13, 14]. При этом повышение активности под влиянием  $T\alpha 1$  фактора STAT5A, определяет усиление реактивности ИКК в отношении нейроэндокринных стимулов, в том числе, опосредованных гипоталамо-гипофизарной осью [15].

В аспекте межсистемных взаимосвязей, следует отметить изменение характера взаимосвязи активности STAT5A и ERK, которая со слабой отрицательной, под влиянием  $T\alpha 1$  изменяется на умеренную положительную, что, очевидно, отражает усиление пролиферативной активности ИКК под воздействием изучаемого фактора. Кроме того, имеет место усиление внутрисистемных взаимосвязей, в частности, между терминальными протеинкиназами MAPK/SAPK-сигнального пути — p38 и ERK, что свидетельствует об усилении сопряжения сигнальной трансдукции и повышении чувствительности ИКК к цитокинам и факторам роста, в том числе, VEGF-A [16].

Вместе с тем следует отметить, что высокий уровень исследуемого фактора, очевидно связанный с повышением его продукции, не способствует прямой активации ядерной транскрипции контролируемой NF- $\kappa$ B. Можно полагать, что  $T\alpha 1$  не обладает способностью к прямой стимуляции продукции провоспалительных, а также противовоспалительных цитокинов в физиологических концентрациях, регулируя при этом в большей мере реактивность чувствительных клеток к соответствующим экстраклеточным и внутриклеточным сигналам. Однако проведенный анализ выявил отрицательную взаимосвязь уровня  $T\alpha 1$  и NF- $\kappa$ B в диапазоне малых концентраций (0,97 до 1,46 пг/мл), при которых повышение концентрации  $T\alpha 1$  сопровождается пропорциональным снижением в МНК содержания данного фактора транскрипции. С учетом роли фактора в иммунной регуляции можно предполагать стимуляцию формирования противовоспалительного фенотипа ИКК. Отмечающаяся при этом отрицательная корреляция  $T\alpha 1$  с активностью STAT5A, свидетельствует об ограничении чувствительности ИКК к таким цитокинам, как ИЛ-2, поддерживающим пролиферацию антиген-активированных Т-лимфоцитов, а также ИЛ-3, ИЛ-7 и тромбopoэтина контролирующими процессы гемопоэза.

Регулируя таким образом чувствительность ИКК, а также других типов клеток, в первую очередь, эндотелиоцитов,  $T\alpha 1$  оказывает значимое влияние на состояние механизмов контроля артериального давления, в том числе, чувствительность клеток к АТ-II и

другим компонентам ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [6, 17, 18]. При этом полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о том, что эффективность терапевтических стратегий при использовании  $T\alpha 1$  будет определяться исходной продукцией данного фактора. Иммуносупрессия и ограничение чувствительности клеток к компонентам РААС, могут быть достигнуты при повышении продукции  $T\alpha 1$  до уровня 1,7 пг/мл, после чего следует ожидать формирование иммуномодулирующих эффектов, связанных с усилением взаимосвязей между MAPK/SAPK и JAK/STAT сигнальными путями, без существенного влияния на NF- $\kappa$ B, но с активацией STAT6. Последнее определяет стимуляцию поляризации ИКК, в первую очередь макрофагов и Т-хелперов, в направлении провоспалительного и репаративного клеточного фенотипа [18-21].

Таким образом, результаты исследования показали, что влияя на состояние MAPK/SAPK и JAK/STAT сигнальных путей у больных с АГ,  $T\alpha 1$  выступает в качестве модулятора реактивности иммунокомпетентных клеток к сигналам цитокинов и факторов роста, а также регулятором метаболизма, обладая при этом различным влиянием на ядерный фактор транскрипции NF- $\kappa$ B, в зависимости от концентрации. Указанные обстоятельства позволяют рассматривать  $T\alpha 1$  в качестве иммуотропного регулятора, потенциальные эффекты которого (иммуномодулирующие, либо противовоспалительные) определяются его концентрацией в сыворотке. Это способствует либо ограничению, либо прогрессированию иммунометаболических нарушений, лежащих в основе патогенеза атеросклероза и АГ.

#### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Терехов И.В., Никифоров В.С.

Сбор и обработка материала — Логаткина А.В., Бондарь С.С.

Статистическая обработка — Логаткина А.В., Терехов И.В.

Написание текста — Логаткина А.В.

Редактирование — Терехов И.В.

#### Литература

1. Барсуков А.В., Сеидова А.Ю., Гордиенко А.В., Сергеев А.И., Лейчинский С.В. Гипертоническая болезнь и хроническая сердечная недостаточность с сохраненной сократительной способностью левого желудочка: фокус на гендер-специфические особенности провоспалительного статуса. *Артериальная гипертензия*. 2017; 23(5): 457-67. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2016-22-5-457-467>.

2. Стаценко М.Е., Деревянченко М.В. Роль системного воспаления в снижении эластичности магистральных артерий и прогрессировании эндотелиальной дисфункции у больных артериальной гипертензией в сочетании с ожирением, сахарным диабетом 2 типа. *Российский кардиологический журнал*. 2018; (4): 32-6. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2018-4-32-36>
3. Хадарцев А.А., Логаткина А.В., Терехов И.В., Бондарь С.С. Динамика проявлений метаболического синдрома у пациентов с артериальной гипертензией на фоне комплексного использования низкоинтенсивной микроволновой терапии. *Артериальная гипертензия*. 2018; 24(2): 206-16. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2018-24-2-206-216>.
4. Логаткина А.В., Никифоров В.С., Бондарь С.С., Терехов И.В. Воспалительные цитокины и сигнальные системы мононуклеарных клеток периферической крови при ишемической болезни сердца. *Клиническая медицина*. 2017; 95(3): 238-44.
5. Хадарцев А.А., Логаткина А.В., Терехов И.В., Бондарь С.С., Бондарь Н.В. Влияние ингибитора ангиотензинпревращающего фермента на концентрацию в плазме крови цитокинов и вазоактивных молекул у больных ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией. *Терапевтический архив*. 2017; 89(12): 97-102.
6. Voevodin A.A., Khadartsev A.A., Bondar S.S. The State of Intracellular Molecular Regulators during the Reconvalescence of Community-Acquired Pneumonia under the Influence of Microwaves at 1 GHz. *Integr Med Int*. 2017; 4: 171-80. doi:10.1159/000486240.
7. Satou R., Gonzalez-Villalobos R.A. JAK-STAT and the renin-angiotensin system: The role of the JAK-STAT pathway in blood pressure and intrarenal renin-angiotensin system regulation. *JAKSTAT*. 2012; 1(4): 250-6. doi: 10.4161/jkst.22729.
8. Ni C., Wu P., Wu X., Zhang T., Zhang T., Wang Z. et al. Thymosin alpha1 enhanced cytotoxicity of iNKT cells against colon cancer via upregulating CD1d expression. *Cancer Lett*. 2015; 356(2 Pt B): 579-88. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.002.
9. Pica F., Gaziano R., Casalnuovo I.A., Moroni G., Buè C., Limongi D. et al. Serum thymosin alpha 1 levels in normal and pathological conditions. *Expert Opin Biol Ther*. 2018; 18(sup1): 13-21. doi: 10.1080/14712598.2018.1474197.
10. Peng X., Zhang P., Wang X., Chan J., Zhu M., Jiang M. et al. Signaling pathways leading to the activation of IKK and MAPK by thymosin alpha1. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1112: 339-50.
11. Sodhi A., Paul S. Involvement of mitogen-activated protein kinases in the signal transduction pathway of bone marrow-derived macrophage activation in response to in vitro treatment with thymosin alpha 1. *Int Immunopharmacol*. 2002; 2(1): 47-58.
12. Yang X., Chen Y., Zhang J., Tang T., Kong Y., Ye F. et al. Thymosin alpha1 treatment reduces hepatic inflammation and inhibits hepatocyte apoptosis in rats with acute liver failure. *Exp Ther Med*. 2018; 15(4): 3231-8. doi: 10.3892/etm.2018.5843.
13. Daniel B., Nagy G., Horvath A. The IL-4/STAT6/PPARγ signaling axis is driving the expansion of the RXR heterodimer cistrome, providing complex ligand responsiveness in macrophages. *Nucleic Acids Research*. 2018; 46(9): 4425-39. doi:10.1093/nar/gky157.
14. Ricardo-Gonzalez R.R., Red Eagle A., Odegaard J.I. IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107(52): 22617-22. doi:10.1073/pnas.1009152108.
15. Ganeshan K., Chawla A. Metabolic Regulation of Immune Responses. *Annual review of immunology*. 2014; 32: 609-34. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120236.
16. Sehgal P.B., Yang Y.-M., Yuan H., Miller E.J. STAT5a/b contribute to sex bias in vascular disease: A neuroendocrine perspective. *JAK-STAT*. 2015; 4(3): 1-20. doi:10.1080/21623996.2015.1090658.
17. Almalki S.G., Agrawal D.K. ERK signaling is required for VEGF-A/VEGFR2-induced differentiation of porcine adipose-derived mesenchymal stem cells into endothelial cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017; 8: 113. doi:10.1186/s13287-017-0568-4.
18. Singh M.V., Chapleau M.W., Harwani S.C., Abboud F.M. The immune system and hypertension. *Immunol Res*. 2014; 59(1-3): 243-53. doi: 10.1007/s12026-014-8548-6.
19. Dai X., Hua L., Chen Y., Wang J., Li J., Wu F. et al. Mechanisms in hypertension and target organ damage: Is the role of the thymus key? (Review). *Int J Mol Med*. 2018; 42(1): 3-12. doi: 10.3892/ijmm.2018.3605.
20. Сахаров В.Н., Литвицкий П.Ф. Роль различных фенотипов макрофагов в развитии заболеваний человека. *Вестник РАМН*. 2015; 1: 26-31
21. Малышев И.Ю. Феномены и сигнальные механизмы репрограммирования макрофагов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 2: 99-111.

## References

1. Barsukov A.V., Seidova A.Yu., Gordienko A.V., Sergeev A.I., Leychinskiy S.V. Hypertension and chronic heart failure with preserved left ventricular contractility: focus on the gender-specific features of the pro-inflammatory status. *Arterial'naya gipertenziya*. 2017; 23(5): 457-67. (in Russian)
2. Statsenko M.E., Derevyanchenko M.V. The role of systemic inflammation in reducing the elasticity of the main arteries and the progression of endothelial dysfunction in patients with arterial hypertension in combination with obesity, type 2 diabetes. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2018; (4): 32-6. (in Russian)
3. Khadartsev A.A., Logatkina A.V., Terekhov I.V., Bondar' S.S. Dynamics of manifestations of the metabolic syndrome in patients with arterial hypertension against the background of the complex use of low-intensity microwave therapy. *Arterial'naya gipertenziya*. 2018; 24(2): 206-16. (in Russian)
4. Logatkina A.V., Nikiforov V.S., Bondar' S.S., Terekhov I.V. Inflammatory cytokines and signaling systems of peripheral blood mononuclear cells in coronary heart disease. *Klinicheskaya meditsina*. 2017; 95(3): 238-44. (in Russian)
5. Khadartsev A.A., Logatkina A.V., Terekhov I.V., Bondar' S.S., Bondar' N.V. Effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on plasma concentration of cytokines and vasoactive molecules in patients with coronary heart disease and arterial hypertension. *Tерапевтический архив*. 2017; 89(12): 97-102. (in Russian)
6. Voevodin A.A., Khadartsev A.A., Bondar S.S. The State of Intracellular Molecular Regulators during the Reconvalescence of Community-Acquired Pneumonia under the Influence of Microwaves at 1 GHz. *Integr Med Int*. 2017; 4: 171-80. doi: 10.1159/000486240.
7. Satou R., Gonzalez-Villalobos R.A. JAK-STAT and the renin-angiotensin system: The role of the JAK-STAT pathway in blood pressure and intrarenal renin-angiotensin system regulation. *JAKSTAT*. 2012; 1(4): 250-6. doi: 10.4161/jkst.22729.
8. Ni C., Wu P., Wu X., Zhang T., Zhang T., Wang Z. et al. Thymosin alpha1 enhanced cytotoxicity of iNKT cells against colon cancer via upregulating CD1d expression. *Cancer Lett*. 2015; 356(2 Pt B): 579-88. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.002.

9. Pica F., Gaziano R., Casalnuovo I.A., Moroni G., Buè C., Limongi D. et al. Serum thymosin alpha 1 levels in normal and pathological conditions. *Expert Opin Biol Ther.* 2018; 18(sup1): 13-21. doi: 10.1080/14712598.2018.1474197.
10. Peng X., Zhang P., Wang X., Chan J., Zhu M., Jiang M. et al. Signaling pathways leading to the activation of IKK and MAPK by thymosin alpha1. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1112: 339-50.
11. Sodhi A., Paul S. Involvement of mitogen-activated protein kinases in the signal transduction pathway of bone marrow-derived macrophage activation in response to in vitro treatment with thymosin alpha 1. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2(1): 47-58.
12. Yang X., Chen Y., Zhang J., Tang T., Kong Y., Ye F. et al. Thymosin  $\alpha$ 1 treatment reduces hepatic inflammation and inhibits hepatocyte apoptosis in rats with acute liver failure. *Exp Ther Med.* 2018; 15(4): 3231-8. doi: 10.3892/etm.2018.5843.
13. Daniel B., Nagy G., Horvath A. The IL-4/STAT6/PPAR $\gamma$  signaling axis is driving the expansion of the RXR heterodimer cistrome, providing complex ligand responsiveness in macrophages. *Nucleic Acids Research.* 2018; 46(9): 4425-39. doi:10.1093/nar/gky157.
14. Ricardo-Gonzalez R.R., Red Eagle A., Odegaard J.I. IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy.* 2010; 107(52): 22617-22. doi:10.1073/pnas.1009152108.
15. Ganeshan K., Chawla A. Metabolic Regulation of Immune Responses. *Annual review of immunology.* 2014; 32: 609-34. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120236.
16. Sehgal P.B., Yang Y.-M., Yuan H., Miller E.J. STAT5a/b contribute to sex bias in vascular disease: A neuroendocrine perspective. *JAK-STAT.* 2015; 4(3): 1-20. doi:10.1080/21623996.2015.1090658.
17. Almalki S.G., Agrawal D.K. ERK signaling is required for VEGF-A/VEGFR2-induced differentiation of porcine adipose-derived mesenchymal stem cells into endothelial cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 2017; 8: 113. doi:10.1186/s13287-017-0568-4.
18. Singh M.V., Chapleau M.W., Harwani S.C., Abboud F.M. The immune system and hypertension. *Immunol Res.* 2014; 59(1-3): 243-53. doi: 10.1007/s12026-014-8548-6.
19. Dai X., Hua L., Chen Y., Wang J., Li J., Wu F. et al. Mechanisms in hypertension and target organ damage: Is the role of the thymus key? (Review). *Int J Mol Med.* 2018; 42(1): 3-12. doi: 10.3892/ijmm.2018.3605.
20. Sakharov V.N., Litvitskiy P.F. Roles of different macrophage phenotypes in the pathogenesis of some human diseases. *Vestnik RAMN.* 2015; 1: 26-31. (in Russian)
21. Malyshev I.Yu. Phenomena and signaling mechanisms of macrophage reprogramming. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2015; 2: 99-111. (in Russian)

#### Сведения об авторах:

**Логаткина А.В.**, аспирант каф. внутренних болезней медицинского института Тульского государственного университета;  
**Терехов И.В.**, канд. мед. наук, доцент, каф. общей патологии медицинского института Тульского государственного университета;

**Бондарь С.С.**, аспирант каф. внутренних болезней медицинского института Тульского государственного университета;  
**Никифоров В.С.**, доктор мед. наук, проф., каф. функциональной диагностики Северо-западного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Тарасова М.В.<sup>1</sup>, Елистратова И.В.<sup>1,2</sup>, Иванченко О.Б.<sup>3</sup>, Волкова Е.Н.<sup>1</sup>, Морозов С.Г.<sup>1</sup>

## Активность фагоцитоза у больных атопическим дерматитом с подтвержденной контаминацией кожи дрожжами рода *Candida spp.*

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

<sup>2</sup>ФГКУЗ Главный военный клинический госпиталь Войск Национальной Гвардии Российской Федерации,  
Московская область, г. Балашиха, Россия, микрорайон Никольско-Архангельский, Вишняковское шоссе, вл. 101;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Высшая школа биотехнологии и пищевых производств,  
195251, г. Санкт-Петербург, Россия, Политехническая ул., д. 29

Фагоцитоз является неотъемлемой частью защиты организма от патогенов: его нарушения обуславливают развитие сопутствующих заболеваний и осложнений у больных атопическим дерматитом (АтД). **Цель** работы – оценка активности фагоцитоза у больных АтД с подтвержденной контаминацией кожи грибами рода *Candida* и определение экспрессии рецепторов нейтрофилов, необходимых для осуществления завершеного фагоцитоза. **Методика.** В исследовании приняли участие 70 больных АтД и 22 донора, все подписывали форму информированного согласия. Работа с кровью людей проводилась по международным правилам. Наличие контаминации микроскопическими грибами верифицировали методом полимера-цеппной реакции в реальном времени (ПЦР). Нейтрофилы периферической крови выделяли на градиенте Перколл в интерфазе между 81% и 70%, отмывали, переводили в полную среду и анализировали *ex vivo* на активность фагоцитоза с дрожжами *Candida tropicalis*. Клетки обрабатывали антителами к рецепторам, а также пропиридином иодидом, и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur. Статистическую обработку результатов проводили по программе ANOVA. **Результаты.** Было установлено нарушение фагоцитарной активности нейтрофилов у больных АтД с сопутствующим поражением кожи грибами, что коррелировало с тяжестью течения АтД и статистически значимо отличалось от показателей больных АтД, не контаминированных возбудителями микозов. Экспрессия рецепторов, ассоциированных с фагоцитозом, различалась у больных АтД в зависимости от наличия или отсутствия *Candida spp.* **Заключение.** Установлены нарушения фагоцитарной активности нейтрофилов у больных АтД с верифицированной контаминацией кожи *Candida spp.*, а также различия в экспрессии рецепторов фагоцитоза по сравнению с больными АтД без контаминации кожи дрожжами рода *Candida*.

**Ключевые слова:** атопический дерматит; *Candida spp.*; нейтрофилы; фагоцитоз.

**Для цитирования:** Тарасова М.В., Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Волкова Е.Н., Морозов С.Г. Активность фагоцитоза у больных атопическим дерматитом с подтвержденной контаминацией кожи дрожжами рода *Candida spp.* *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 47-53.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.47-53

**Для корреспонденции:** Морозов Сергей Георгиевич, e-mail: biopharm@list.ru.

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

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

**Поступила** 20.12.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Tarasova M.V.<sup>1</sup>, Elistratova I.V.<sup>1,2</sup>, Ivanchenko O.B.<sup>3</sup>, Volkova E.N.<sup>1</sup>, Morozov S.G.<sup>1</sup>

### Phagocytosis activity in patients with atopic dermatitis complicated by *Candida spp.* skin contamination

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

<sup>2</sup> Main Military Clinical Hospital of the National Guard Troops of the Russian Federation,  
Vishnyakovskoe Shosse 101, Nikol'sko-Archangelsky, Balashikha 143930;

<sup>3</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Graduate School of Biotechnology and Food Productions,  
Polytekhnikeskaya Str. 29, St. Petersburg 194021, Russian Federation

Phagocytosis is an integral part of the body defense against pathogens. Disturbance of phagocytosis results in development of concomitant diseases and complications in patients with atopic dermatitis (AD). The **aim** of this study was to measure the activity of phagocytosis in AD patients with fungal contamination of skin and to determine the expression of neutrophil receptors required

for completing phagocytosis. **Methods.** 70 patients with AD and 22 donors participated in this study and signed an informed consent form. All experiments were performed in compliance with international rules for work with human biological materials. The presence of fungi on the skin was verified using the polymerase chain reaction in real time (PCR). Peripheral blood neutrophils were isolated on the Percoll gradient in the interphase between 81% and 70%, washed, transferred to the complete medium, and analyzed *ex vivo* for phagocytosis activity using yeast *Candida tropicalis* as a model system. Neutrophils were stained with monoclonal antibodies to the phagocytosis receptor and propidium iodide for DNA visualization and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer. Statistical analysis was performed using ANOVA. **Results.** Impaired neutrophil phagocytic activity was found in AD patients with concomitant fungal contamination of the skin, which correlated with severity of AD and statistically significantly differed from that in AD patients without contamination with *Candida spp.* pathogens. The expression of phagocytosis-associated receptors varied in AD patients depending on the presence or absence of *Candida spp.* contaminants. **Conclusion.** Disordered neutrophil phagocytic activity was found in AD patients with verified *Candida spp.* contamination; the expression of phagocytosis receptors was different from that in AD patients without *Candida* contamination of the skin.

**Keywords:** atopic dermatitis; *Candida spp.*; neutrophils; phagocytosis; receptors.

**For citation:** Tarasova M.V., Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Volkova E.N., Morozov S.G. Phagocytosis activity in patients with atopic dermatitis complicated by *Candida spp.* skin contamination. *Pathologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya* (*Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal*). 2020; 64(1): 47-53. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.47-53

**For correspondence:** *Sergey G. Morozov*, Doctor of Medical Sciences, Professor, e-mail: biopharm@list.ru

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

**Acknowledgments.** The study has no sponsorships.

**Information about authors:**

Tarasova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3997-7025>

ID Scopus: 57189604819

Elistratova I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0393-4947>

ID Scopus: 57204894505

Ivanchenko O.B., <http://orcid.org/0000-0002-1311-1258>

ID Scopus: 7003976407

Morozov S.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5822-5729>

ID Scopus: 7102189628

**Received** 20.12.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

В патогенезе атопического дерматита (АтД) нейтрофилы играют значительную роль в связи с их участием в различных типах иммунного ответа и секрецией многочисленных биологически активных соединений [1, 2]. Фагоцитарная активность нейтрофилов определяет защиту кожи больных АтД от бактериальных и грибковых патогенов. Данные литературы указывают на неоднозначность результатов по изучению фагоцитоза у больных АтД – от резкого снижения активности до повышения фагоцитарной активности нейтрофилов. Однако отсутствует анализ активности фагоцитов у больных АтД с сопутствующей микозной патологией, особенно при контаминации кожи грибами рода *Candida*, которая оказывает влияние на локальный иммунный ответ и системные реакции организма [3, 4]. Известно, что при фагоцитозе дрожжей

*Candida* нейтрофилы используют 2 различных механизма: неопсонизированные дрожжи фагоцитируются благодаря сигналам от рецептора компонента комплемента CR3 и далее сигнального пути с участием фосфатидил-инозитол-3-киназы и белка CARD9 (caspase recruitment domain-containing protein 9). CARD9 - это адаптер, проводит сигналы активации NF- $\kappa$ B, формирует комплекс с белком Bcl10 (B cell lymphoma), проводит сигналы C-типа рецепторов лектина (CLRs - C-type lectin receptors) при антимикозном иммунном ответе. Для второго механизма характерен киллинг опсонизированных дрожжей за счет активации Fc $\gamma$  рецепторов и сигнального пути с участием протеин-киназы C (PKC). Для этого механизма необходимо участие реактивных метаболитов кислорода и NADPH оксидазы [5]. Также известно, что через 10



мин после контакта с *Candida albicans* активация нейтрофилов зависит от анафилотоксина C5a и C5A-зависимой экспрессии рецептора CD11b на поверхности нейтрофила. Однако через 60 мин после распознавания *Candida albicans* сигналы нейтрофила от C5a не зависят [6]. В активации нейтрофилов при фагоцитозе также играет роль белок RAS1 [7] и сигнальный путь рецептора CD23 с участием киназы JNK1 [8].

**Цель** работы – оценка активности фагоцитоза у больных АтД с подтвержденной контаминацией кожи грибами рода *Candida* и определение экспрессии рецепторов нейтрофилов, необходимых для осуществления завершеного фагоцитоза.

### Методика

В работе использован биологический материал 92 мужчин (18–34 лет) пациентов Главного военного клинического госпиталя войск национальной гвардии Российской Федерации, из которых 70 больных АтД и 22 донора. Активность процесса при АтД оценивали по индексу SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis index), который составлял от 15 до 50 единиц. Все испытуемые добровольно подписывали форму информированного согласия на анонимное участие в исследовании. Критерии исключения: острые вирусные и бактериальные инфекции, системные, аллергические, воспалительные и онкологические заболевания. Протокол исследования был утвержден этическим комитетом НИИОПП. Работа выполнена по международным правилам работы с биоматериалом людей.

Для определения контаминации кожи микроскопическими грибами с предплечья брали соскоб кожи в местах без видимого воспаления согласно правилам МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории». Все образцы были заморожены и затем одновременно проанализированы методом ПЦР в реальном времени с парами праймеров, синтезированными на основании соответствующих олигонуклеотидов патогенов (база данных GenBank database, <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>). Использовали методику для клинических исследований [9].

Кровь брали натошак из локтевой вены в вакутейнеры с ЭДТА, разводили в фосфатном буфере (PBS) и центрифугировали на градиенте Перколла (Percoll, Sigma-Aldrich, USA) для выделения нейтрофилов по методике, использованной нами ранее [10]. Нейтрофилы выделяли в интерфазе между слоями 81% и 70% Перколла, выход нейтрофилов из 1 мл крови составлял  $1,9–5,1 \times 10^6$  клеток, степень их очистки составляла  $94 \pm 3\%$ . Жизнеспособность клеток (окраска трипа-

новым синим) была не менее 96%. Далее нейтрофилы отмывали и исследовали их фагоцитарную активность *ex vivo* в модельной системе с дрожжами *Candida tropicalis*. Выбор штамма обусловлен, в первую очередь, в связи с его широкой распространенностью как контаминанта крови [3], а также тем, что работа с ним разрешена в учебных лабораториях. Индивидуальные суспензии нейтрофилов в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл полной среды 199 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Flow) были инкубированы с клетками дрожжей *Candida tropicalis* ( $5 \times 10^6$  клеток на суспензию) в термостате при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 30 мин. Далее суспензии центрифугировали 10 мин при 200g, отмывали и фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS в течение 20 мин. Затем клетки отмывали и окрашивали пропидиумом иодидом (PI) в гипотоническом буфере, что позволяет окрасить всю ДНК клеток крови и патогенов. На **рис. 1 и 2** представлены результаты проточной цитометрии, полученные при использовании данной методики.

Фагоцитарное число (количество поглощенных дрожжей одной клеткой нейтрофила) определяли с помощью световой микроскопии.

Далее полученные суспензии нейтрофилов обрабатывали моноклональными антителами к рецепторам нейтрофилов (Abcam, UK). Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитометре FACSCalibur по программе CellQuest [10].

Результаты статистически обрабатывали по программе ANOVA, для анализа групп с малой выборкой использовали метод непараметрического анализа Ньюмена-Кейлса, при котором статистически значимые различия между группами даны как  $p < 0,05$ .

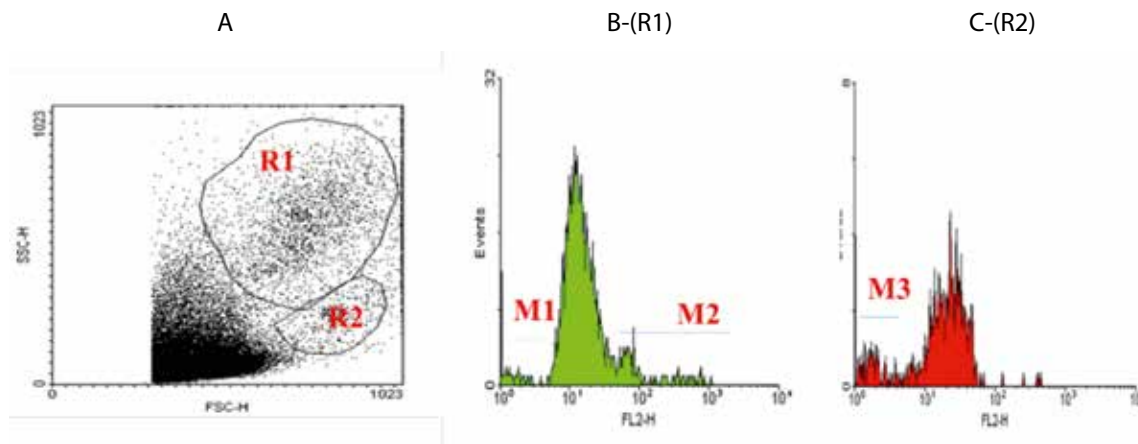
### Результаты

**Клиническая характеристика больных.** Все доноры крови на момент обследования были здоровы и не имели кожных патологий. Больные АтД были разделены на группы по тяжести заболевания согласно индексу SCORAD (<20 единиц – легкое течение ( $n=23$ ), 30–40 единиц – течение средней тяжести ( $n=26$ ), больные с тяжелым течением обострения (>40 единиц,  $n=21$ ). В отдельную группу были выделены больные АтД, у которых методом ПЦР была верифицирована контаминация кожи дрожжами рода *Candida spp.* Больные АтД, у которых обнаружена контаминация другими грибами (не патогенными), составили еще одну группу наблюдения (**табл. 1**). Частота обнаружения *Candida spp.* составила 43% (у 31 пациента). Среди дрожжей рода *Candida* обнаружены *C.albicans* (52%), *C.tropicalis* (18%), *C.glabrata* (22%), *C.parapsosis* (8%). Следует отметить,

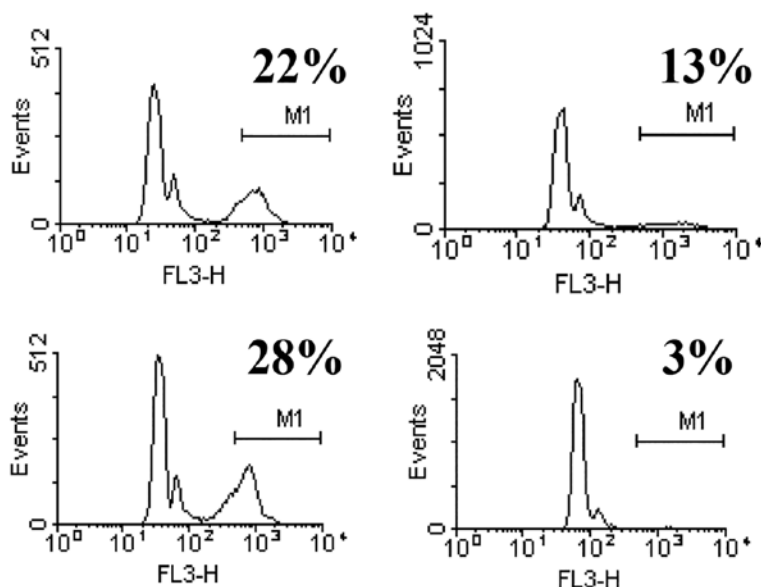
что грибковые контаминанты обнаружены у всех обследованных лиц, включая доноров. В 20% случаев (у 14 пациентов) диагностирован микст *Candida spp.* и *Malassezia spp.* Среди рода *Malassezia* были определены *M. sympodialis* (79%), *M. globosa* (17%), *M. restricta* (4%). Были также обнаружены *Trichophyton ribrum* (28%), *Trichophyton mentagrophytes* (13%), *Microsporum* (7%), *Rhodotorula (R. glutinis)* (20%). При индексе SCORAD >30 уровень

контаминации кожи микроскопическими грибами статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями для больных АтД с индексом SCORAD <20.

*Измерение фагоцитарной активности нейтрофилов.* Данные проточной цитометрии по фагоцитарной активности нейтрофилов крови больных АтД в зависимости от наличия контаминации кожи дрожжами рода *Candida* представлены в **табл. 1**.



**Рис. 1.** Данные проточной цитометрии донора: **(А)** – распределение клеток нейтрофилов и дрожжей *Candida tropicalis* на каналах FSC/SSC, где гейт R1 соответствует нейтрофилам, гейт R2 – клеткам в начальной стадии апоптоза, дрожжи располагаются компактно в левом нижнем углу. **В-(R1)** - гистограмма, отражающая фагоцитарную активность нейтрофилов в гейте R1, где пик M1 соответствует ДНК дрожжей, средний высокий пик соответствует нейтрофилам, пик M2 соответствует проценту фагоцитировавших клеток. **С-(R2)** – гистограмма, отражающая процент клеток, погибающих после контакта с дрожжами, где пик M3 соответствует проценту апоптоза.



**Рис. 2.** Данные проточной цитометрии: примеры измерения процента фагоцитировавших клеток. Каждая из гистограмм соответствует нейтрофилам, фагоцитировавшим дрожжи *Candida tropicalis*, и окрашенных пропидиумом иодидом в гипотоническом буфере. Крайний левый пик каждой гистограммы соответствует диплоидным клеткам, курсором M1 обозначены клетки, фагоцитировавшие дрожжи.

По сравнению с донорами установлено статистически значимое изменение фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови больных АтД, которые усугубляются по мере усиления тяжести течения заболевания. При сравнении групп больных АтД с контаминацией кожи дрожжами рода *Candida spp.* и без та-

ковой установлено статистически значимое различие между этими двумя группами только для тяжелого течения АтД.

*Экспрессия рецепторов нейтрофилов, ассоциированных с фагоцитозом.* Поскольку фагоцитоз дрожжей и других микроскопических грибов является рецептор-

Таблица 1

**Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови больных атопическим дерматитом и здоровых доноров**

Группы пациентов	Течение АтД по индексу SCORAD <sup>1</sup>	Фагоцитарная активность нейтрофилов	
		% фагоцитоза клеток <i>Candida tropicalis</i> .	фагоцитарное число
Атопический дерматит с контаминацией кожи дрожжами <i>Candida spp.</i>	I (n = 6),	28 ± 2 <sup>#</sup>	5,1 ± 0,3
	II (n = 11)	19 ± 3 <sup>#</sup>	4,5 ± 0,4 <sup>#</sup>
	III (n = 14)	10 ± 2* <sup>#</sup>	3,2 ± 0,2* <sup>#</sup>
Атопический дерматит без выявленной контаминации кожи <i>Candida spp.</i>	I (n = 17)	31 ± 3 <sup>#</sup>	5,4 ± 0,2 <sup>#</sup>
	II (n = 15)	23 ± 2 <sup>#</sup>	4,8 ± 0,3 <sup>#</sup>
	III (n = 7)	16 ± 3* <sup>#</sup>	3,9 ± 0,4* <sup>#</sup>
Доноры 1	n= 4	48 ± 4	5,8 ± 0,5
Доноры 2	n= 18	55 ± 6	6,3 ± 0,4

**Примечание.** \* p<0,05 – статистически значимое различие между группами больных АтД с контаминацией кожи дрожжами рода *Candida spp.* и без кандидоза, # p<0,05 – статистически значимое различие между группами больных АтД и показателями здоровых доноров;

<sup>1</sup> – течение атопического дерматита по индексу SCORAD: (I) <20 единиц – легкое течение, (II) 30–40 единиц – средней тяжести, (III) >40 единиц – тяжелое течение.

Доноры 1 – здоровые доноры с установленной контаминацией кожи дрожжами *Candida spp.*

Доноры 2 – здоровые доноры, у которых не верифицировали поверхностного кандидоза.

Таблица 2

**Экспрессия ассоциированных с фагоцитозом рецепторов на нейтрофилах периферической крови доноров и больных атопическим дерматитом в зависимости от контаминации кожи дрожжами рода *Candida spp.***

Рецепторы	Доноры	Больные атопическим дерматитом (классификация по индексу SCORAD)		
		легкое течение < 20	средней тяжести 30–40	тяжелое течение >40
Наличие контаминации кожи дрожжами рода <i>Candida spp.</i>				
	(n = 4)	(n = 6)	(n = 11)	(n = 14)
CARD9, у.е.	101 ± 7	98 ± 6	91 ± 4	78 ± 7* <sup>#</sup>
CARD9, %	56 ± 3	48 ± 4 <sup>#</sup>	39 ± 2* <sup>#</sup>	32 ± 3%* <sup>#</sup>
CD23, у.е.	51 ± 6	44 ± 4	36 ± 3* <sup>#</sup>	28 ± 5* <sup>#</sup>
CD23, %	41 ± 8	38 ± 4	32 ± 3	30 ± 5
Отсутствие контаминации кожи дрожжами рода <i>Candida spp.</i>				
	(n = 18)	(n = 17)	(n = 15)	(n = 13)
CARD9, у.е.	124 ± 8	116 ± 6	93 ± 5* <sup>#</sup>	88 ± 9* <sup>#</sup>
CARD9, %	61 ± 3	56 ± 4	44 ± 2* <sup>#</sup>	37 ± 3* <sup>#</sup>
CD23, у.е.	52 ± 3	49 ± 4	46 ± 3	39 ± 5* <sup>#</sup>
CD23, %	44 ± 2	39 ± 4	36 ± 5 <sup>#</sup>	34 ± 6 <sup>#</sup>

**Примечание.** SCORAD – индекс тяжести течения атопического дерматита у взрослых;

у.е – интенсивность флуоресценции клеток в условных единицах;

\* p<0,05 – статистически значимые различия между группами больных АтД с контаминацией кожи дрожжами рода *Candida spp.* и без кандидоза, # p<0,05 – статистически значимые различия между группами больных АтД и показателями здоровых доноров.

зависимым процессом и определяется активностью сигнальных путей в клетке, далее определяли уровень экспрессии рецепторов нейтрофилов, ассоциированных с фагоцитозом.

Экспрессия белка CARD9 статистически значимо ниже при наличии контаминации кожи дрожжами рода *Candida spp.* для больных АтД средней степени тяжести и тяжелого течения по сравнению с донорами ( $p < 0,05$ ).

Экспрессия рецептора CD23 также зависит от активности фагоцитоза и наличия контаминации дрожжами рода *Candida*. Показано статистически значимое снижение интенсивности флуоресценции белка CD23 (отражает его количество на поверхности клеток) и процента CD23+ клеток по сравнению с донорами ( $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

В данной работе впервые проведена количественная оценка экспрессии белка CARD9 у больных АтД с контаминацией кожи возбудителями поверхностных микозов. Показано статистически значимое снижение экспрессии CARD9 у больных со сниженной фагоцитарной активностью нейтрофилов, т.е. белок CARD9 играет роль в изменении фагоцитарной активности нейтрофилов при АтД с сопутствующей контаминацией кожи грибами рода *Candida spp.* Одной из физиологических функций белка CARD9 является участие его аминокислотной последовательности в регуляции каспаз (2, -9 и других), принимающих участие в митохондриально-зависимом типе апоптоза. Это указывает на сопряжение процессов фагоцитоза и апоптоза.

Экспрессия низкоаффинного FcεRII рецептора CD23 (рецептора для IgE [11]) ранее изучалась при АтД и было показано снижение его экспрессии на эозинофилах [12]. В нашей работе показана взаимосвязь между активностью фагоцитоза и экспрессией рецептора CD23 при контаминации кожи дрожжами рода *Candida spp.* у больных АтД, а также показано снижение экспрессии рецептора CD23 на нейтрофилах.

На нейтрофилах присутствуют несколько рецепторов для IgE: высокоаффинный рецептор FcεRI, низкоаффинный рецептор FcεRII (CD23), IgE-связывающий белок εBP (Mac-2/IgE-binding protein), рецептор галектина-3 (Gal3) и другие [11]. Рецептор CD23 относится к суперсемейству рецепторов лектинов С-типа (CLR). На В-лимфоцитах рецепторы CD23 рассматриваются как регуляторы синтеза IgE за счет взаимодействия CD23, растворимого CD23, IgE, комплекса IgE-аллерген и рецептора комплемента CD21.

Специфические аллергены могут активировать нейтрофилы больных, при контакте с ними повышается выход эластазы из стимулированных нейтрофилов и этот механизм является IgE-зависимым. Поэтому изучение экспрессии рецептора CD23 у больных АтД патогенетически обосновано.

Как упоминалось выше, экспрессия рецептора CD23 контролируется сигнальным путем JNK1 киназы, который негативно влияет на противомикозную защиту организма [8]. Напротив, дефицит JNK1 киназы приводит к повышению противомикозного иммунитета, так как обуславливает повышение экспрессии рецептора CD23, который может напрямую связывать патоген *Candida albicans* как в форме дрожжей, так и в форме гифов. Так как клеточная стенка *Candida albicans* экспрессирует α-маннаны и β-глюканы, считается, что CLR связывают именно эти компоненты клеточной стенки. Таким образом, нами показано вовлечение нескольких аллерген-зависимых механизмов в активацию нейтрофилов при АтД.

### Выводы

1. Активность фагоцитоза нейтрофилов снижается по мере усиления тяжести течения атопического дерматита.
2. Фагоцитарная активность нейтрофилов при верифицированной контаминации кожи больных АтД дрожжами рода *Candida spp.* статистически значимо ниже активности фагоцитов у больных АтД без контаминации кожи *Candida spp.*
3. Экспрессия рецепторов CARD9 и CD23, ассоциированных с фагоцитозом, статистически значимо снижена у больных АтД с сопутствующей контаминацией кожи дрожжами рода *Candida spp.*

### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Морозов С.Г., Волкова Е.Н.

Сбор и обработка материала – Тарасова М.В., Иванченко О.Б.

Статистическая обработка – Тарасова М.В.

Написание текста – Тарасова М.В., Волкова Е.Н.

### Литература

1. Елистратова Е.В., Иванченко О.Б., Гречко А.В., Морозов С.Г. Анализ экспрессии шаперонов DNAJB6/MR1 семейства HSP40 в клетках крови больных атопическим дерматитом при разных стадиях заболевания. *Патол. физиол. экспер. тер.* 2016; 60(3): 23-30.
2. Favier B. Regulation of neutrophil functions through inhibitory receptors: an emerging paradigm in health and disease. *Immunol. Rev.* 2016; 273(1): 140-55.

3. Sriphannam C., Nuanmuang N., Saengsawang K., Amornthipaya-wong D., Kummassok A. Anti-fungal susceptibility and virulence factor of *Candida spp.* iso;ated from blood cultures. *J. Mycol. Med.* 2019; 29(4): 325-30.
4. Hernández-Chávez M., Clavijo-Giraldo D., Novák Á., Lozoya-Pérez N., Martínez-Álvarez J., Salinas-Marín R. et al. Role of protein mannosylation in the *Candida tropicalis* – host Interaction. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2743.
5. Gazendam R., van Hamme J., Tool A., van Houdt M., Verkuijlen P., Herbst M. et al. Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects. *Blood.* 2014; 124(4): 590-7.
6. Hünninger K., Bieber K., Martin R., Lehnert T., Figge M., Löffler J. et al. A second stimulus required for enhanced antifungal activity of human neutrophils in blood is provided by anaphylatoxin C5a. *J. Immunol.* 2015; 194(3): 1199-210.
7. Salvatori O., Pathirana R., Kay J., Edgerton M. *Candida albicans* Ras1 inactivation increases resistance to phagosomal killing by human neutrophils. *Infect. Immun.* 2018; 86(12). DOI: 10.1128/IAI.00685-18.
8. Zhao X., Guo Y., Jiang C., Chang Q., Zhang S., Luo T. et al. JNK1 negatively controls antifungal innate immunity by suppressing CD23 expression. *Nat. Med.* 2017; 23(3): 337-46.
9. Buitrago M., Aguado J., Ballen A., Bernal-Martinez L., Prieto M., Garcia-Reyne A. et al. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 19(6): E271-277.
10. Елистратова И.В., Тарасова М.В., Морозов С.Г. Динамика генерации супероксидного аниона нейтрофилами крови больных atopическим дерматитом в молодом возрасте. *Патогенез.* 2015; 13(4): 41-6.
11. Balbino B., Conde E., Marichal T., Starkl P., Reber L. Approaches to target IgE antibodies in allergic diseases. *Pharmacol. Ther.* 2018; 191: 50-64.
12. de Oliveira Titz T., Orfali R., de Lollo C., Dos Santos V., da Silva Duarte A., Sato M., Aoki V. Impaired CD23 and CD62L expression and tissue inhibitors of metalloproteinases secretion by eosinophils in adults with atopic dermatitis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2016; 30(12): 2072-6.
- in different phases. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya.* 2016; 60(3): 23-30. (In Russian)
2. Favier B. Regulation of neutrophil functions through inhibitory receptors: an emerging paradigm in health and disease. *Immunol. Rev.* 2016; 273(1): 140-55.
3. Sriphannam C., Nuanmuang N., Saengsawang K., Amornthipaya-wong D., Kummassok A. Anti-fungal susceptibility and virulence factor of *Candida spp.* iso;ated from blood cultures. *J. Mycol. Med.* 2019; 29(4): 325-30.
4. Hernández-Chávez M., Clavijo-Giraldo D., Novák Á., Lozoya-Pérez N., Martínez-Álvarez J., Salinas-Marín R. et al. Role of protein mannosylation in the *Candida tropicalis* – host Interaction. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2743.
5. Gazendam R., van Hamme J., Tool A., van Houdt M., Verkuijlen P., Herbst M. et al. Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects. *Blood.* 2014; 124(4): 590-7.
6. Hünninger K., Bieber K., Martin R., Lehnert T., Figge M., Löffler J. et al. A second stimulus required for enhanced antifungal activity of human neutrophils in blood is provided by anaphylatoxin C5a. *J. Immunol.* 2015; 194(3): 1199-210.
7. Salvatori O., Pathirana R., Kay J., Edgerton M. *Candida albicans* Ras1 inactivation increases resistance to phagosomal killing by human neutrophils. *Infect. Immun.* 2018; 86(12). DOI: 10.1128/IAI.00685-18.
8. Zhao X., Guo Y., Jiang C., Chang Q., Zhang S., Luo T. et al. JNK1 negatively controls antifungal innate immunity by suppressing CD23 expression. *Nat. Med.* 2017; 23(3): 337-46.
9. Buitrago M., Aguado J., Ballen A., Bernal-Martinez L., Prieto M., Garcia-Reyne A. et al. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 19(6): E271-277.
10. Elistratova I.V., Tarasova M.V., Morozov S.G. Superoxide anion releasing by neutrophils from young adult atopic dermatitis patients. *Pathogenesis.* 2015; 13(4): 41-6. (In Russian)
11. Balbino B., Conde E., Marichal T., Starkl P., Reber L. Approaches to target IgE antibodies in allergic diseases. *Pharmacol. Ther.* 2018; 191: 50-64.
12. de Oliveira Titz T., Orfali R., de Lollo C., Dos Santos V., da Silva Duarte A., Sato M., Aoki V. Impaired CD23 and CD62L expression and tissue inhibitors of metalloproteinases secretion by eosinophils in adults with atopic dermatitis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2016; 30(12): 2072-6.

## References

1. Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Grechko A.V., Morozov S.G. Heat shock protein HSP40 family chaperone DNAJB6/MRJ expression analysis in blood cells obtained from patients with atopic dermatitis

### Сведения об авторах:

**Тарасова Маргарита Валерьевна**, науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

**Елистратова Ирина Владимировна**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, врач ФГКУЗ «ГВКГ Войск Национальной Гвардии»;

**Иванченко Ольга Борисовна**, канд. биол. наук, доцент Высшей школы биотехнологии и пищевых производств ФГАОУ ВО СПбПу;

**Волкова Елена Николаевна**, доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП; **Морозов Сергей Георгиевич**, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, директор ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Калиш С.В.<sup>1</sup>, Лямина С.В.<sup>1</sup>, Кузнецова Л.В.<sup>1</sup>, Буданова О.П.<sup>2</sup>, Малышева Е.В.<sup>1</sup>, Говоров А.В.<sup>1</sup>,  
Прилепская Е.А.<sup>1</sup>, Пушкарь Д.Ю.<sup>1</sup>, Малышев И.Ю.<sup>1,2</sup>

## M3 макрофаги останавливают деление клеток предстательной железы больного раком простаты

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, г. Москва, Россия, Делегатская ул., д. 20, стр. 1;

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

В развитии рака предстательной железы (РПЖ) макрофаги играют важную роль. Многие опухоли выделяют противовоспалительные цитокины, которые перепрограммируют M1 фенотип макрофагов на проопухолевый M2 фенотип. M2 макрофаги подавляют противоопухолевый иммунитет, способствуют делению и метастазированию опухолевых клеток. Предыдущие исследования позволили нам обосновать предположение, что деление опухолевых клеток РПЖ человека может быть ограничено особым M3 фенотипом макрофагов. Фенотип M3, в отличие от M1 фенотипа, реагирует на противовоспалительные цитокины увеличением продукции провоспалительных противоопухолевых цитокинов, что способствует сохранению их противоопухолевых свойств в зоне опухоли. **Цель исследования** – проверка гипотезы о способности M3 макрофагов останавливать деление клеток предстательной железы больного РПЖ. **Методика.** В работе использовали макрофаги мышей, выделенные из перитонеального лаважа и макрофаги человека, полученные из моноцитов крови больных РПЖ. Фенотип M3 макрофагов получали добавлением в среду культивирования IFN- $\gamma$ , ингибиторов STAT3, STAT6 и SMAD3 с последующей стимуляцией липополисахаридом. **Результаты.** Показано, что M3 макрофаги мышей и человека ограничивали деление клеток предстательной железы больных РПЖ в условиях 2D (на плоскости) культивирования на 43% и 93%, соответственно. При 3D (в объеме) культивировании M3 макрофаги мышей не ограничивали, а M3 макрофаги человека лишь незначительно ограничивали деление клеток предстательной железы у больных РПЖ. **Заключение.** Результаты работы делают обоснованными дальнейшие исследования и разработку клинической версии биотехнологии лечения рака предстательной железы с использованием M3 макрофагов.

**Ключевые слова:** макрофаги; рак предстательной железы; перепрограммирование макрофагов.

**Для цитирования:** Калиш С.В., Лямина С.В., Кузнецова Л.В., Буданова О.П., Малышева Е.В., Говоров А.В., Прилепская Е.А., Пушкарь Д.Ю., Малышев И.Ю. M3 макрофаги останавливают деление клеток предстательной железы больного раком простаты. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 54-59.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.54-59

**Для корреспонденции:** Малышев Игорь Юрьевич, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

**Финансирование.** Исследование проводилось при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (Государственное задание №056-00149-18-00 от 26 декабря 2017)

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

**Поступила** 25.10.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Kalish S.V.<sup>1</sup>, Lyamina S.V.<sup>1</sup>, Kuznetsova L.V.<sup>1</sup>, Budanova O.P.<sup>2</sup>, Malysheva E.V.<sup>1</sup>, Govorov A.V.<sup>1</sup>, Prilepskaya E.A.<sup>1</sup>,  
Pushkar D.Yu.<sup>1</sup>, Malyshev I.Yu.<sup>1,2</sup>

### M3 macrophages stop division of prostate cell from a patient with prostate cancer

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

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

Macrophages play an important role in the development of prostate cancer (PCa). Many tumors, including PCa, secrete anti-inflammatory cytokines that reprogram the M1 macrophage phenotype into the pro-tumor M2 phenotype. M2 macrophages suppress antitumor immunity and promote division and metastasis of tumor cells. We hypothesized that the division of human PCa cells may be restricted by a specific M3 macrophage phenotype. The M3 phenotype, in contrast to the M1 phenotype, responds to anti-inflammatory cytokines by increasing the production of inflammatory anti-tumor cytokines and retains its anti-tumor properties

in the tumor area. The **aim** of the study was to test the hypothesis on the ability of M3 macrophages to stop division of prostate cells from patients with PCa. **Methods.** This study used murine macrophages isolated from the peritoneal lavage and human macrophages obtained from blood monocytes of patients with PCa. The M3 macrophage phenotype was obtained by adding IFN- $\gamma$ , STAT3, STAT6, and SMAD3 inhibitors to the cultural medium followed by lipopolysaccharide (LPS) stimulation. **Results.** Murine and human M3 macrophages restricted the division of patients' PCa cells in the conditions of 2D cultivation by 43% and 93%, respectively. In 3D cultivation, murine M3 macrophages did not restrict whereas human M3 macrophages only slightly limited the division of prostate cells from PCa patients. The results of the study warrant further research and development of a clinical biotechnology for PCa treatment with reprogrammed M3 macrophages.

**Keywords:** macrophages; prostate cancer; macrophage reprogramming.

**For citation:** Kalish S.V., Lyamina S.V., Kuznetsova L.V., Budanova O.P., Malysheva E.V., Govorov A.V., Prilepskaya E.A., Pushkar D.Yu., Malyshev I.Yu. M3 macrophages stop division of prostate cell from a patient with prostate cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 54-59. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.54-59

**For correspondence:** Igor Yu. Malyshev, Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Pathological Physiology of the Moscow State University of Medicine and Dentistry n.a. A.I. Evdokimov; 20, str. 1, ul. Delegatskaya, Moscow, 127473, Russia, Head of stress and adaptation laboratory of the Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8, ul. Baltiyskaya, Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

**Information about authors:**

Budanova O.P.; <https://orcid.org/0000-0002-6650-5082>

**Acknowledgements.** The study was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (State-sponsored Task # 056- 00149-18-00 of December 26, 2017)

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

**Received** 25.10.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

Предстательная железа (ПЖ) – железисто-мышечный орган, который окружает дистальную часть мочеиспускательного канала у мужчин. ПЖ вырабатывает секрет, который стимулирует подвижность сперматозоидов и препятствует попаданию микробов в верхние мочевые пути. ПЖ не является жизненно важным органом, однако появление опухоли в нем может привести к летальному исходу. В России за последние 10 лет число мужчин с выявленным раком железы (РПЖ) возросло в 4 раза [1], а 5-летняя выживаемость больных с метастатическим РПЖ не превышает 30%. Поэтому разработка новых видов терапии остается актуальной задачей.

В развитии РПЖ важную роль играют макрофаги [2-6]. М1 макрофаги участвует в уничтожении опухоли благодаря продукции оксида азота [7] и провоспалительных цитокинов [8], активации природных киллеров [9] и антиген-презентации [10]. Опухоль выделяя противовоспалительные IL-10, TGF- $\beta$  и IL-13 [11, 12], репрограммируют М1 фенотип макрофагов в проопухольный М2 фенотип [13]. М2 макрофаги продуцируют много противовоспалительных цитокинов, факторов роста и протеиназ и поэтому подавляют иммунитет, способствуют пролиферации и метастазированию опухолевых клеток [13, 14]. Ранее нами показано, что особый М3 фенотип [15, 16] реагирует на противовос-

палительные цитокины продукцией провоспалительных цитокинов и существенно ограничивает рост мышцей карциномы Эрлиха [17]. Цель работы – проверка гипотезы о способности М3 макрофагов останавливать деление клеток РПЖ человека.

### Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами и международными правилами работы с биоматериалом человека.

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. Протокол экспериментов был утвержден Комитетом по этике ФГБНУ НИИОПП. Мыши C57BL/6J были получены из вивария «Андреевка» (Москва, Россия, <http://andreevka.msk.ru>) и содержались в соответствии с правилами ВОЗ ([www.cioms.ch/publications/guidelines](http://www.cioms.ch/publications/guidelines)).

**Реактивы.** Ингибитор Stat3 (S31204, Axon Med, США), ингибитор Stat6 (As1517499, Axon Med, США), IFN- $\gamma$  (Invitogen, США), LPS (Sigma-Aldrich, США), ингибитор SMAD3 (SIS3, Calbiochem, США), Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Hyclone, UK), DMEM/F12 (Панэко).

*Выделение макрофагов мышей.* Макрофаги мышей выделяли из перитонеального лаважа по методу X. Zhang и соавт. [18]. Затем макрофаги помещали в культуральные планшеты со средой RPMI-1640 с 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (PS) при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>.

*Получение макрофагов человека.* Макрофаги получали из моноцитов крови больных РПЖ. К 10 мл крови добавляли 40 мкл гепарина в течение 15 мин центрифугировали при 3000 об/мин. Полученную лейкоцитарную бляшку отделяли, смешивали с 10 мл лизис-буфера (0.825 г NH<sub>4</sub>Cl, 0.0037 г ЭДТА в 100 мл воды), размешивали и центрифугировали 4 мин при 1000 об/мин. Супернатант выливали и повторяли процедуру еще 2 раза. Затем осадок ресуспендировали в 1 мл RPMI-1640 и доводили концентрацию клеток до 1х10<sup>6</sup> в мл. Клетки рассаживали в лунки планшета и инкубировали 1 ч в CO<sub>2</sub> инкубаторе. После этого среду вместе с всплывшими клетками удаляли, а к оставшимся на дне клеткам добавляли среду RPMI-1640 с FBS и PS. Через 7 сут клетки приобретали фенотип макрофагов [19].

*Выделение клеток из фрагмента ткани ПЖ больных РПЖ.* Фрагмент ткани ПЖ размером 1.5×1.0 см получали после робот-ассистированной радикальной простатэктомии у пациентов с морфологически верифицированным РПЖ. Использовали фрагменты ткани ПЖ больных с аденокарциномой 7 (4+3) баллов по шкале градации Глисона (прогностическая группа 3). Фрагмент разрезали на кусочки по 1-3 мм<sup>3</sup> и инкубировали 12 ч в растворе коллагеназы 2 типа с 10 мкМ ингибитора протеинкиназы Y-27632. Затем кусочки ткани промывали в 10 мл DMEM/F12 и центрифугировали при 200 g 5 мин. Осадок ресуспендировали в 1 мл TrypLE с 10 мкМ Y-27632 и инкубировали 15 мин. Затем диссоциированные клетки промывали в DMEM/F12 центрифугированием при 200 g 5 мин [20].

*Репрограммирование M3 фенотипа макрофагов.* Для получения M3 фенотипа [17], в среду DMEM/F12, добавляли 20 нг/мл IFN-γ, 5 мкг/мл ингибитора STAT3, 10 мкг/мл ингибитора STAT6 и 2 нмоль/мл ингибитора SMAD3 и культивировали 12 ч. Затем макрофаги стимулировали 500 нг/мл липополисахарида (ЛПС) 24 ч. Контрольные M0 макрофаги культивировали 36 ч в среде DMEM/F12, содержащей 10% FBS.

*Оценка влияния M3 макрофагов мыши и человека на деление клеток ПЖ больных РПЖ в условиях 2D культивирования.* В лунки плашки к 500 тыс. макрофагов мыши через 12 ч после репрограммирования вместе с ЛПС вносили 25 тыс. клеток ПЖ больного РПЖ. В другие лунки к 20 тыс. макрофагов людей через 12 ч после ре-

программирования вместе с ЛПС вносили 1 тыс. клеток ПЖ больного РПЖ. Через 24 ч культивирования подсчитывали количество клеток ПЖ, культивируемых с M0 и M3 макрофагами. Макрофаги отделяли по методике, описанной ранее [14].

*Оценка влияния M3 макрофагов мыши и человека на деление клеток ПЖ больных РПЖ в условиях 3D культивирования.* Поскольку 2D культивирование не воспроизводит особенности объемного роста опухоли, нами также было оценено влияние M3 макрофагов на деление клеток ПЖ больного РПЖ в 3D условиях. Для формирования сфероидов (3D) в лунки низкоадгезивного 96 луночного планшета с DMEM/F12, 10% FBS и PS вносили по 500 клеток ПЖ больного РПЖ. За 24-48 ч формирования сфероида количество клеток в нем увеличивалось до 3,5-4 тыс. К сфероиду добавляли макрофаги в отношении 10 к 1 клетке сфероида. Через 24 часа сфероид пипетировали и подсчитывали количество клеток в сфероиде, культивированном с M3 и с M0 макрофагами. Таким образом, оценивали эффект макрофагов. Схема экспериментов представлена на **рис. 1**.

Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего (M) со стандартными ошибками среднего ( $\pm$  SEM). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Все эксперименты проведены в 3 повторах.

## Результаты

*1. M3 макрофаги мышей и человека ограничивали деление клеток ПЖ больных РПЖ в условиях 2D культивирования.* При 2D культивировании за 24 ч количество клеток ПЖ больных РПЖ увеличилось с 25000 до 56000 $\pm$ 1000. Добавление мышиных M0 макрофагов увеличивало их число на 25%, а добавление мышиных M3 макрофагов статистически значимо замедляло деление клеток ПЖ больных РПЖ на 43% ( $p < 0,05$ ). Добавление M0 макрофагов человека увеличивало на 56%, а добавление M3 макрофагов человека замедляло на 93% деление клеток ПЖ больных РПЖ ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, и мышиные и человеческие M3 макрофаги замедляли деление клеток ПЖ больных РПЖ при 2D культивировании. Эффект человеческих M3 макрофагов был существенно более выраженным. Увеличение деления клеток ПЖ больных РПЖ при добавлении M0 макрофагов согласуется с клиническими наблюдениями, что увеличение числа макрофагов в опухоли ухудшает прогноз заболевания [21].

*2. M3 макрофаги мышей не влияли, а M3 макрофаги человека незначительно ограничивали деление клеток ПЖ больных РПЖ в условиях 3D культивирования.* После



24-часового культивирования сфероидов без макрофагов количество клеток в нем увеличилось с  $3700 \pm 300$  до  $7000 \pm 820$ . Культивирование сфероидов с M0 макрофагами как мыши, так и человека, увеличило количество новых клеток в сфероиде на 33%. Добавление мышиных M3 макрофагов к сфероиду не влияло на деление клеток ПЖ больных РПЖ в сфероиде, а добавление человеческих M3 макрофагов на 33% снижало количество появившихся в результате деления клеток в сфероиде ( $p > 0.05$ ). Выявленный эффект проявлялся в виде тенденции.

### Обсуждение

Противоопухолевую активность макрофагов пытались повышать путем стимуляции Toll-подобных рецепторов [22]; культивированием в без-FBS среде [23]; повышения активности генов IFN- $\gamma$  и IL-12 [24] или

блокированием про-опухолевых рецепторов на макрофагах [25, 26]. Однако, опухоль перепрограммировала макрофаги в проопухолевый M2 фенотип [13] и сводила на «нет» противоопухолевый эффект макрофагов. Качественное отличие M3 фенотипа от макрофагов других фенотипов, состоит в том, что M3 макрофаги переключают сигналы проопухолевой среды на выработку противоопухолевых цитокинов. По-видимому, эта особенность лежит в основе противоопухолевых эффектов M3 макрофагов, продемонстрированного в нашем исследовании.

Мы обнаружили, что M3 макрофаги мышей существенно меньше, по сравнению с M3 макрофагами человека подавляют деление клеток ПЖ больных РПЖ. Тем не менее, сам, факт, что M3 макрофаги мышей на 43% подавляют деление клеток ПЖ больного РПЖ, свидетельствует о возможной перспективности ксено-

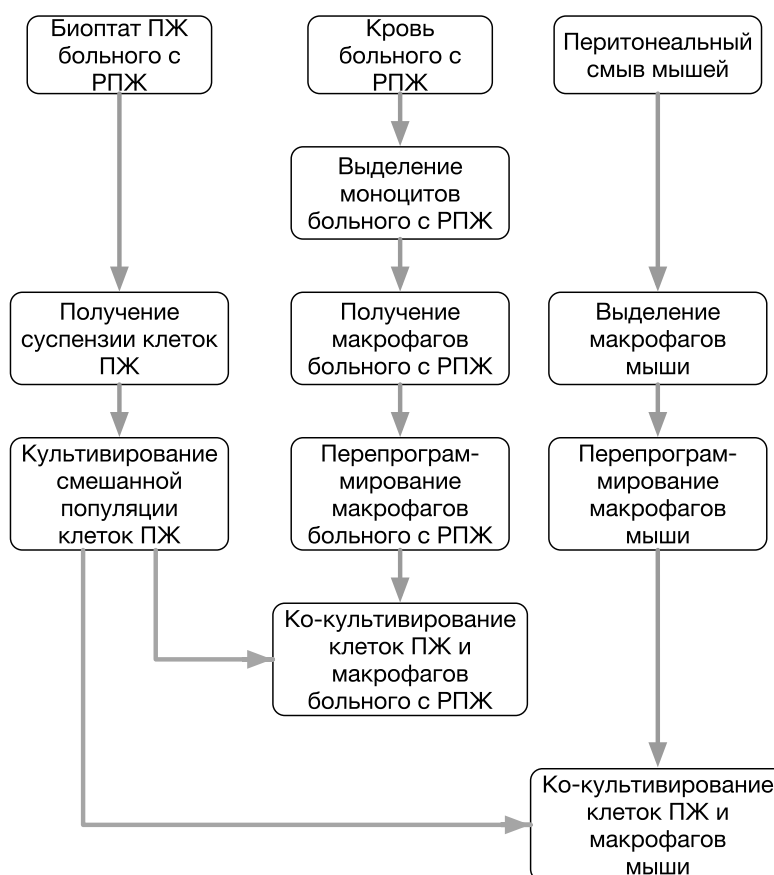


Рис. 1. Графическая схема эксперимента.

генной клеточной иммунотерапии рака после удаления видовых антигенов.

В условиях 3D культивирования антиопухолевый эффект М3 макрофагов человека был выражен меньше, по сравнению с эффектом при 2D культивировании. Вероятно, это связано с тем, что при 2D культивировании существенно больше М3 макрофагов взаимодействуют с клетками ПЖ больного РПЖ, чем при 3D культивировании, когда значительная часть клеток ПЖ находится внутри сфероидов и недоступна для макрофагов. Это указывает на то, что для повышения эффективности М3 макрофагов в терапии солидных опухолей следует увеличивать проницаемость этих опухолей для М3 макрофагов.

Интерпретация наших результатов ограничивается отсутствием данных о фенотипе исследуемых клеток ПЖ. Эксперименты для определения соотношения эпителиальных и стромальных клеток, эпителия секреторного и базального, доброкачественных и злокачественных клеток, наличия и уровня андрогеновой чувствительности будут рассматриваться в дальнейших исследованиях.

Несмотря на оставшиеся вопросы и необходимость дальнейших исследований, сам факт, что М3 макрофаги подавляют рост клеток ПЖ больных РПЖ, делает обоснованной разработку клинической версии биотехнологии для лечения РПЖ с использованием М3 макрофагов.

#### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Малышев И.Ю., Малышева Е.В.

Сбор и обработка материала – Калиш С.В., Лямина С.В., Кузнецова Л.В., Буданова О.П.

Статистическая обработка – Калиш С.В., Лямина С.В., Кузнецова Л.В.

Написание текста – Калиш С.В., Лямина С.В., Кузнецова Л.В., Буданова О.П.

Редактирование текста – Говоров А.В., Прилепская Е.А., Пушкар Д.Ю.

#### Литература

##### (п.п. 2-16; 18-26 см. References)

1. Пушкар Д.Ю., Говоров А.В., Сидоренков А.В., Прилепская Е.А., Ковылина М.В. *Ранняя диагностика рака предстательной железы. Методические рекомендации № 19.* М.; 2015.
17. Раецкая А.А., Калиш С.В., Лямина С.В., Малышева Е.В., Буданова О.П., Бахтина Л.Ю. и др. Репрограммированные *in vitro* на М3 фенотип макрофаги останавливают рост солидной карциномы *in vivo*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1):41-6. DOI: <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.01.41-46>.

#### References

1. Pushkar' DY, Govorov AV, Sidorenkov AV, Prilepskaya EA, Kovylyina MV. *Early diagnosis of prostate cancer. Methodical recommendations No. 19. [Rannyya diagnostika raka predstavitel'noy zhelezy. Metodicheskie rekomendatsii № 19].* Moscow, 2015. (in Russian)
2. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell.* 2006; 124(2): 263-6. DOI: [10.1016/j.cell.2006.01.007](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.007).
3. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarized population promoting tumor progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer.* 2006; 42:717-727. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.003>.
4. Mills CD, Thomas AC, Lenz LL, Munder M. Macrophage: SHIP of Immunity. *Front Immunol.* 2014; 5: 620. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00620>.
5. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000; 164(12): 6166-73. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>.
6. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23: 549-55. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02302-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02302-5).
7. Zeini M, Través PG, López-Fontal R, Pantoja C, Matheu A, Serrano M et al. Specific contribution of p19 (ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. *J Immunol.* 2006; 177: 3327-36. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3327>.
8. Tsung K, Dolan JP, Tsung YL, Norton JA. Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Res.* 2002; 62: 5069-75.
9. Sharma M. Chemokines and receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. *Critical Reviews in Biotechnology.* 2009; 30: 1-22. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388550903187418>.
10. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004; 21: 137-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>.
11. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 2002; 3:999-1005
12. Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 295-307.
13. Stout RD, Watkins SK and Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *J Leukoc Biol.* 2009; 86(5): 1105-9. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0209073/>
14. Kalish SV, Lyamina SV, Manukhina EB, Larionov NP, Malyshev IYu. Macrophages reprogrammed *in vitro* towards the M1 phenotype and activated with LPS extend lifespan of mice with carcinoma. *Med Sci Monit Basic Res.* 2015; 21: 226-34. DOI: [10.12659/MSMBR.895563](https://doi.org/10.12659/MSMBR.895563).
15. Malyshev I, Manukhina EB and Malyshev Y. Physiological organization of immune response based on the homeostatic mechanism of matrix reprogramming. *Med Hypotheses.* 2014; 82(6): 754-65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.03.019>.
16. Malyshev I and Malyshev Yu. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage "switch" phenotype. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 341308. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/341308>.
17. Raetskaya A.A., Kalish S.V., Lyamina S.V., Malysheva E.V., Budanova O.P., Bakhtina L.Yu., Malyshev I.Yu. Reprogrammed *in vitro*

- for the m3 phenotype, macrophages stop the growth of solid carcinoma *in vivo*. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(1): 41-6. (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.01.41-46>.
18. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. 2008; Chapter 14: Unit 14.1. DOI: 10.1002/0471142735.im1401s83.
  19. Menck, K., Behme, D., Pantke, M., Reiling, N., Binder, C., Pukrop, T., Klemm, F. Isolation of Human Monocytes by Double Gradient Centrifugation and Their Differentiation to Macrophages in Teflon-coated Cell Culture Bags. *J. Vis. Exp.* 2014, (91), e51554, doi: 10.3791/51554.
  20. Toivanen, R., Taylor, R.A., Pook, D.W., Ellem, S.J. & Risbridger, G.P. Breaking through a roadblock in prostate cancer research: an update on human model systems. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2012; 131: 122–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.01.005>
  21. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep.* 2005; 14(2): 425-31. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.14.2.425>.
  22. Ramanathan S, Jagannathan N. Tumor associated macrophage: the phenotypes, traits and functions. *Iran J Cancer Prev.* 2014; 7(1): 1-8.
  23. Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One.* 2012; 7(8): e42656. DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042656>.
  24. Satoh T, Saika T, Macrophages transduced with an adenoviral vector expressing IL-12 suppress tumor growth and metastasis in a pre-clinical metastatic prostate cancer model. *Cancer Res.* 2003;63(22):7853-7860.
  25. Peng J, Tsang JY, Li D, et al. Inhibition of TGF- $\beta$  signaling in combination with TLR7 ligation re-programs a tumoricidal phenotype in tumor-associated macrophages. *Cancer Lett.* 2013; 331(2): 239-49 . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.001>.
  26. Baay M, Brouwer A, Pauwels P, Peeters M, Lardon F. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clin Dev Immun.* 2011; 2011: 565187. DOI: 10.1155/2011/56587

#### Сведения об авторах:

**Калиш Сергей Валерьевич**, ст. лаб. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, e-mail: anahoretess@mail.ru;

**Лямина Светлана Владимировна**, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, e-mail: svlvs@mail.ru;

**Кузнецова Лариса Вячеславовна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточных биотехнологий ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, e-mail: lorakuznetsova@gmail.com;

**Буданова Ольга Петровна**, ст. науч. сотр., ФГБНУ НИИОПП, e-mail: opbudanova@yandex.ru;

**Мальшева Елена Васильевна**, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, e-mail: elenamalysheva@hotmail.com;

**Говоров Александр Викторович**, доктор мед. наук, проф. каф. урологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, e-mail: dr.govorov@gmail.com;

**Прилепская Елена Анатольевна**, доктор мед. наук, проф. каф. урологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, e-mail: prilepskaya@mail.ru;

**Пушкарь Дмитрий Юрьевич**, чл.-корр. РАН, доктор мед. наук, проф. зав. каф. урологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, e-mail: Pushkardm@mail.ru;

**Мальшев Игорь Юрьевич**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России и зав. лаб. стресса и адаптации, ФГБНУ НИИОПП, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.9

Адзериho И.Э.<sup>1</sup>, Яцевич О.Н.<sup>2</sup>, Владимирская Т.Э.<sup>2</sup>, Михневич Д.Л.<sup>2</sup>

## Морфологические изменения в динамике легочной артериальной гипертензии, индуцированной монокроталином в эксперименте *in vivo*

<sup>1</sup>ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,  
220013, Минск, Республика Беларусь, ул. П. Бровки, д. 3, корп. 3;

<sup>2</sup>ГУО НИЛ «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минздрава Республики Беларусь,  
Минский район, Республика Беларусь, агрогородок Лесной, д. 31

**Цель исследования** – изучение временной динамики морфологических изменений легочной ткани и миокарда правого желудочка у крыс на модели легочной артериальной гипертензии, индуцированной монокроталином. **Методика.** Исследование выполнено на 80 беспородных белых крысах. Для моделирования легочной артериальной гипертензии крысам вводили подкожно монокроталин в дозе 60 мг/кг. Материал для морфологического исследования (образцы тканей легких и миокарда) брали через 2, 4, 6 и 8 нед после введения монокроталина. Контролем служили образцы соответствующих тканей интактных животных. **Результаты.** В течение первых 4 нед эксперимента выявлялись начальные признаки структурного ремоделирования легочной ткани и миокарда. Это проявлялось гипертрофией медиального слоя легочных артерий с сохранением сосудистого просвета на фоне незначительных периваскулярных лимфоцитарных инфильтратов, появлением признаков активации апоптотической гибели эндотелиоцитов, а также сегментарными повреждениями кардиомиоцитов с развитием гипертрофии правого желудочка. К концу эксперимента наблюдались необратимые прогрессирующие во времени патологические изменения в исследуемых тканях. В легочной ткани появлялись участки плексиформной артериопатии, а также полное закрытие просвета легочных сосудов с выраженной околососудистой реакцией. Облитерация просвета сосудов обусловлена как гипертрофией медики, так и выраженным фиброзом интимы. В правом желудочке были обнаружены признаки мелкоочагового некроза кардиомиоцитов с участками заместительного фиброза и развитием дилатации правых отделов сердца. **Заключение.** В эксперименте *in vivo* установлены временные интервалы обратимости морфологических изменений легочной ткани и миокарда правых отделов сердца, характерные для легочной артериальной гипертензии.

**Ключевые слова:** легочная артериальная гипертензия; монокроталиновая модель; структурное ремоделирование легочной ткани и миокарда правого желудочка; апоптоз.

**Для цитирования:** Адзериho И.Э., Яцевич О.Н., Владимирская Т.Э., Михневич Д.Л. Морфологические изменения в динамике легочной артериальной гипертензии, индуцированной монокроталином в эксперименте *in vivo*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 60-66.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.60-66

**Для корреспонденции:** Яцевич Ольга Николаевна, e-mail: o-n-y@yandex.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке фонда БРФФИ, грант № M17-113.

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

**Поступила** 09.07.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Adzericho I.E.<sup>1</sup>, Jacevich O.N.<sup>2</sup>, Vladimirskaia T.E.<sup>2</sup>, Mihnevich D.L.<sup>2</sup>

## Morphological features in dynamics of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension *in vivo*

<sup>1</sup>Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education,  
Minsk 220013, Republic of Belarus, str. P. Brovki 3, corp. 3;

<sup>2</sup>Scientific Research Laboratory, Division of General Pathology, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education,  
Lesnoy Village 1, Minsk Region 223040, Republic of Belarus

**Objective.** To investigate the dynamics of pathomorphological changes in lung and right ventricular tissues in rats following injections of 60 mg/kg monocrotaline for 8 weeks. **Methods.** The study was performed on white mongrel male rats treated with monocrotaline 60 mg/kg, s.c. Samples of lung and heart tissues were collected for morphological studies every two weeks following the monocrotaline treatment. **Results.** In the first four weeks of the experiment, initial signs of structural remodeling were observed

in the lungs and myocardium. These signs were evident as medial hypertrophy of pulmonary arteries with preserved lumen and minor perivascular infiltrates; increased apoptosis of endothelial cells; and segmental injury of cardiomyocytes with right ventricular hypertrophy. Irreversible, progressive pathology was observed in studied tissues by the end of experiment, which included occlusion of the vascular lumen in pulmonary arteries due to intimal fibrosis and medial hypertrophy in the lung tissue affected by perivascular inflammation. Plexiform arteriopathy was established in some samples at 8 weeks. Right ventricular cardiomyocytes showed aseptic necrosis with transformation into reactive fibrosis and right heart dilatation. **Conclusion.** This *in vivo* study established the time windows for reversibility of morphological alterations in lung and myocardial tissues characteristic of pulmonary arterial hypertension.

**Keywords:** pulmonary arterial hypertension, monocrotaline model, structural remodeling of lung and myocardial tissues, apoptosis.

**For citation:** Adzericho I.E., Jacevich O.N., Vladimirskaia T.E., Mihnevich D.L. Morphological features in dynamics of monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension *in vivo*. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 60-66. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.60-66

**For correspondence:** Olga N. Jacevich, Junior researcher, Department of General pathology research laboratory of BelMAPO Republic of Belarus, e-mail: o-n-y@yandex.ru

**Information about authors:**

Adzerikho I. E., <https://orcid.org/0000-0001-6572-8842>

Jacevich O. N., <http://orcid.org/0000-0001-8633-2628>

Vladimirskaia T.J., <https://orcid.org/0000-0002-0777-192X>

Mihnevich D.L., <https://orcid.org/0000-0001-6808-566X>

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

**Acknowledgments.** This work was supported by the BRFFR Foundation, Grant № M17-113.

**Received** 09.07.2019

**Accepted** 19.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

В последние годы монокроталиновая модель является основной для изучения легочной артериальной гипертензии (ЛАГ). Развивающийся при действии токсина комплекс морфологических изменений (легочный фиброз, гипертрофия медиального слоя легочных сосудов, гипертрофия и дилатация правого желудочка, адвентициальные воспалительные изменения, печеночная венноокклюзионная болезнь) в научной литературе известен как монокроталиновый синдром [1]. Вместе с тем, до настоящего времени нет четких стандартов доз по введению токсина, поскольку обусловленные им изменения наблюдаются в достаточно широком диапазоне доз. Кроме того, также отсутствуют данные четкой детализации патогистологических процессов в легочной ткани и миокарде крыс в динамике развития монокроталинового синдрома при моделировании ЛАГ.

Цель исследования – изучение динамики развития патоморфологических изменений легочной ткани и миокарда правого желудочка крыс на монокроталиновой модели ЛАГ.

## Методика

Эксперименты выполнены на базе отдела общей патологии «Научно-исследовательской лаборатории

Белорусской медицинской академии последипломного образования» и одобрены этическим комитетом академии. При проведении исследований руководствовались соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией с учетом требований и рекомендаций, нормативных, научно-методических и справочных материалов [2].

В работе использовано 80 беспородных белых крыс-самцов, массой 250–300 г, в возрасте 8 нед на начало эксперимента. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Для воспроизведения ЛАГ использовали 8-недельную монокроталиновую модель [3]. Раствор монокроталина получали путем растворения кристаллов монокроталина (Sigma, Германия) в подогретом до 30 °С физиологическом растворе. Крысы были разделены на 2 группы по 40 животных в каждой. Экспериментальной группе вводили 1,0 мл раствора монокроталина (60 мг/кг) утром натошак подкожно в область холки, группе контроля – эквивалентное количество физиологического раствора. Животные, которым вводили раствор монокроталина, были дополнительно разделены в соответствии с про-

должительностью наблюдения: 2, 4, 6 и 8 нед (соответственно подгруппы М2, М4, М6 и М8). Контрольные группы М0 составили крысы, которым вводили утром натошак в область холки 1,0 мл физиологического раствора. При завершении эксперимента всех животных выводили из опыта, используя смесь 1,0 мл 0,005% раствора фентанила и 2,0 мл 0,25% раствора дроперидола (в соответствии со стандартами GLP).

Для гистологического исследования забирали легкие и сердце в соответствии с протоколом. Из образцов тканей готовили парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Массону, гематоксилином – основным фуксином с пикриновой кислотой (ГОФП). Дальнейшее изучение микропрепаратов и изготовление микрофотографий проводили с помощью микроскопов Leica DMLS и Axio Imager (Германия). Морфометрический анализ и статистическую обработку результатов проводили при помощи программно-аппаратного комплекса «Leica-Qwin». Измерение толщины стенки легочных артерий проводили при увеличении  $\times 400$ . Для выявления апоптоза клеток сосудов использовали метод TUNEL, основанный на мечении концевых отделов апоптозоспецифичных моно- и олигонуклеосомных фрагментов ядерной ДНК. Индекс апоптоза (АИ) рассчитывали как отношение числа TUNEL-позитивных клеток (при ув.  $\times 1000$  в 10 полях зрения) в процентах к общему количеству клеток. Статистическую обработку проводили с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2010» и «Statistica» (версия 10,0, StatSoft, Inc., США). Критериями оценки выступали Ме [25%; 75%], где Ме – медиана, [25%; 75%] – 25-я и 75-я процентиля; U-критерий Манна-Уитни (для независимых выборок); уровень значимости –  $p < 0,05$ .

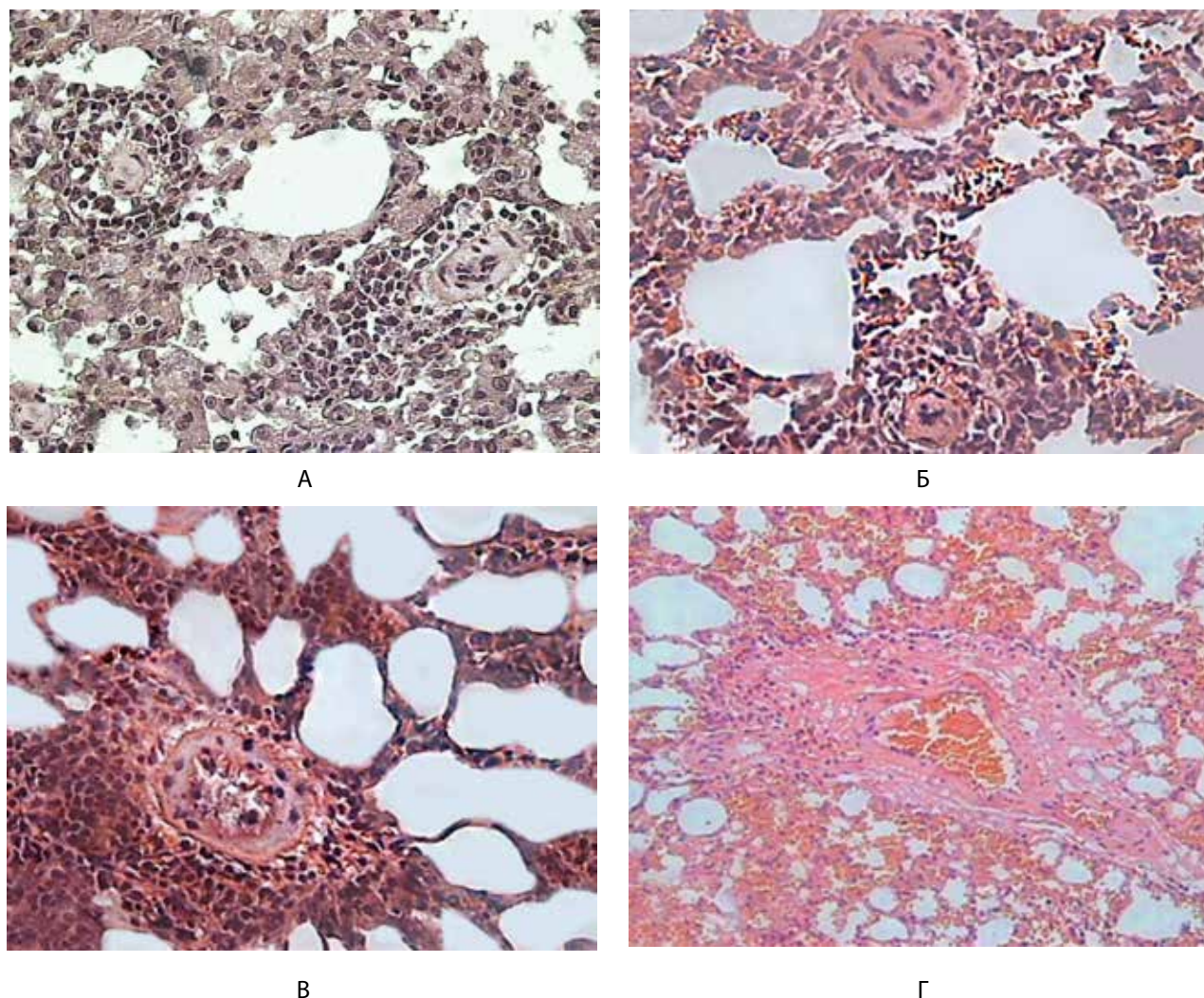
### Результаты

1. *Общая характеристика животных.* Осмотр животных каждые 2 нед выявил прогрессирующее ухудшение состояния крыс после инъекции монокроталина. Так, через 2 нед (в гр. М2) наблюдалось снижение двигательной активности крыс, а через 4 нед (гр М4) отмечена тенденция к уменьшению прироста массы тела по сравнению с группой контроля (Ме=31,13 г vs 19,7 г,  $p > 0,05$ ). Через 6 нед (гр. М6) появились признаки правожелудочковой недостаточности: у 30% крыс развивался асцит, отсутствовал прирост массы тела (Ме=44,0 г vs 25,38 г,  $p > 0,05$ ). В группе М6 20% животных погибли. На последнем этапе эксперимента (8 нед) выжило только 50% крыс с критическим снижением массы тела по сравнению с контролем (Ме=49,39 г vs 16,0 г,  $p < 0,05$ ).

2. *Микроскопическое исследование ткани легкого.* При исследовании микропрепаратов легочной ткани, окрашенных гематоксилином и эозином, наблюдали признаки патологического ремоделирования легочных сосудов (рис. 1, А-Г). Уже через 2 нед эксперимента и до его окончания отмечали признаки мускуляризации артериол с сохранением просвета сосудов и минимальной воспалительной инфильтрацией при отсутствии гиперплазии интимы и некроза эндотелиоцитов, что не сказывалось на общем состоянии животных (рис. 1, А). Через 1 мес периваскулярно увеличивалось количество лимфоцитов (рис. 1, Б). В артериолах наблюдалось утолщение интимы за счет минимально выраженной гиперплазии. Это часто сочеталось с атрофией мышечного слоя. Через 6 нед отмечались выраженные признаки недостаточности кровообращения, прогрессировали изменения интимы в виде выраженного фиброза, окклюзии просвета сосудов, значительной сосудистой воспалительной инфильтрации. В этой же группе наряду с констрикцией отмечалась дилатация отдельных артериол. На заключительном этапе (8 нед, гибель 50% животных), в артериолах выявлялся концентрический фиброз интимы и некроз эндотелиоцитов (рис. 1, В). В некоторых образцах зафиксированы локусы плексиформной артериопатии (рис. 1, Г), что соответствует типичной картине ЛАГ. Для сравнительной оценки гистологических изменений в ткани легкого крыс с ЛАГ и контрольных животных использовали бальную шкалу оценки степени выраженности изменений: 0 – отсутствие изменений, 0,5 – минимально выраженные, 1 – слабо выраженные, 2 – умеренно выраженные и 4 – значительно выраженные изменения (табл. 1).

3. *Оценка апоптоза эндотелиальных клеток легочных артерий.* Через 2 нед эксперимента (TUNEL-окрашивание) выявлено незначительное количество эндотелиальных клеток (ЭК) легочных артерий с признаками апоптотической гибели (табл. 2). До 4-й нед наблюдали последовательное статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение по отношению к группе контроля количества эндотелиальных клеток с признаками апоптотической гибели. С 4-й по 8 нед выявлено статистически значимое снижение апоптотического индекса (АИ) ( $p < 0,05$ ), а к концу эксперимента (8 нед) существенных различий с группой контроля не наблюдалось.

4. *Микроскопическая характеристика миокарда правого желудочка.* На ранних стадиях отмечались преимущественно субсегментарные, реже, сегментарные кон трактуры кардиомиоцитов, миокардиоцитоллизис; на поздних сроках имела место так называемая волнистая



**Рис. 1.** Гистологические изменения легочной ткани крыс при развитии легочной артериальной гипертензии на разных стадиях. А – М2 группа, ув. ×400. Б – М4 группа, ув. ×400. В – М8 группа, ув. ×400. Г – М8 группа, ув. ×200. Окраска гематоксилином и эозином.

Таблица 1

**Оценка морфологических изменений в легочной ткани крыс при развитии монокроталиновой ЛАГ**

Микроскопические изменения легочной ткани	Экспериментальные группы				
	М0 (контроль)	М2 (2 нед)	М4 (4 нед)	М6 (6 нед)	М8 (8 нед)
Гипертрофия меди	0	4	4	4	4
Периваскулярная инфильтрация лимфоцитами	0,5	0,5	1	2	2
Периваскулярный фиброз	0	0	0,5	2	4
Межальвеолярный отек/ воспалительная инфильтрация	0	1	1	1	2
Гиперплазия интимы	0	0	0,5	1	1
Некроз эндотелиоцитов	0	0	0	0,5	2

трансформация кардиомиоцитов (КМЦ), цитолиз (рис. 2, А), некроз отдельных КМЦ, очаги фиброза (рис. 2, Б).

5. *Морфометрическая характеристика правых отделов сердца и легочной артерии крыс.* Как видно из таблиц 3 и 4, на ранних сроках эксперимента имела место тенденция к увеличению толщины стенки правого желудочка (ПЖ). Через 2 и 4 нед толщина стенки ПЖ была статистически значимо выше контроля ( $p < 0,05$ ). Через 1 мес толщина ПЖ прогрессивно уменьшалась и не имела значимых отличий к 8-й нед наблюдения. В то же время существенно увеличивался поперечный размер полости правого желудочка (ППЖ) и диаметра ствола легочной артерии (ЛА) по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ). Корреляци-

онный анализ выявил умеренную обратную связь между толщиной стенки ПЖ и размером полости ПЖ и ЛА ( $r = -0.6, p = 0.002$ ).

Таким образом, по мере развития монокроталиновой ЛАГ уменьшается толщина стенки правого желудочка и увеличиваются размеры полости ПЖ и поперечные размеры ЛА.

Таблица 3

**Временная динамика изменения толщины стенок камер сердца при ЛАГ, индуцированной монокроталином, Ме [25-й; 75-й процентиль]**

Группа животных	ПЖ, мм [25%;75%]	МЖП+ЛЖ, мм [25%;75%]	ПЖ/(МЖП+ЛЖ), мм [25%;75%]
M2 (2 нед)	1,4* [1,0;1,6]	6,0 [4,5;7,0]	0,235 [0,167;0,3]
M4 (4 нед)	1,7* [1,2;2,0]	6,0 [6,0;6,0]	0,283** [0,2;0,3]
M6 (6 нед)	1,2* [1,1;2,0]	6,0 [6,0;7,0]	0,238 [0,117;0,333]
M8 (8 нед)	1,15 (1,0;1,5)	5,2 (5,0;6,0)	0,208 (0,2;0,231)
M0 (контроль)	0,9 [0,7;1,0]	5,0 [5,0;6,5]	0,156 [0,111;0,2]

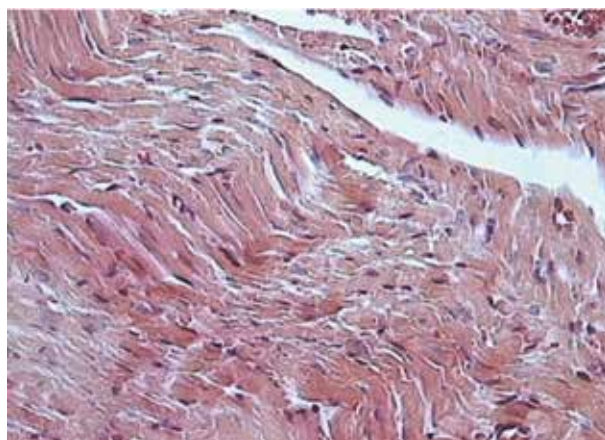
Таблица 2

**Временная динамика апоптоза эндотелиальных клеток при развитии ЛАГ, индуцированной монокроталином, Ме [25-й; 75-й процентиль]**

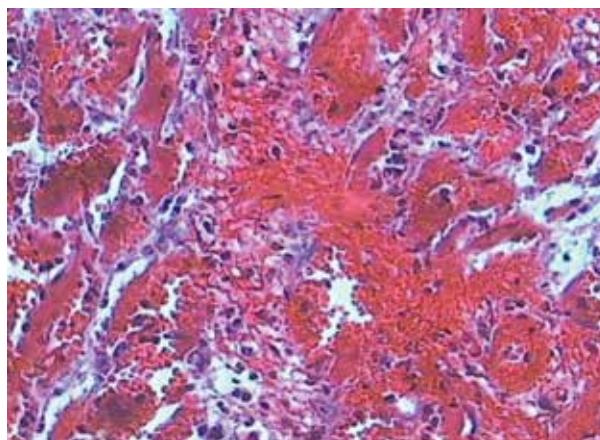
Группа (периоды наблюдения)	АИ, %
M2 (2 нед)	1,84* $\alpha$ , $\beta$ , $\alpha$ [0;3,25]
M4 (4 нед)	5,26* $\alpha$ , $\beta$ , $\alpha$ [3,64;7,28]
M6 (6 нед)	3,23* $\alpha$ , $\beta$ , $\alpha$ [2,38;5,26]
M8 (8 нед)	1,39* $\alpha$ , $\beta$ [0,00;1,74]
контроль	0,01* $\alpha$ , $\beta$ , $\alpha$ [0,00; 0,01]

**Примечание.** АИ – апоптотический индекс, %; статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) по критерию Манна-Уитни: \* – в сравнении с контрольной группой; # – в сравнении с M2 группой;  $\alpha$  – в сравнении с M4 группой;  $\beta$  – в сравнении с M6 группой;  $\alpha$  – в сравнении с M8 группой.

**Примечание.** Наличие статистически значимых различий толщины стенки ПЖ по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ): \* – в сравнении с контрольной группой; \*\* – наличие значимых различий ПЖ/(МЖП+ЛЖ) с контрольной группой; ПЖ – толщина стенки правого желудочка, мм; МЖП+ЛЖ – сумма толщины межжелудочковой перегородки и свободной стенки левого желудочка; ПЖ/(МЖП+ЛЖ) – отношение толщины стенки правого желудочка к сумме толщины межжелудочковой перегородки свободной стенки ЛЖ.



А



Б

Рис. 2. Временная динамика морфологических изменений в миокарде правого желудочка при развитии ЛАГ у крыс. А – группа М6 (6 нед), Б – группа М8 (8 нед). Окраска гематоксилином и эозином ув.  $\times 100$ .



**Обсуждение**

В проведенном исследовании подкожное введение монокроталина (60 мг/кг) через 8 нед завершалось структурным ремоделированием легочной ткани и миокарда правого желудочка.

До 4 нед эксперимента наблюдались начальные признаки ремоделирования легочной ткани и миокарда, что является обратимой стадией патогенетического процесса [1]. Это проявилось в виде гипертрофии медиального слоя легочных артерий без окклюзии сосудистого просвета на фоне незначительных периваскулярных лимфоцитарных инфильтратов, активацией апоптотической гибели эндотелиоцитов, сегментарных повреждений кардиомиоцитов с развитием гипертрофии правого желудочка. С 4-й нед и до конца эксперимента в участках легочной ткани с выраженной околососудистой воспалительной реакцией выявлялось преимущественно полное закрытие просвета легочных сосудов, обусловленное как гипертрофией меди, так и выраженным фиброзом интимы. Обнаружены также участки плексиформной артериопатии. В кардиомиоцитах правого желудочка выявлялись признаки некроза, фиброза, отмечалась дилатация правых отделов сердца. Подобная патоморфологическая картина свидетельствовала о необратимости процесса и дальнейшем его прогрессировании.

Как известно, монокроталин повреждает эндотелий легочных сосудов [4]. Вместе с тем, точные механизмы его токсического действия до сих пор остаются неясными. Данное вещество обладает быстрым и мощным краткосрочным повреждающим эффектом, так как быстро деградирует в водных средах, таких как плазма [5]. При этом подкожный способ введения способствует частичной аккумуляции монокроталина в эритроцитах и его пролонгированному повреждающему действию на легочную ткань [6].

К настоящему времени установлено, что монокроталиновый синдром регистрируется в широком интервале применяемых доз: от 2,4 до 300 мг/кг массы тела животных. Вместе с тем, имеются расхождения в эффектах в зависимости от дозы вводимого токсина. Более того, в разных исследованиях, при использовании одной и той же дозы (60 мг/кг) и одинаковом времени наблюдения, была показана различная степень гипертрофии правого желудочка. Например, M. Klein и соавт. [7] в экспериментальном исследовании определили индекс гипертрофии ПЖ (отношение массы правого желудочка к массе левого суммируемое с массой межжелудочковой перегородки) как  $0,51 \pm 0,02$ , а D. Benoist и его коллеги регистрировали этот же показате-

тель в пределах  $0,95 \pm 0,05$  [8]. Еще в одном исследовании при использовании монокроталина (40 мг/кг) было отмечено восстановление функции правого желудочка через 8-12 нед [9]. Возможно, это говорит об обратимости изменений при введении монокроталина в дозе менее, чем использованная нами 60 мг/кг.

Имеются также расхождения в использовании токсической дозы препарата для успешного создания монокроталиновой модели, а также сроках наблюдения в динамике. Не менее важным является и тот факт, что не всеми исследователями выявлены морфологические признаки ЛАГ. Так, по данным литературы [10], при развитии ЛАГ путем введения монокроталина в дозе 40-60 мг/кг не было описано плексиформных повреждений, которые являются патогномоничным ее признаком. По-видимому, это объясняется очень быстрым, по условиям эксперимента, в течение 30 сут развитием правожелудочковой сердечной недостаточности с летальным исходом. Сочетанное воздействие механического фактора (пневмонэктомия) с последующим введением монокроталина также повторяет ключевые гистологические феномены ЛАГ в виде неоинтимального повреждения во многих дистальных отделах сосудистого русла, а также появление плексусов [11], но это уже иная модель, которая технически сложна для воспроизведения и требует значительных финансовых вложений.

Предполагается, что плексиформные изменения являются следствием апоптоза клеток легочных капилляров на ранних стадиях ЛАГ, в результате чего происходит пролиферация предшественников эндотелиальных клеток, устойчивых к апоптозу [12]. Обнаруженная нами активация апоптоза эндотелиоцитов на ранних сроках эксперимента (при 8-недельном наблюдении) мо-

Таблица 4

**Временная динамика поперечных размеров полостей правых отделов сердца и легочной артерии при развитии ЛАГ, индуцированной монокроталином, Ме [25-й; 75-й процентиль]**

Группа животных	ППЖ, мм [25%;75%]	ППП, мм [25%;75%]	Ствол ЛА, мм [25%;75%]
M8	3,76* [3,7; 3,8]	5,49* [5,4; 5,6]	3,37* [3,2; 3,8]
Контроль M0	3,2 [3,2; 3,3]	3,07 [3,0; 3,1]	2,9 [2,8; 3,1]

**Примечание.** \* – наличие статистически значимых различий величин по критерию Манна-Уитни в сравнении с контрольной группой ( $p < 0,05$ ); ППЖ – поперечный размер полости правого желудочка; ППП – поперечный размер полости правого предсердия; ствол ЛА – диаметр ствола легочной артерии.

жет носить компенсаторный характер, направленный на уменьшение степени гиперплазии интимы. Однако в динамике эксперимента происходит образование плексусов на последнем этапе исследования, что подтверждает появление апоптозрезистентных эндотелиальных клеток и доказывает идентичность данной модели естественному течению ЛАГ.

В нашем исследовании не ставилась задача определения уровня давления в легочной артерии. Нами проведена оценка морфологических изменений в легочной ткани и миокарде правого желудочка, которые сопровождают развитие ЛАГ. Увеличив период наблюдения до 8 нед и используя наиболее распространенную (по данным литературы) дозу токсина (60 мг/кг), нами были выявлены основные группы патогистологических признаков ЛАГ, а именно: 1) плексиформные повреждения, которые наиболее ярко иллюстрируют сосудистые изменения; 2) дилатационные поражения легочных артериол; 3) классический артериит с трансмуральной воспалительной реакцией и признаками фибриноидного некроза [1].

Таким образом, подкожное введение монокроталина крысам в дозе 60 мг/кг способствует развитию в течение 8 нед типичных для ЛАГ патогномоничных изменений в легочной ткани и миокарде правого желудочка, которые носят необратимый характер, начиная с 4-й нед наблюдения.

#### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Адзериho И.Э.  
Сбор и обработка материала – Владимирская Т.Э., Яцевич О.Н., Михневич Д.Л.

Статистическая обработка – Яцевич О.Н., Михневич Д.Л.

Написание текста – Яцевич О.Н.

Редактирование – Адзериho И.Э., Владимирская Т.Э.

#### Литература

##### (п.п. 1; 3-12 см. References)

2. Денисов, С.Д., Морозкина Т.С. Требования к научному эксперименту с использованием животных. *Здравоохранение*. 2001; 4: 40–2.

3. Ерохина И. Л., Оковитый С. В., Казаченко А. А., Куликов А. Н., Емельянова О. И., Быстрова О. А. Резкое увеличение плотности тучных клеток в легких и перикарде при монокроталин-индуцированной легочной артериальной гипертензии у крыс. *Цитология*. 2011; 53(1): 39–43.

#### References

1. *Pulmonary hypertension*/ed. by Marc Humbert, Joseph P. Lynch III. Informa Healthcare, 2009. (Lung Biology in Health and Disease, Volume 236) — ISBN 9781420094756.
2. Denisov S.D., Morozkina T.S. Trebovanija k nauchnomu jeksperimentu ispol'zovaniem zhivotnyh. *Zdravookhranenie*. 2001; 4: 40–2. (In Russian).
3. Erokhhina I.L., Okovityy S.V., Kazachenko A.A., Kulikov A.N., Eme-lyanova O.I., Bystrova O.A. Sharp increase in density of pulmonary and pericardial mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Tsitologiya*. 2011; 53(1): 39–43. (In Russian)
4. Kay J.M., Smith P., Heath D. Electronic microscopy of Crotalaria pulmonary hypertension. *Thorax*. 1969; 24(5): 511–26.
5. Bruner L.H., Carpenter L.J., Hamlow P., Roth R.A. Effect of a mixed function oxidase inducer and inhibitor on monocrotaline pyrrole pneumotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986; 85(3): 416–27.
6. Pan L.C., Lame M.W., Morin D., Wilson D.W., Segall H.J. Red blood cell augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999; 110(2): 336–46.
7. Klein M., Schermuly R.T., Ellinghaus P., Milting H., Riedel B., Nikolova S. et al. Tyrosine and Serine/Threonine Kinase Inhibition by Sorafenib Prevents Progression of Experimental Pulmonary Hypertension and Myocardial Remodeling. *Circulation*. 2008; 118(20): 2081–90.
8. Benoist D., Stones R., Drinkhill M., Bernus O., White E. Arrhythmic substrate in hearts of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. *Heart and Circulatory Physiology*. 2011; 300(6): 2230–7.
9. Wennerstrom A., Pietinalho A., Lasota J., Sallio K., Surakka I., Seppanen M. et al. Reversibility of the monocrotaline pulmonary hypertension rat model. *European Respiratory Journal*. 2013; 42(2): 550–3.
10. Gomez-Arroyo J.G., Farkas L., Alhussaini A.A., Farkas D., Kraskauskas D., Voelkel N.F. et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2011; 302(4): 363–9.
11. White R.J., Meoli D.F., Swarthout R.F., Kallop D.Y., Galaria II., Harvey J.I. et al. Pexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293(3): 583–90.
12. Tuder R.M., Abman S.H., Braun T, et al. Development and pathology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54: Suppl. 1, 3–9.

#### Сведения об авторах:

**Адзериho Игорь Эдуардович**, доктор мед. наук, проф. каф. клинической фармакологии и фармакотерапии БелМАПО, e-mail: adzerikhoigor@mail.ru;

**Владимирская Татьяна Эрнстовна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., руководитель отдела общей патологии НИЛ БелМАПО, e-mail: tan\_2304@inbox.ru;

**Михневич Дарья Леонидовна**, мл. науч. сотр. отдела общей патологии НИЛ БелМАПО, e-mail: dashundik@mail.ru;

**Яцевич Ольга Николаевна**, мл. науч. сотр. отдела общей патологии НИЛ БелМАПО, e-mail: o-n-y@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.217

Донина Ж.А.<sup>1</sup>, Баранова Е.В.<sup>1</sup>, Александрова Н.П.<sup>1</sup>, Катунцев В.П.<sup>2</sup>, Баранов В.М.<sup>2</sup>

## Влияние периодической нормобарической гипоксии на функциональные резервы организма крыс в свободном двигательном режиме и при антиортостатической гипокинезии

<sup>1</sup> ФГБУН Институт физиологии имени И.П. Павлова РАН, 199034, г. Санкт-Петербург, Россия, наб. Макарова, д. 6;<sup>2</sup> НИИ космической медицины ФГБУ ФНЦ ФМБА России, 115682, г. Москва, Россия, Ореховый бульвар, д. 28

**Введение.** Снижение работоспособности и ортостойчивости, наблюдаемых у космонавтов на разных этапах космического полета, диктует необходимость поиска новых методов, способствующих улучшению переносимости экстремальных факторов и восстановлению нарушенных функций организма, в реабилитационном периоде. Одним из перспективных направлений, повышающих общую неспецифическую резистентность организма являются гипоксические тренировки. Вместе с тем сведения о применении гипоксического воздействия непосредственно в условиях космического полета для нивелирования неблагоприятных эффектов невесомости отсутствуют. **Цель** исследования – изучение влияния нормобарической периодической гипоксии на кардиореспираторные показатели и резервные возможности организма крыс при свободном двигательном режиме и в условиях антиортостатической гипокинезии (антиортостатическое вывешивание с углом наклона -30°), моделирующей физиологические эффекты невесомости. **Методика.** Проведено 4 серии экспериментов на 48 крысах Вистар, массой 280-300 г. Животные в течение 7 сут находились: в 1-й серии в свободном двигательном режиме с ежедневной 5-часовой нормобарической гипоксией (12% O<sub>2</sub>); во 2-й – в условиях антиортостатической гипокинезии после предварительного курса гипоксии; в 3-й – в антиортостатической гипокинезии без предварительной гипоксии (нормоксия 20,9% O<sub>2</sub>); в 4-й – в антиортостатической гипокинезии с ежедневной 5-часовой гипоксией. После завершения эксперимента у всех животных регистрировали кардиореспираторные показатели методом пневмотахографии, электрокардиографии, пульсоксиметрии, для оценки физической выносливости крыс использовали тест вынужденного плавания (по Порсолту). **Результаты.** Установлено, что эффективность НПГ в целях повышения функциональных резервов кардиореспираторной системы после длительного пребывания в условиях антиортостатической гипокинезии достигается только в результате предварительной адаптации (прекондиционирования) к периодической гипоксии в свободном двигательном режиме. **Заключение.** Воздействие нормобарической периодической гипоксии в условиях моделирования невесомости приводит к ухудшению функционального состояния организма и снижению физической выносливости крыс.

**Ключевые слова:** нормобарическая периодическая гипоксия; кардиореспираторная система; резервные возможности организма; моделированная невесомость.

**Для цитирования:** Донина Ж.А., Баранова Е.В., Александрова Н.П., Катунцев В.П., Баранов В.М. Влияние периодической нормобарической гипоксии на функциональные резервы организма крыс в свободном двигательном режиме и при антиортостатической гипокинезии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 67-75.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.67-75

**Для корреспонденции:** Донина Жанна Альбертовна, e-mail: zdonina@mail.ru**Финансирование.** «Работа выполнена при финансовой поддержке ФМБА России и Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013-2020 гг. (ГП-14, раздел 65.2)».**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**Поступила** 06.12.2019**Принята к печати** 16.01.2020**Опубликована** 25.02.2020Donina Zh.A.<sup>1</sup>, Baranova E.V.<sup>1</sup>, Aleksandrova N.P.<sup>1</sup>, Katuntsev V.P.<sup>2</sup>, Baranov V.M.<sup>2</sup>

### The effect of intermittent normobaric hypoxia on functional reserves of rats in a free locomotion and anti-orthostatic hypokinesia

<sup>1</sup>I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, Naberezhnaya Makarova 6, St. Petersburg 199034, Russia;<sup>2</sup>Research Institute for Space Medicine of the Federal Research Clinical Center of Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Biomedical Agency of Russia, Orekhovyi Bld. 28, Moscow 115682, Russia

**Introduction.** Restoring the physical condition of cosmonauts following a prolonged spaceflight requires new methods for improvement of resistance to extreme factors and recovery during the rehabilitation period. A promising approach to enhancing the general, nonspecific resistance to adverse environmental factors is hypoxic training. However, information about the use of hypoxia effects on the scene of a space flight to neutralize adverse effects of weightlessness is absent. **Aim.** To study the effect of intermittent normobaric hypoxia (INH) on cardiorespiratory parameters and reserve capacity of rats in free locomotion and in head-down tilt of  $-30^\circ$  (HDT- $30^\circ$ ), a model of spaceflight. **Methods.** Experiments were performed on 48 Wistar rats weighing 280-300 g. For 7 days the animals were 1) in free locomotion with INH daily for 5-hours (12%  $O_2$ ); 2) in HDT- $30^\circ$  under normoxia following prior INH; 3) in HDT- $30^\circ$  under normoxia; 4) in HDT- $30^\circ$  in combination with INH. Cardiorespiratory parameters were recorded by pneumotachography, electrocardiography and pulse oximetry. Exercise tolerance was evaluated using the forced swimming test (Porsolt). **Results.** The effect of INH in increasing the cardiorespiratory functional reserve after long-term simulated microgravity is achieved only with prior adaptation (preconditioning) to INH in free locomotion. **Conclusions.** Intermittent normobaric hypoxia used in simulated microgravity leads to impairment of the functional state and decreases physical endurance of rats.

**Keywords:** intermittent normobaric hypoxia; cardiorespiratory system; reserve capacity; simulated microgravity.

**For citation:** Donina Zh.A., Baranova E.V., Aleksandrova N.P., Katuntsev V.P., Baranov V.M. The effect of intermittent normobaric hypoxia on functional reserves of rats in a free locomotion and anti-orthostatic hypokinesia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 67-75. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.67-75

**For correspondence:** Zhanna A. Donina, Doctor of Biological Sciences, Lead Reseacher «I.P. Pavlov Institute of Physiology of the RAS», Russia, 199034 St. Petersburg, nab. Makarova, 6, e-mail: zdonina@mail.ru

**Acknowledgements.** The study was supported by the FMBA of Russia and the Program of Fundamental Scientific Research of State Academies in 2013-2020 (GP-14, section 65.2).

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

#### Information about authors:

Donina Zh.A., <https://orcid.org/0000-0002-4451-1270>

Baranova E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1234-4575>

Katuntsev V.P., <https://orcid.org/0000-0003-3844-7492>

Baranov V.M., <https://orcid.org/0000-0002-6969-5221>

**Received** 06.12.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

Космические полеты предъявляют к организму человека повышенные требования в связи со специфическими условиями жизнедеятельности (перегрузки, невесомость, гиподинамия и др.). Оценка функционального состояния космонавтов в пред- и послеполетных периодах включает клинко-физиологическое обследование не только в состоянии покоя, но и в условиях физической нагрузки, которая является адекватным физиологическим тестом, позволяющим выявить резервные возможности организма [1, 2].

Известно, что в условиях земной гравитации физическая работоспособность человека зависит от функции сердечно-сосудистой, дыхательной и двигательной систем [3–5]. В обширных исследованиях было установлено, что космический полет сопровождается функциональными изменениями в физиологических системах, которые связаны с работоспособностью человека [6–8]. Согласно существующей концепции, основной причиной снижения работоспособности космонавтов являются детренированность сердечно-со-

судистой системы и скелетной антигравитационной мускулатуры [9], функциональные изменения респираторной системы обеспечивающей адекватную доставку кислорода к работающим мышцам и элиминацию диоксида углерода [8, 10].

Ухудшение общего физического состояния, снижение работоспособности и ортоустойчивости у космонавтов на разных этапах космического полета диктуют необходимость поиска новых методов, способствующих улучшению переносимости условий космического полета и восстановлению нарушенных функций в реабилитационном периоде. Одним из перспективных направлений, основанных на мобилизации собственных функциональных резервов организма, повышающих общую неспецифическую резистентность к неблагоприятным факторам внешней среды, в настоящее время являются гипоксические тренировки [11–13].

Однако сведения о применении гипоксического воздействия в качестве метода нивелирования неблагоприятных эффектов невесомости и повышения ре-

зervных возможностей организма в условиях космического полета практически отсутствуют.

Цель исследования – изучение влияния периодической нормобарической гипоксии на кардиореспираторные показатели и резервные возможности организма крыс в свободном двигательном режиме и в условиях антиортостатической гипокинезии, моделирующей физиологические эффекты невесомости.

### Методика

Работа проведена на животных из биокolleкции «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России».

Эксперименты проведены на 48 лабораторных крысах (самцах) Wistar массой 250–280 г., в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными европейским научным фондом и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным. 9 крыс составляли контрольную группу. Работа одобрена этическим комитетом ФГБУН института физиологии им. И.П. Павлова.

Нормобарическую периодическую (прерывистую) гипоксию (НПГ) создавали с использованием «Экспериментального образца лабораторного стенда для проведения исследований на животных», разработанного СКТБ «Биофизприбор» (Санкт-Петербург) по техническому заданию НИИ космической медицины ФНКЦ ФМБА России (Москва). Параметры гипоксической среды обитания поддерживались автоматически: содержание кислорода ( $F_1O_2$ ) –  $12 \pm 0,3\%$ , температура –  $27 \pm 0,5$  °C, влажность –  $60 \pm 2\%$ , содержание диоксида углерода ( $F_1CO_2$ ) – не более  $0,3 \pm 0,01\%$ .

Для воспроизведения физиологических эффектов невесомости использовали метод антиортостатического «вывешивания» крыс с углом наклона  $-30^\circ \pm 1^\circ$  (АНОГ-30), описанный ранее [14–16].

Было выполнено 4 серии экспериментов в жилом отсеке экспериментального стенда. Контрольная группа ( $n=9$ ) содержалась в виварии в стандартных условиях. В 1-й серии животные ( $n=12$ ) находились 7 сут в свободном двигательном режиме (обычная локомоторная активность) в условиях нормоксии ( $pO_2 = 21\%$ ) с ежедневным 5-часовым воздействием нормобарической периодической гипоксии (НПГ,  $pO_2 = 12\%$ ). Во 2-й серии крыс ( $n=9$ ) после предварительного гипоксического воздействия в 1-й серии переводили в условия антиортостатической гипокинезии (АНОГ), с постоянным 7-суточным пребыванием в нормоксической среде. В 3-й ( $n=9$ ) – интактные крысы, без

предварительного гипоксического воздействия 7 сут находились в условиях АНОГ в нормоксической среде. В 4-й ( $n=9$ ) – интактные крысы в течение 7 сут содержались в условиях антиортостатического вывешивания в нормоксической среде с ежедневным 5-часовым гипоксическим воздействием (НПГ  $12\%O_2$ ).

После завершения каждой серии экспериментов животных наркотизировали (уретан, 1000 мг/кг) и исследовали физиологические параметры в соответствии с поставленными задачами. После завершения опыта проводили эвтаназию животных передозировкой уретана.

Для регистрации объемно-временных параметров внешнего дыхания применяли метод пневмотахографии. С помощью программного обеспечения определяли дыхательный объем (ДО) и частоту дыхательных движений (ЧД). Минутный объем дыхания (МОД) рассчитывали как произведение дыхательного объема на частоту дыхания, внутригрудное давление (ВГД) регистрировали баллонографическим методом. Систолическое и диастолическое давление (АДс, АДд) измеряли в общей сонной артерии прямой катетеризацией сосудов, используя преобразователь давления типа ПДП-300 (Россия). Частоту сердечных сокращений (ЧСС) подсчитывали по электрокардиограмме (ЭКГ), зарегистрированной при биполярном отведении сигналов. Для регистрации ЭКГ использовали многофункциональный ветеринарный монитор (Zoomed IM-10, Россия). Для мониторинга насыщения артериальной крови кислородом ( $SpO_2\%$ ) использовали ветеринарный пульсоксиметр типа UT (Zoomed, Россия). Все перечисленные параметры для последующего анализа вводились в память персонального компьютера IBMPC с помощью аппаратно-программного комплекса «Biograph» (ГУАП, Санкт-Петербург), совмещенного с персональным компьютером IBM PC.

Для оценки реактивных возможностей организма использовали тест с физической нагрузкой – модифицированный метод «принудительного плавания» (тест Порсолта с грузом) [17]. Оценивали в секундах длительность активного плавания с энергичными движениями, пассивного плавания – поддержание тела на плаву и отсутствие плавательных движений (иммобилизация).

Статистическая обработка данных производилась с использованием программы Microsoft Excel. Статистическую значимость различий оценивали с помощью t-критерия по Стьюденту. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Как показали результаты эксперимента, нормобарическое гипоксическое воздействие в свободном дви-

гательном режиме вызывало увеличение ЧД уже в 1-е сут на  $15 \pm 4\%$  ( $p > 0,05$ ), постепенно увеличиваясь и к 7-м сут прирост ЧД составил  $39 \pm 6\%$  ( $p < 0,05$ ) по сравнению с дыханием на воздухе (рис. 1). В условиях АНОГ воздействие НПГ увеличивала ЧД только на  $11\%$  ( $p > 0,05$ ). Следовательно, гипоксическое воздействие ( $12\% O_2$ ), чередуемое с нормоксией в свободном двигательном режиме, вызывало ответную реакцию, в то время как в условиях АНОГ влияние НПГ не сопровождалось компенсаторной реакцией ЧД на гипоксическое воздействие. Принимая во внимание постепенное и умеренное нарастание ЧД по мере увеличения количества сеансов у животных при обычной локомоции, можно полагать, что данное воздействие является достаточным для развития и закрепления адаптационных сдвигов в организме и не вызывает тяжелых гипоксических состояний.

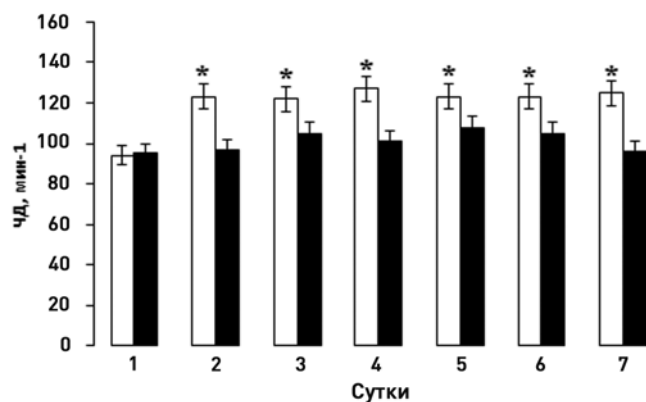


Рис. 1. Влияние 7-суточной нормобарической периодической гипоксии на частоту дыхания крыс при обычной локомоторной активности (белые столбики) и в условиях антиортостатической гипокинезии (черные столбики) ( $n=21$ ). \* –  $p < 0,05$ .

Результаты влияния периодической нормобарической гипоксии (НПГ) в свободном двигательном режиме и в условиях антиортостатической гипокинезии (АНОГ) на показатели внешнего дыхания и сердечно-сосудистой системы представлены в табл. Как видно из табл., НПГ в свободном двигательном режиме приводило к статистически значимому изменению показателей внешнего дыхания, прирост МОД происходил как за счет возрастания ДО, так и ЧД. Как известно, адаптация к гипоксическому воздействию основана на компенсаторных реакциях организма, направленных на уменьшение артериальной гипоксемии путем увеличения минутного объема дыхания, как за счет увеличения дыхательного объема, так и учащения дыхания [11, 12]. Увеличение ДО явилось результатом повышения ВГД на  $27 \pm 5\%$  ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует об усилении сократительной способности дыхательных мышц. Компенсаторный рост МОД указывает на развитие адаптационных реакций и повышении резервных возможностей респираторной системы. После курсового применения НПГ в обычном двигательном режиме насыщение артериальной крови кислородом несколько превышало контрольные значения, что было обусловлено компенсаторным ростом минутной вентиляции легких, направленным на повышение доставки кислорода к тканям.

Как видно из приведенных данных, после курсового воздействия НПГ при обычной локомоции наблюдалась слабо выраженная тенденция к повышению АДс, АДд и незначительное урежение ЧСС. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии негативного влияния гипоксической гипоксии на регуляцию системного артериального давления. Согласно данным литературы, признаком значительного напряжения механизмов регуляции гемодинамики является

Таблица

**Влияние периодической нормобарической гипоксии (НПГ) в свободном двигательном режиме и в условиях антиортостатической гипокинезии (АНОГ) на показатели внешнего дыхания и сердечно-сосудистой системы**

Показатели	Контроль (интактные)	1-я серия	2-я серия	3-я серия	4-я серия
Дыхательный объем, мл	0,8±0,1	1,1±0,1*	0,7±0,1	0,9±0,1	0,7±0,2#
Частота дыхания, мин <sup>-1</sup>	89±3	122±5*	85±3	90±3#	83±4#
Минутный объем дыхания, л/мин	72±4	134±6*	60±2*	82±4#	58±2*
Артериальное давление систолическое, мм рт.ст	120±5	125±4	115±3	125±3	148±10*#
Артериальное давление диастолическое, мм рт.ст	90±3	95±2	85±3	90±4	100±5
Частота сердечных сокращений, уд/мин	324±12	320±10	315±11	320±11	310±10

Примечание. 1-я серия – после НПГ в свободном двигательном режиме, 2-я – АНОГ без предварительной НПГ, 3-я – АНОГ с предварительной НПГ, 4-я – сочетанное влияние АНОГ и НПГ. \*)  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #)  $p < 0,05$  по сравнению с АНОГ без предварительной НПГ.

повышение АДс на 20-30 мм рт.ст., АДд на 5-10 мм рт.ст. Повышение АД, не выходящее за рамки физиологической нормы, указывает на оптимальный характер применяемого режима НПГ [18].

Как следует из представленных в таблице данных, влияние НПГ в свободном двигательном режиме приводило к увеличению МОД на 85% по сравнению с контролем. В группах с АНОГ как без предварительного гипоксического воздействия, так и при НПГ в условиях АНОГ наблюдалось снижение МОД на 17% и 20% ( $p > 0,05$ , соответственно). У животных с предварительной НПГ при АНОГ (3-я серия) снижения МОД не происходило, а наблюдалось его незначительное (на 13%) повышение. В этих условиях прирост МОД происходил за счет увеличения ДО и ЧД, следовательно, в данной серии сохранялся эффект предварительной адаптации к гипоксии. Влияние гипоксии непосредственно в условиях АНОГ не вызывало компенсаторного роста минутной вентиляции легких. В этой же группе было выявлено статистически значимое повышение АД и существенное снижение насыщения артериальной крови кислородом ( $SpO_2$ ) по сравнению с группой животных, находившихся в условиях АНОГ, после предварительного гипоксического воздействия. Как видно из рис 2, во всех проведенных сериях экспериментов  $SpO_2$  имело прямую зависимость от уровня МОД, как при обычном двигательном режиме, так и в условиях антиортостатической гипокинезии (рис. 2).

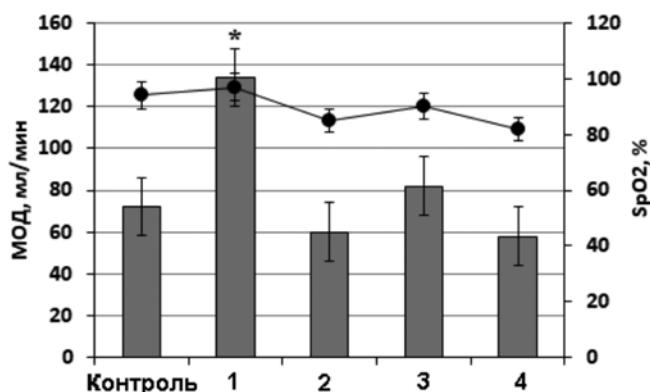


Рис. 2. Зависимость насыщения артериальной крови кислородом ( $SpO_2$ ) от уровня легочной вентиляции (МОД) в исследуемых группах. По оси абсцисс: экспериментальные группы – контроль, 1 – после НПГ в свободном двигательном режиме, 2 – АНОГ без предварительной НПГ, 3 – АНОГ с предварительной НПГ, 4 – сочетанное влияние АНОГ и НПГ.

По оси ординат: левая ось – минутный объем дыхания (мл/мин), правая ось – насыщение артериальной крови кислородом (%). \* –  $p < 0,05$ .

Тестирование физической выносливости показало, что после воздействия НПГ у крыс в свободном двигательном режиме наблюдалась незначительная тенденция к повышению всех структурных параметров плавательного теста: время активного, пассивного плавания и иммобилизации по сравнению с контрольными животными, не подвергавшихся НПГ (рис. 3). Влияние антиортостатической гипокинезии в условиях нормоксии приводило к значительному снижению всех исследованных параметров. Так, время активного плавания составляло 45%, пассивного 40%, иммобилизации 15% от контрольных значений. Характеристики плавательного теста у крыс после пребывания в условиях АНОГ с предварительной НПГ приближались к исходным значениям контрольной группы и уровню показателей в группе с НПГ в свободном двигательном режиме.

При сочетанном влиянии АНОГ и НПГ была выявлена внутригрупповая вариабельность в показателях физической выносливости. Так у 3 из 9 крыс при погружении в воду полностью отсутствовали активные движения передних и задних конечностей, животные опускались на дно, после чего тестирование прекращалось. У остальных крыс существенно уменьшилось время активного и пассивного плавания.

При анализе механизмов снижения функциональных возможностей организма при сочетанном влиянии гипоксического воздействия и антиортостатиче-

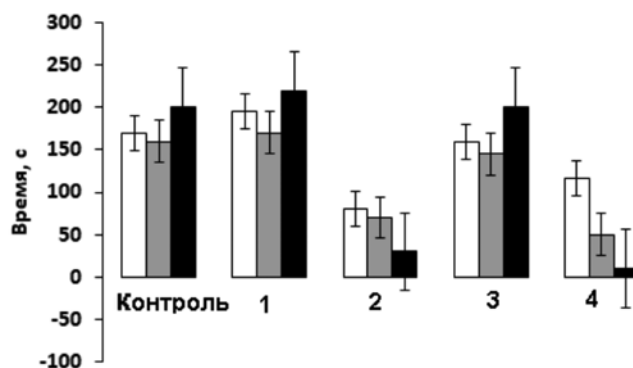


Рис. 3. Влияние НПГ в свободном двигательном режиме и сочетанной с АНОГ на характеристики плавательного теста. По оси абсцисс: контроль, 1 – после НПГ в свободном двигательном режиме, 2 – АНОГ без предварительной НПГ, 3 – АНОГ с предварительной НПГ, 4 – сочетанное влияние АНОГ и НПГ. По оси ординат: время в секундах. Белые столбики – активное плавание, серые – пассивное плавание, черные – иммобилизация.

ской гипокинезии следует учитывать, что одним из основных критериев, характеризующих адаптационные сдвиги при гипоксии, является увеличение минутной вентиляции легких. В ранее проведенных нами исследованиях по оценке вентиляторного ответа на гипоксическую стимуляцию при кратковременном антиортостатическом положении у крыс было установлено снижение прироста легочной вентиляции и чувствительности дыхательного центра к гипоксии [19]. В качестве одной из причин более низкого вентиляторного ответа рассматривалось увеличение сопротивления дыханию, обусловленного увеличенным кровенаполнением легких, снижением их растяжимости и сужением просвета дыхательных путей. Снижение вентиляторной реакции на хеморецепторные стимулы при повышенном сопротивлении дыханию в настоящее время достаточно хорошо известно [20]. Как следует из полученных результатов, при сочетанном действии гипоксии и антиортостатической гипокинезии статистически значимо повышается артериальное давление. Следовательно, можно предполагать, что усиление активности барорецепторов могло явиться еще одной причиной отсутствия прироста легочной вентиляции в ответ на гипоксическую стимуляцию. Выдвинутое предположение подтверждается данными, из которых следует, что увеличение импульсации от барорецепторов, поступающей в сосудодвигательный центр, подавляет дыхательную функцию и угнетает вентиляторную реакцию на гипоксию. В невесомости и при 21-часовой антиортостатической гипокинезии также было выявлено ослабление вентиляторной реакции на гипоксию в результате совместного влияния каротидных баро- и хеморецепторов [14, 21]. Кроме того, в антиортостатическом положении в результате изменения гидростатического компонента давления усиливается кровоток в области каротидного тельца, что в свою очередь приводит к снижению афферентной активности синусного нерва [22]. Показано, что повышение давления на уровне каротидного синуса даже в незначительной степени (10 мм рт.ст.) вызывает угнетение вентиляторной реакции более чем на 30% [23].

Наряду с указанными возможными причинами, лежащими в основе снижения функциональных резервов, после пребывания в условиях моделируемой невесомости как без предварительного гипоксического воздействия, так и при сочетанном влиянии гипоксии и антиортостатической гипокинезии нельзя не принимать во внимание кислородное обеспечение организма. Наблюдаемое снижение насыщения артериальной крови кислородом у этих экспериментальных групп

находилось в прямой зависимости от уровня легочной вентиляции, поскольку минутный объем дыхания является наиболее существенным приспособительным механизмом, обеспечивающим адекватный транспорт кислорода в ткани [12, 24]. Снижение напряжения кислорода в крови было выявлено и у космонавтов в условиях невесомости. Анализ возможных причин гипоксемии в невесомости указывает на нарушение вентиляционно-перфузионных отношений, а именно на наличие альвеолярных шунтов и частичного сброса венозной крови в артериальное русло (венозное примешивание) [25].

Важно отметить, что респираторные мышцы являются поперечно-полосатой мускулатурой, по морфологическим характеристикам они аналогичны скелетным и являются гравитационно-зависимыми структурами. Поскольку функция дыхательных мышц связана с постоянным преодолением эластических сил грудной клетки и легких, массы органов грудной и брюшной полости, то отсутствие веса этих структур в невесомости нарушает оптимальные соотношения длины и пространственной ориентации дыхательных мышц. В результате изменяется биомеханика дыхания, что может способствовать гиповентиляции, ухудшению газообменных процессов, развитию утомления дыхательной мускулатуры и ослаблению проприоцептивного влияния на дыхательный центр [26].

Результаты многочисленных наблюдений, проведенных как в условиях моделирования невесомости, так и после полетов различной продолжительности, свидетельствуют о снижении физической работоспособности космонавтов и астронавтов. Установлено: после 4-недельной антиортостатической гипокинезии снижается максимальная аэробная работоспособность, что обусловлено изменением деятельности сердечно-сосудистой системы, нарушением адекватного транспорта кислорода и снижением функциональных резервов респираторной системы. Предполагается, что в основе выявленных сдвигов лежит утомление дыхательной мускулатуры в результате детренирующего влияния гипокинезии [27, 28]. Результаты исследования влияния 120-суточной антиортостатической гипокинезии, подтверждают предположения о развитии детренированности инспираторных мышц, что ухудшало вентиляторную и газообменную функцию, что в конечном итоге явилось причиной снижения аэробной физической работоспособности [10, 29]. После пребывания в условиях 21-суточной антиортостатической гипокинезии было установлено снижение общего функционального резерва дыхательной мускулатуры, что связано, прежде всего,



с ослаблением сократительной активности инспираторных мышц грудной клетки [30].

Таким образом, роль дыхательных мышц в приспособлении к мышечной нагрузке очевидна, в связи с чем их дисфункция может оказаться лимитирующим фактором для поддержания достаточного уровня физического состояния и работоспособности операторов в условиях космических полетов, в том числе в ситуациях, связанных с интенсивной мышечной работой, таких как внекорабельная деятельность.

### Заключение

Из представленных результатов следует, что наибольшая эффективность гипоксического воздействия в целях повышения функциональных резервов кардиореспираторной системы после длительного пребывания в условиях антиортостатической гипокинезии достигается только в результате предварительной адаптации (прекондиционирования) к периодической гипоксии в свободном двигательном режиме. В основе полученных эффектов, по-видимому, лежит положительная перекрестная адаптация, которая возникает вследствие стабилизации центральных механизмов межсистемных взаимоотношений систем дыхания и кровообращения, осуществляемых на новом функциональном уровне. Известно, что адаптация к одному экстремальному воздействию повышает устойчивость организма к другим факторам, что доказывает наличие неспецифической перекрестной резистентности [24].

Сочетанное применение нормобарической периодической гипоксии и антиортостатической гипокинезии не предотвращало ухудшения функции кардиореспираторной системы и снижения физической работоспособности, вызванных длительным пребыванием в условиях гипокинезии и гравитационного перераспределения жидких сред организма в краниальном направлении.

Таким образом, проведенное исследование показало, что предварительная адаптация к нормобарической периодической гипоксии в свободном двигательном режиме способствует улучшению функционального состояния организма крыс после пребывания в условиях моделирования невесомости. Воздействие ежедневной 5-часовой нормобарической гипоксии в течение 7-суточной антиортостатической гипокинезии приводит к снижению физической выносливости организма крыс.

### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Баранов В.М., Катунцев В.П., Дони́на Ж.А.

Сбор и обработка материала — Баранова Е.В., Дони́на Ж.А.

Статистическая обработка — Баранова Е.В., Дони́на Ж.А.

Написание текста — Дони́на Ж.А., Катунцев В.П.

Редактирование — Дони́на Ж.А., Баранов В.М., Александрова Н.П.

### Литература

1. Шик Л.Л., Канаев Н.Н. *Руководство по клинической физиологии дыхания*. Л.; Медицина; 1980.
2. Чучалин А.Г. *Функциональная диагностика в пульмонологии*. М.; Издательский холдинг «Атмосфера»; 2009.
3. Попов Д.В. Виноградова О.Л., Григорьев А.И. *Аэробная работоспособность человека*. М.; Наука; 2012.
4. Rakobowchuk M., Harris E., Taylor A. et al. Moderate and heavy metabolic stress interval training improve arterial stiffness and heart rate dynamics in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2013; (4): 839–49.
5. Williams A.M., Paterson D.H., Kowalchuk J.M. High-intensity interval training speeds the adjustment of pulmonary O<sub>2</sub> uptake, but not muscle deoxygenation, during moderate-intensity exercise transitions initiated from low and elevated baseline metabolic rates. *J. Appl. Physiol.* 2013; 114(11): 1550–62.
6. Козловская И.Б., Ярманова Е.Н. Фомина Е.В. Российская система профилактики: настоящее и будущее. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2013; 47(1): 13–20.
7. Котовская А.Р. Фомина Г.А. Особенности адаптации и дезадаптации сердечно-сосудистой системы человека в условиях космического полета. *Физиология человека*. 2010; 36(2): 78–86.
8. Prisk, G.K. Microgravity and the respiratory system. *The European Respiratory Journal*. 2014; 43(5): 1459–71.
9. Grigoriev A.I., Kotovskaya A.R., Fomina G.A. The human cardiovascular system during space flight. *J. Acta Astronautica*. 2011; 68: 1495–500.
10. Баранов В.М., Тихонов М.А., Котов А.Н. и др. Профилактика детренированности дыхательных мышц и снижения аэробной работоспособности в условиях длительной невесомости и гипокинезии. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 1998; 32(6): 36–42.
11. Благинин А.А., Жильцова И.И., Михеева Г.Ф. *Гипоксическая тренировка как метод коррекции пограничных функциональных состояний организма операторов сложных эргатических систем*. Нижневартовск: Изд. Нижневарт. гос. университета; 2015
12. Колчинская А.З., Цыганова Т.Н., Остапенко Л.А. *Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте*. М.; Медицина; 2003.
13. Ушаков И.Б., Усов В.М., Дворников М.В., Бухтияров И.В. *Современные аспекты проблемы гипоксии в теории и практике высотной физиологии и авиационной медицине*. В кн.: *Проблемы гипоксии*. Под ред. Л.Д. Лукьяновой, И.Б. Ушакова. М.; 2004; 170–200.
14. Дони́на Ж.А., Баранова Е.В., Александрова Н.П. и др. Нормобарическая периодическая гипоксия повышает ортостатическую резистентность крыс после моделированной невесомости. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2018; 104(11): 1301–12.
15. Ильин Е.А., Новиков В.Е. Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных эксперимен-

- тах с крысами. *Космическая биология и авиакосмическая медицина*. 1980; 14(3): 79-80.
16. Vyalkina M., Fedorov A., Eskina E. et al. Metabolic and morphological changes in rats' eye after 7-days microgravity simulation. *American Journal of Life Sciences*. 2015; 3(1-2): 18-24.
  17. Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn*. 1977; 229: 327-36.
  18. Горанчук В.В., Сапова Н.И., Иванов А.О. *Гипокситерапия*. СПб; ООО «ОЛБИ-СПБ»; 2003.
  19. Александрова Н.П., Донина Ж.А., Данилова Г.А. и др. Вентиляторный ответ на изокапническую гипоксию в антиортогостатических условиях. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2008; 94(12): 1414-9.
  20. Milic-Emili J., Zin W. Breathing responses to imposed mechanical loads. In: *Handbook of Physiology*, sect.3. The Respiratory System, part 2, Control of Breathing, ed. Cherniack N.S., and Widdicombe J.C. American Physiology Society, Waverly Press, Bethesda, MD, USA. 1986; 751-69.
  21. Баранов В.М., Попова Ю.А., Ковалев А.С., Баранов М.В. Изменения чувствительности центрального дыхательного механизма в условиях 21-часовой антиортогостатической гипоксией. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2011; 45(4): 35-8.
  22. Whalen W.J., Nair P. Some factors affecting tissue O<sub>2</sub> in the carotid body. *J. Appl. Physiol*. 1975; 39(4): 562-6.
  23. Somers V.K., Mark A.L., Abboud F.M. Interaction of baroreceptor and chemoreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in normal humans. *J. Clin. Invest*. 1991; 87: 1953-7.
  24. Меерсон Ф.З., Твердохлиб В.П., Боев В.М., Фролов Б.А. Адаптация к периодической гипоксии в терапии и профилактике М.; Наука; 1989.
  25. Баранов В.М. Физиологический анализ возможных причин гипоксемии в невесомости. *Физиология человека*. 2011; 37(4): 1-7.
  26. Баранов В.М. *Газоэнергообмен человека в космическом полете и модельных исследованиях*. М.; Наука; 1993.
  27. Шульженко Е.Б., Гоголев К.И., Беляев С.М. Толерантность к физической нагрузке после воздействия водной иммерсии. *Космическая биология и авиакосмическая медицина*. 1983; 17(1): 40-5.
  28. Convertino V., Keil L., Bernauer E.M., Greenleaf J. Plasma volume, osmolality, vasopressin, and renin activity during graded exercise in man. *J. Appl. Physiol*. 1981; 50(1): 123-8.
  29. Joyner M., Casey D. Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: A hierarchy of competing physiological needs. *Physiol. Rev*. 2015; 95(2): 549-601.
  30. Segizbaeva M.O., Aleksandrova N.P., Donina Z.A., et al. Effect of simulated microgravity and lunar gravity on human inspiratory muscle function: 'Selena-T' 2015 study. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2016; 934(25): 31-40.
  3. Popov D.V. Vinogradova O.L., Grigor'ev A.I. Human aerobic performance. [*Aerobnaya rabotosposobnost cheloveka*]. Moscow; Nauka; 2012. (in Russian)
  4. Rakobowchuk M., Harris E., Taylor A. et al. Moderate and heavy metabolic stress interval training improve arterial stiffness and heart rate dynamics in humans. *European Journal of Applied Physiology*. 2013; (4): 839-49.
  5. Williams A.M., Paterson D.H., Kowalchuk J.M. High-intensity interval training speeds the adjustment of pulmonary O<sub>2</sub> uptake, but not muscle deoxygenation, during moderate-intensity exercise transitions initiated from low and elevated baseline metabolic rates. *Journal of Applied Physiology*. 2013; 114(11): 1550-62.
  6. Kozlovskaya I.B., Yarmanova E.N. Fomina E.V. Russian system of countermeasures: the present and future. *Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina*. 2013; 47(1): 13-20. (in Russian)
  7. Kotovskaya A.R. Fomina G.A. Kotovskaya A.R. Fomina G.A. Features of adaptation and maladaptation of the human cardiovascular system in space flight conditions. *Fiziologiya Cheloveka*. 2010; 36 (2): 78-86. (in Russian)
  8. Prisk, G.K. Microgravity and the respiratory system. *The European Respiratory Journal*. 2014; 43 (5): 1459-71.
  9. Grigoriev A.I., Kotovskaya A.R., Fomina G.A. The human cardiovascular system during space flight. *Acta Astronautica*. 2011; 68: 1495-500.
  10. Баранов В.М., Тихонов М.А., Котов А.Н. et al. Prevention of respiratory muscles deconditioning and deterioration of aerobic working capacity in prolonged weightlessness and hypokinesia. *Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina*. 1998; 32(6): 36-42. (in Russian)
  11. Blaginina A.A., Zhil'cova I.I., Miheeva G.F. Hypoxic training as a method for correcting the functional states of the operators of complex ergatic systems.
  12. [*Gipoksicheskay trenirovka kak metod korrektsii pogranychnykh phynktSIONalnykh sostoyaniy organizma operatorov slozhnykh ergaticheskikh system*]. Nizhnevartovsk: Izd. Nizhnevartovskogo Gosudarstvennogo universiteta; 2015. (in Russian)
  13. Kolchinskaya A.Z., Tsyganova T.N., Ostapenko L.A. Normobaric interval hypoxic training in medicine and sports. [*Normobaricheskaya intervalnaya gipoksicheskaya trenirovka v meditsine i sporte*]. Moscow; Meditsina; 2003. (in Russian)
  14. Ushakov I.B., Usov V.M., Dvornikov M.V., Bukhtiyarov I.V. Modern aspects of the problem of hypoxia in the theory and practice of high-altitude physiology and aviation medicine. In the book: Problems of hypoxia. Ed. L.D. Lukyanova, I.B. Ushakov.
  15. [*Sovremennye aspekty problemy gipoksii v teorii i praktike vysoynoy fiziologii i aviatsionnoy meditsine*]. Pod. red. L.D. Lukyanovoi, I.B. Ushakova. Moscow; 2004. (in Russian)
  16. Donina Zh.A., Baranova E.V., Aleksandrova N.P. et al. Periodic normobaric hypoxia increases orthostatic tolerance in rats after simulated microgravity. *Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2018; 104(11): 1301-12. (in Russian)
  17. Il'in E.A., Novikov V.E. Device for modeling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats. *Kosmicheskaya Biologiya i Aviakosmicheskaya Meditsina*. 1980; 14(3): 79-80. (in Russian)
  18. Vyalkina M., Fedorov A., Eskina E. et al. Metabolic and morphological changes in rats' eye after 7-days microgravity simulation. *American Journal of Life Sciences*. 2015; 3(1-2): 18-24.
  19. Porsolt R. D., Bertin A., Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn*. 1977; 229: 327-36.

## References

1. Shik L.L., Kanaev N.N. *Guidelines for the clinical physiology of respiration*. [*Rukovodstvo po klinicheskoy fiziologii dykhanaiy*]. Leningrad; Meditsina; 1980. (in Russian)
2. Chuchalin A.G. Functional diagnostics in pulmonology. [*Phunkcionalnaya diagnostika v pulmonologii*]. Moscow; «Atmosfera»; 2009. (in Russian)

20. Goranchuk V.V., Sapova N.I., Ivanov A.O. Hypoxytherapy. [*Gipoksiterapiya*]. Saint-Petersburg: «OLBI-SPB»; 2003 (in Russian)
21. Aleksandrova N.P., Donina Zh.A., Danilova G.A. et al. The ventilatory response to isocapnic hypoxia during head-down tilt. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2008; 94(12): 1414-9. (in Russian)
22. Milic-Emili J., Zin W. *Breathing responses to imposed mechanical loads*. In: *Handbook of Physiology, sect. 3. The Respiratory System, part 2, Control of Breathing*, ed. Cherniack N.S., and Widdicombe J.C. American Physiology Society, Waverly Press, Bethesda, MD, USA. 1986; 751-69.
23. Baranov V.M., Popova Yu.A., Kovalev A.S., Baranov M.V. Change in sensitivity of the central respiration mechanism in the 21-hour bedrest conditions. *Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina*. 2011; 45(4): 35-8. (in Russian)
24. Whalen W.J., Nair P. Some factors affecting tissue O<sub>2</sub> in the carotid body. *Journal of Applied Physiology*. 1975; 39(4): 562-6.
25. Somers V.K., Mark A.L., Abboud F.M. Interaction of baroreceptor and chemoreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in normal humans. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 87: 1953-7.
26. Meerson F.Z., Tverdokhlib V.P., Boyev V.M., Frolov B.A. Adaptation to periodic hypoxia in therapy and prevention. [*Adaptatsia k periodicheskoy gipoksii v terapii I profilaktike*]. Moscow; Nauka; 1989. (in Russian)
27. Baranov V.M. The physiological analysis of the possible reasons of hypoxemia in weightlessness. *Fiziologiya Cheloveka*. 2011; 37(4): 1-7. (in Russian).
28. Baranov V.M. Human gas and energy exchange in space flight and simulation research. [*Gasoenergoobmen cheloveka v kosmicheskoy polete I modelnykh issledovaniyakh*]. Moscow; Nauka; 1993. (in Russian)
29. Shul'zhenko E.B., Gogolev K.I., Beliaev S.M. Physical exertion tolerance after water immersion. *Kosmicheskaya Biologiya i Aviakosmicheskaya Meditsina*. 1983; 17(1): 40-5. (in Russian)
30. Convertino V., Keil L., Bernauer E.M., Greenleaf J. Plasma volume, osmolality, vasopressin, and renin activity during graded exercise in man. *Journal of Applied Physiology*. 1981; 50(1): 123-8.
31. Joyner M., Casey D. Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: A hierarchy of competing physiological needs. *Physiological Reviews*. 2015; 95(2): 549-601.
32. Segizbaeva M.O., Aleksandrova N.P., Donina Z.A., et al. Effect of simulated microgravity and lunar gravity on human inspiratory muscle function: 'Selena-T' 2015 study. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016; 934(25): 31-40.

**Сведения об авторах:**

**Донина Жанна Альбертовна**, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологии дыхания ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН», e-mail: zdonina@mail.ru

**Баранова Елизавета Владимировна**, мл. науч. сотр. лаб. физиологии дыхания ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН»;

**Александрова Нина Павловна**, доктор биол. наук, зав. лаб. физиологии дыхания ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН»;

**Катуницев Владимир Петрович**, доктор мед. наук, проф., зам. директора «НИИ космической медицины» ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

**Баранов Виктор Михайлович**, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, директор «НИИ космической медицины» ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

**Ильин В.К.<sup>1</sup>, Царев В.Н.<sup>2</sup>, Скедина М.А.<sup>1</sup>, Соловьева З.О.<sup>1</sup>, Николаева Е.Н.<sup>2</sup>, Ковалёва А.А.<sup>1</sup>, Рыкова М.П.<sup>1</sup>, Антропова Е.Н.<sup>1</sup>, Усанова Н.А.<sup>1</sup>, Морозова Ю.А.<sup>1</sup>**

## Состояние барьеров микробной колонизации зубочелюстной системы в условиях имитированной невесомости

<sup>1</sup>ФГБУН ГНЦ РФ «Институт медико-биологических проблем РАН»,  
123007, г. Москва, Россия, Хорошевское ш., д. 76А;<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России,  
127473, г. Москва, Россия, Делегатская ул., д. 20, стр.1

**Введение.** Условия космического полета приводят к изменению функциональных показателей многих органов и систем организма человека. Накопленный опыт показывает, что с увеличением длительности полета большое значение приобретает комплексные исследования состояния зубочелюстной системы. **Цель** исследования – изучение анаэробной составляющей микробиоты, иммунологических показателей ротовой жидкости и скорости кровотока в микроциркуляторном русле пародонта при моделировании невесомости. **Методика.** Наиболее адекватной моделью, воспроизводящей эффекты факторов полета в земных условиях, является «сухая» иммерсия. Было проведено комплексное обследование 20 мужчин добровольцев, в возрасте от 19 до 26 лет. В качестве модели микрогравитации использовали 5-суточную «сухую» иммерсию. Изучение состояния тканей пародонта включало микробиологические, иммунологические и микроциркуляторные исследования. Исследования выполняли в 1-е сут (фон), на 5-е сут иммерсии (выход) и на 7-е сут по окончании иммерсии. Качественный состав основных пародонтопатогенных видов микроорганизмов определяли методом полимеразной цепной реакции. Концентрацию иммуноглобулинов (sIgA, IgA, IgM) в ротовой жидкости – методом ИФА с помощью соответствующих наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест». Оценка кровотока в тканях пародонта проводили методом высокочастотной ультразвуковой доплеровской флоуметрии ультразвуковым доплерографом «Минимакс-Допплер-К» (г. Санкт-Петербург) с датчиком непрерывного излучения, рабочая частота – 20 МГц. **Результаты.** Во время эксперимента в составе микробиоты пародонта обнаружено появление 5 основных пародонтопатогенных видов микроорганизмов (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*). Отмечен рост концентрации в десневой жидкости sIgA, что связано с появлением пародонтопатогенной микробиоты. На 5-е сут и 7-е сут после «сухой» иммерсии у 12 человек отмечено статистически значимое снижение скорости кровотока в микроциркуляторном русле тканей пародонта как нижней, так и верхней челюсти. У 6 человек наблюдалась морфофункциональная перестройка микроциркуляторного русла в виде дилатации емкостных сосудов (венул) с частичным обеднением капиллярного звена, что свидетельствует о реакции веноулярной компоненты на моделируемую микрогравитацию. **Заключение.** Комплексное исследование показало предрасположенность тканей пародонта в условиях «сухой» иммерсии к развитию воспалительных заболеваний и снижению барьерных функций пародонта.

**Ключевые слова:** пародонт; пародонтопатогенные виды; местный иммунитет; иммуноглобулины; микроциркуляция; микрогравитация.

**Для цитирования:** Ильин В.К., Царев В.Н., Скедина М.А., Соловьева З.О., Николаева Е.Н., Ковалёва А.А., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Усанова Н.А., Морозова Ю.А. Состояние барьеров микробной колонизации зубочелюстной системы в условиях имитированной невесомости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 76-83.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.76-83

**Для корреспонденции:** Ильин Вячеслав Константинович, доктор мед. наук, проф., зав. отделом санитарно-гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания, заведующий лабораторией микробной экологии человека, e-mail: piton2004@bk.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках тем: СЧ ОКР «МКС (Наука)» ИМБП, 64.2 ФНИ РАН.

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

**Поступила** 10.10.2019

**Принята в печать** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Ilyin V.K.<sup>1</sup>, Tsarev V.N.<sup>2</sup>, Skedina M.A.<sup>1</sup>, Soloviova Z.O.<sup>1</sup>, Nikolaeva E.N.<sup>2</sup>, Kovaleva A.A.<sup>1</sup>, Rykova M.P.<sup>1</sup>, Antropova E.N.<sup>1</sup>, Usanova N.A.<sup>1</sup>, Morozova Yu.A.<sup>1</sup>

## The state of barriers for microbial colonization of the dentition in the conditions of simulated weightlessness

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe Shosse 76A, Moscow 123007, Russia;

<sup>2</sup>A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Delegatskaya Str. 20/1, Moscow 127473, Russia

Comprehensive evaluation of 20 male volunteers aged 19-26 was conducted during exposure to 5-day "dry" immersion (DI). **The aim** was to examine periodontal tissues in the conditions of 5-day "dry" immersion, specifically, to study the anaerobic component of periodontal microbiota, immunological parameters of the oral fluid, and blood flow velocity in the periodontal microcirculation (PMC). **Methods.** Microgravity was modeled with the 5-day DI. Evaluation of the condition of periodontal tissues included microbiological, immunological, and microcirculatory studies. The studies were performed on day 1 (baseline), day 5 of immersion (completion), and day 7 upon the end of immersion. All studies were performed in the fasting state, before toothbrushing, in the supine position in the immersion bath, and in the sitting position 7 days after the immersion. PMC was studied at the same time points as in the immunoglobulin study. Blood flow in periodontal tissues was measured using the high-frequency ultrasonic Doppler fluorimetry (HFUDF) with a Minimax-Doppler-K ultrasonic dopplerograph (St. Petersburg) with a continuous radiation sensor at an operating frequency of 20 MHz. **Results.** Five major periodontopathogenic bacteria (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) emerged as a part of the periodontal microbiota during the experiment. An increased concentration of sIgA was observed in the gingival fluid, which was associated with the emergence of periodontopathogenic microbiota. On day 5 of SI and day 7 following SI, 12 subjects had a statistically significant decrease in blood flow velocity in PMC of both the lower and upper jaws. 6 subjects showed morphological and functional rearrangement of the PMC, including dilation of capacitance vessels (venules) with partial capillary depletion, which indicated a venular component response to the conditions of modeled microgravity. **Conclusion.** This comprehensive study showed predisposition of periodontal tissues to development of inflammatory diseases and impaired functioning of the periodontal barrier under the conditions of DI.

**Keywords:** periodontium; periodontopathogenic species; local immunity; immunoglobulins; microcirculation; microgravity.

**For citation:** Ilyin V.K., Tsarev V.N., Skedina M.A., Soloviova Z.O., Nikolaeva E.N., Kovaleva A.A., Rykova M.P., Antropova E.N., Usanova N.A., Morozova Yu.A. The state of barriers for microbial colonization of the dentition in the conditions of simulated weightlessness. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 76-83. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.76-83

**For correspondence:** Ilyin Vyacheslav Konstantinovich, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Sanitary and Hygienic Safety of Man in Artificial Environment, Head of the Laboratory of Microbial Ecology of Man, e-mail: piton2004@bk.ru

### Information about authors:

Soloviova Z.O., <https://orcid.org/0000-0002-6159-1313>

Rykova M.P., <https://orcid.org/0000-0002-9121-5351>

Antropova E.N., <https://orcid.org/0000-0002-1681-7951>

Usanova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-8485-4470>

Morozova Yu.A., <https://orcid.org/0000-0002-9461-6986>

**Acknowledgment.** This study was conducted as a part of the SCO OCD «ISS (Science)» IMBP, 64.2 FSR RAS projects.

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

**Received** 10.10.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

Условия космического полета (КП) приводят к изменению функциональных показателей многих органов и систем организма человека. Накопленный опыт показывает, что с увеличением длительности полета большое значение приобретают комплексные исследования состояния зубочелюстной системы.

По завершению КП у космонавтов обнаруживаются существенные изменения местного иммунитета и микробиоты десневой биопленки. В условиях модельных экспериментов выявлено увеличение концентрации иммуноглобулинов (sIgA, IgA, IgG) в десневой жидкости, появление пародонтопатогенной микро-

биоты, изменение показателей системы микроциркуляции тканей пародонта. Данные изменения свидетельствуют о напряжении общего иммунитета, а в сочетании с увеличением видов патогенной микробиоты, также и о снижении местного иммунитета, что способствует развитию воспалительного процесса.

Важными задачами исследований в области пародонтологии следует считать изучение реакции микроциркуляторного русла (МЦР), нарушений трансапиллярного обмена, роли иммунологических механизмов разрушения соединительно-тканых элементов пародонта и т. д. Ряд важных симптомов воспаления в пародонте связан с сосудистыми расстройствами. К таковым относятся гиперемия, отечность и кровоточивость десен [1]. Существенная роль в воспалительных заболеваниях пародонта принадлежит микробным факторам. Защитная роль нормальной флоры полости рта – вейллонелл, саливарных стрептококков и лактобактерий, за счет бактериоциногенности и высокого сродства к рецепторам слизистой оболочки, сводится к препятствию обсеменения ее болезнетворными микроорганизмами. Еще более важная роль нормальной флоры полости рта заключается в поддержании «рабочего» состояния врожденных и адаптивных форм иммунного ответа, что проявляется усилением синтеза лизоцима, пропердина, компонентов системы комплемента, иммуноглобулинов. Нормальная микрофлора стимулирует миграцию нейтрофилов и системы моноцитов/макрофагов. Однако защитная роль микроорганизмов может быть недостаточной и при воздействии определенных факторов приводит к нарушению хрупкого равновесия между нормальным и патологическим биоценозом. Это и становится основной причиной воспалительных заболеваний пародонта. Агрессивные свойства микроорганизмов при этом проявляются двояко – прямым токсическим влиянием на ткани пародонта и опосредованно, через комплекс иммунопатологических механизмов, главным образом, через эндотоксин. Он является липополисахаридом, который активирует систему комплемента, лейкоциты, выделяющие простагландины, лейкотриены и прочие биологически активные вещества, разрушающие бактериальную клетку. Некоторые эндотоксины способны повреждать клетки иммунной системы, в частности нейтрофилы, вызывая их лизис. Многие микроорганизмы способны выделять гидролитические ферменты, разрушающие тканевые структуры (коллагеназа, фосфолипаза, нейраминидаза), что способствует прогрессированию воспалительного процесса. Известно, что микроорганизмы, проникшие в пародонт, могут существовать практически бессимптомно. При этом между инфек-

ционным очагом и организмом человека устанавливается динамическое равновесие. Оно может существовать достаточно долго, если в инфекционном очаге и окружающих его тканях сохраняется определенный уровень факторов защиты [2].

В развитии деструктивных изменений в пародонте лежат ассоциации пародонтопатогенных видов 1-го порядка (или «красного и оранжевого комплекса» по Sohranski) видов *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, [3, 4]. Считается, что *Porphyromonas gingivalis* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* могут выступать в роли моноинфекции тканей пародонта при развитии хронического генерализованного пародонтита и ювенильного пародонтита соответственно, а присоединение *Tannerella forsythia* способствует быстрой деструкции альвеолярной кости [4]. Ассоциация с пародонтопатогенными видами 2-го порядка (*Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* и др.) более характерна для фазы обострения хронического пародонтита и в целом для прогрессирования заболевания [5].

Факторы гуморального иммунитета ротовой жидкости, IgA и IgM и, в особенности, sIgA имеют важнейшее значение для профилактики пародонтита. Определение этих показателей позволяет судить о состоянии местных защитных механизмов полости рта, и косвенно характеризовать состояние иммунной системы в целом. С другой стороны известно, что *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella intermedia* имеют протеазы, разрушающие IgA и IgM [3, 6].

**Цель** исследования – изучение анаэробной составляющей микробиоты, иммунологических показателей ротовой жидкости и скорости кровотока в микроциркуляторном русле пародонта при моделировании невесомости.

### Методика

Наиболее адекватной моделью невесомости в земных условиях, воспроизводящей некоторые эффекты воздействия микрогравитации является «сухая» иммерсия (СИ) [7]. В качестве модели микрогравитации в работе использовали 5-суточную СИ. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов на участие в проводимых исследованиях. Предварительно процедуры и методики исследований были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ-ИМБП РАН (протоколы № 370 от 15.09.2014 и № 432 от 15.09.2016 г.). Исследования проведены с участием 20

здоровых мужчин добровольцев, ознакомленных с программой эксперимента, прошедших врачебно-экспертную комиссию ГНЦ РФ-ИМБП РАН. Возраст испытуемых 19 – 26 лет, средний рост – 175,6±6,4 см, масса тела 70,2±4,6 кг. Согласно программе исследований [7], они в течение 5 сут находились в иммерсионной ванне размером 256×148×110 см, наполненной водой, температура которой постоянно поддерживалась на уровне 32-34 °С. Исследования тканей пародонта проводили в 1-е сут эксперимента (фон), 5-е сут иммерсии (выход) и 7-е сут по окончании СИ. Все исследования выполнялись натошак, перед чисткой зубов, в положении лежа в иммерсионной ванне, на 7-е сут после иммерсии в положении сидя.

Гигиена полости рта осуществлялась утром и вечером, чистка зубов проводилась в течение 3 мин зубной щеткой и зубной пастой, индивидуально используемой каждым испытуемым в обычных условиях жизнедеятельности. После приема пищи межзубные промежутки очищались с помощью шелковых флоссов. Все исследования проводили в покое без предварительных физических и психоэмоциональных нагрузок.

Для исследования микробиоты пародонта взятие проб производили с десневой зубной бляшки 7-го, 10-го, 23-го и 26-го зубов верхней и нижней челюсти (в соответствии с универсальной схемой нумерации) с помощью пробоотборников. При определении содержания иммуноглобулинов в ротовой жидкости пробы брали снаружи между 1-м и 2-м резцами справа и слева, на верхней и нижней челюсти стерильными ватны-

ми тампонами, которые прикладывались на 2 минуты к месту отбора проб.

Исследования проводили стандартными бактериологическим, молекулярно-биологическим и иммунологическим методами. Качественный состав основных пародонтопатогенных видов микроорганизмов определяли современным методом молекулярно-биологического исследования – полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Для выявления маркерной ДНК пародонтопатогенных видов использовали тест-систему «МультиДент-5» производства ООО «ГенЛаб» (Россия) с праймерами пяти основных пародонтопатогенных видов: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* [3]. Концентрацию иммуноглобулинов (sIgA, IgA, IgM) в ротовой жидкости определяли методом ИФА с помощью соответствующих наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест».

При определении показателей кровотока в МЦР тканей пародонта исследовали те же точки, что и для иммуноглобулинов. Измерения проводили на границе между десной и переходной складкой (рис. 1). Оценку кровотока в тканях пародонта проводили методом высокочастотной ультразвуковой доплеровской флуометрии (ВУЗДФ). Применяли ультразвуковой доплерограф «Минимакс-Допплер-К», (г. Санкт-Петербург) с датчиком непрерывного излучения, рабочая частота 20 МГц. Метод позволяет оценить линейную и объемную скорость кровотока в ткани на глубине до 1,5 см [8, 9]. В ходе исследования регистрировали абсолют-

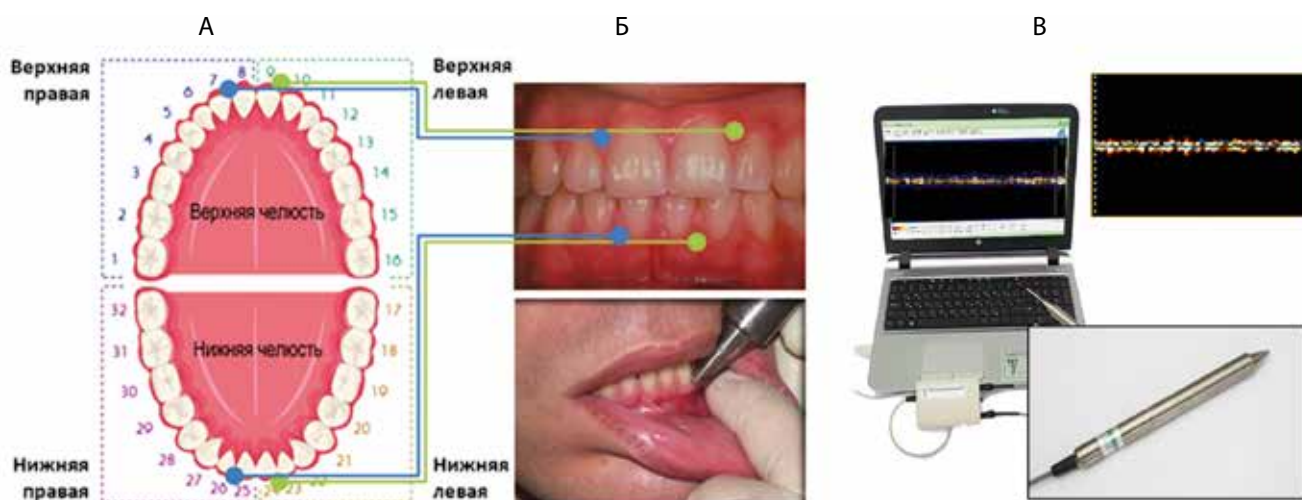


Рис. 1. Точки проведения ультразвукового исследования тканей пародонта и забора ротовой жидкости (А); проведение ультразвукового исследования (Б); прибор доплерограф «Минимакс-Допплер-К» и доплерограмма (В).

ные значения линейных скоростей в исследуемом объеме ткани, отражающие артерио-венулярный кровоток:  $V_s$ - максимальная систолическая скорость,  $V_m$  – максимальная средняя скорость,  $V_{ad}$  – диастолическая скорость в (см/с); и показатели, соответствующие преимущественно капиллярному кровотоку:  $V_{as}$  – средняя систолическая скорость,  $V_{am}$  – средняя скорость,  $V_{adk}$  – конечная диастолическая скорость (см/с).

Статистическую обработку полученных данных производили с помощью программы StatSoft Statistica v7.0. Для определения различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни с принятым уровнем значимости  $p=0,05$ . С целью оценки достоверности внутригрупповой динамики параметров МЦР использовали непараметрический критерий Вилкоксона с принятым уровнем значимости  $p=0,05$ .

### Результаты

Результаты проведенных исследований показали, что иммуноглобулины, которые поступают в ротовую жидкость путем трансудации из сыворотки крови, имели тенденцию к снижению на 5-е сутки СИ, в то время как секреторный компонент sIgA, напротив, несколько повышался, т.е. проявлялась местная специфическая реакция иммунитета. Тем не менее, изменения не были статистически значимыми. (см. табл.).

Проведенная детекция 5 основных пародонтопатогенных видов микроорганизмов – *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* показала наличие в ротовой полости обследуемых, как минимум, 1-2 представителей этой группы до начала модельного эксперимента (за исключением одного участ-

ника), что предполагает потенциальную возможность развития пародонтита. Наиболее часто в десневой биоплёнке определялись *P. gingivalis* (50 % участников) и *A. actinomycetemcomitans* (50 % участников) и эта тенденция сохранялась и после завершения эксперимента. У 2 участников выявлена маркерная ДНК *T. forsythia*, частота выявления которой после эксперимента возрастала в 2 раза (с 33,3 до 66,6 %). У 1 участника – *T. denticola*, была выявлена как до, так и после эксперимента. *P. intermedia* не была обнаружена ни у одного из участников. В процессе и после проведения эксперимента все участники (100 %) были инфицированы представителями, как минимум, 2 пародонтопатогенных видов: 2 вида выделены – у 4 участников, 3 вида – у 2 участников, что отражалось в появлении признаков гингивита.

Известно, что десна нижней челюсти лучше васкуляризирована, чем десна верхней [10, 11]. Однако сравнение линейных скоростей кровотока в МЦР пародонта верхней и нижней челюсти у испытуемых не выявило статистически значимых различий как в артерио-венулярном, так и в капиллярном звене. Различия в интенсивности кровотока на доплерограмме также были слабо выражены.

По данным ВУЗДФ у 12 обследуемых на 5-е сут СИ показатели кровотока в верхней и нижней челюсти снижались в артериоло-венулярном звене более чем на 25%, в нижней челюсти снижение было статистически значимым (на 35 %,  $p<0,001$ ). В капиллярном звене значимое снижение линейных скоростей составило в среднем 36% ( $p<0,0001$ ). Замедление кровотока отчетливо прослеживается на доплерограммах (рис. 2). Через 7 сут после СИ кровотоки оставались сниженным в артериоло-венулярном звене и статистически значи-

Таблица

#### Динамика содержания иммуноглобулинов в ротовой жидкости у обследуемых в период «сухой» иммерсии

Показатель		медиана* (n=32)	минимум	максимум	Показатели нормы в слюне по данным Вектор-Бест
sIgA, мг/л	фон	123,3 (108,2; 180,2)	100	603,7	115,3-299,7
	5-е сут СИ	136,4 (116,2; 224,2)	101,7	487,5	
	7 сут после СИ	178,7 (148,4; 232,5)	115,3	341,9	
IgA, г/л	фон	0,045 (0,024 0,076)	0,01	0,11	0,069±0,028
	5-е сут СИ	0,036 (0,019; 0,053)	0,011	0,109	
	7 сут после СИ	0,072 (0,038; 0,093)	0,011	0,109	
IgM, г/л	фон	0,016 (0,011; 0,027)	0,01	0,033	0,055±0,011
	5-е сут СИ	0,012 (0,011; 0,0132)	0,01	0,014	
	7 сут после СИ	0,016 (0,011; 0,025)	0,01	0,029	

Примечание. \* – данные представлены в виде медианы, (25-й процентиль; 75-й процентиль).



мо (на 30%,  $p < 0,05$ ) в капиллярном звене верхней челюсти (рис. 3, А).

У 6 обследуемых на 5-е сут СИ наблюдалось одновременное снижение скорости кровотока в артериоло-венулярном звене и увеличение линейных скоростей в капиллярном звене МЦР пародонта. Наиболее значимое увеличение кровотока (до 86%,  $p < 0,05$ ) наблюдали в капиллярном звене МЦР нижней челюсти. Однако, рассчитанный индекс резистивности: отношение разницы между максимальной систолической ( $V_s$ ) и диастолической скоростью ( $V_{ad}$ ) к максимальной систолической скорости кровотока, снизился на 32,5 % относительно фона.

$V_s - V_{ad} / V_s$ , где:

$V_s$  – максимальная систолическая скорость,

$V_{ad}$  – средняя диастолическая скорость в (см/с)

Такое изменение обусловлено морфофункциональной перестройкой МЦР – дилатацией емкостных сосудов (венул) с частичным обеднением капиллярного звена. Это свидетельствует о реакции веноулярной компоненты на условия модельной микрогравитации, что отражает перераспределение жидких сред в краниальном направлении (рис. 3, Б).

На 7-е сут после СИ сохранялась тенденция увеличения показателя  $V_{as}$ , остальные значения приближались к фоновым.

В процессе СИ у двух испытуемых проявилась тенденция к гипертонической реакции: отмечался подъем артериального давления до 135/80 и выше. По данным ВУЗДФ увеличение линейных скоростей в МЦР у этих обследуемых составило более 79%, средняя систолическая скорость в ходе эксперимента воз-

росла в 2,5 раза. При этом на доплерограмме визуально наблюдалось преобладание артериолярного кровотока с четко выраженными пульсовыми волнами.

### Обсуждение

В опубликованных ранее работах [12, 13] поднимался вопрос о состоянии естественных барьеров микробной колонизации, формируемых организмом человека: 1 – барьера, сформированного протективной микрофлорой, 2 – барьера, представленного собственными покровными тканями и слизистыми оболочками, и 3 – барьера, формируемого факторами клеточного и гуморального иммунитета. Отмечалось, что в условиях космического полета, или под воздействием его факторов имитированных на Земле, происходят нарушения во всех 3 барьерах, что служит признаком развития синдрома нарушения колонизационной резистентности человека в искусственной среде обитания. В предыдущих работах сообщалось о подобном синдроме, развивающемся в кишечнике, коже и носоглотке. В настоящем исследовании получены доказательства, что зубочелюстная система претерпевает те же изменения, и это может приводить к развитию воспалительных заболеваний пародонта в условиях СИ.

Таким образом, под влиянием микрогравитации выявлены нарушения, как минимум, в 3 барьерах микробной колонизации пародонта, которое может быть представлено следующим образом. В 1-м барьере происходит широкая экспансия пародонтопатогенов, во 2-м (в ткани пародонта) снижается интенсивность капиллярного кровотока, по-видимому, за счёт токсических факторов пародонтопатогенов, которое приводит

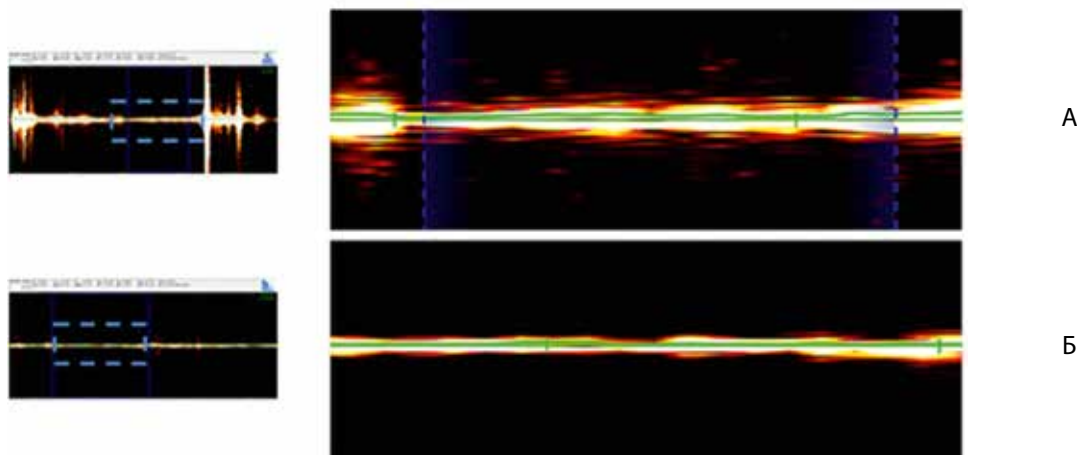


Рис. 2. Пример доплерограмм пародонта верхней челюсти у испытуемого: А – фон, Б – 5-е сут «сухой» иммерсии.

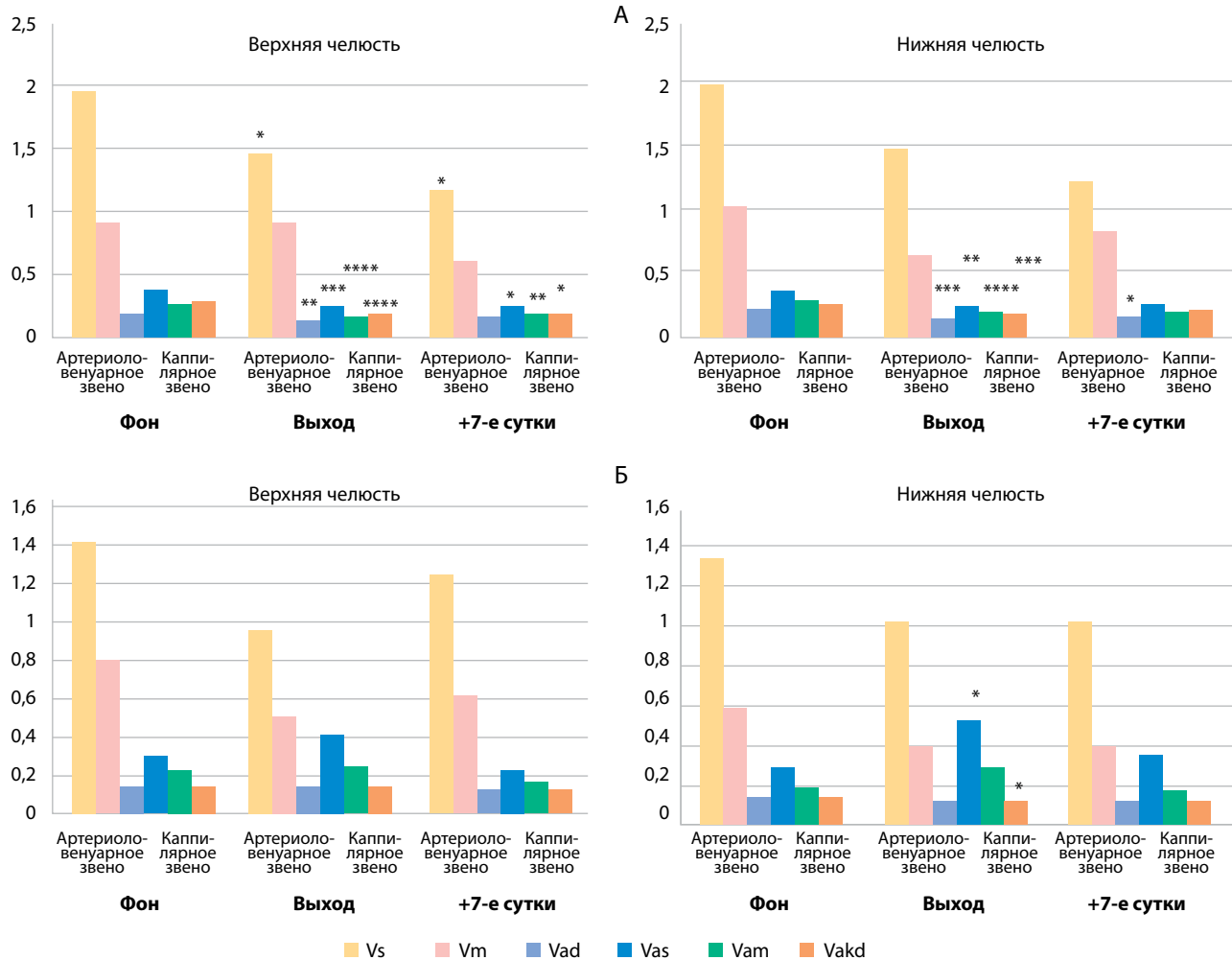


Рис. 3. Динамика показателей кровотока в МЦР (в см/с) по данным ВУЗДФ: А – группа 12 человек, Б – группа 6 человек. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001.

к гипоксии тканей, усугубляет нейродистрофические нарушения и таким образом снижает барьерные функции пародонта, и, наконец, эти процессы сопровождаются неблагоприятными изменениями в количественных показателях иммуноглобулинов, как 3-го барьерного фактора – мукозального иммунитета.

Работа выполнена в рамках тем: СЧ ОКР «МКС (Наука)» ИМБП, 64.2 ФНИ РАН.

**Участие авторов:**

Концепция и дизайн исследования – Ильин В.К., Соловьева З.О., Скедина М.А.

Сбор и обработка материала – Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Ковалёва А.А., Морозова Ю.А.

Статистическая обработка – Ковалёва А.А.

Написание текста – Ильин В.К., Царев В.Н., Николаева Е.Н., Соловьева З.О., Скедина М.А.

Редактирование – Ильин В.К., Соловьева З.О., Ковалёва А.А.

**Литература**

1. *Пародонтология*: Национальное руководство. Под ред. чл.-корр РАН проф. О.О. Янушевича, проф. Л.А. Дмитриевой. М.; ГЭОТАР-Медиа; 2019.
2. Локтионов А.Л., Конопля А.И., Лунев М.А., Караулов А.В. Имунные и оксидантные нарушения в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта. *Иммунология*. 2015; 36(5): 319-28.
3. *Микробиология, вирусология, иммунология полости рта*. Под ред. проф. Царева В.Н. М.; ГЭОТАР-Медиа; 2019.
4. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии – основной фактор возникновения и разви-

- тия пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; (5): 101-12.
5. Зеленова Е.Г., Заславская М.И., Салина Е.В., Рассанов С.П. *Микрофлора полости рта: норма и патология*. Н. Новгород: НГМА; 2004. 6. Сашкина Т.И., Зайченко О.В., Маркина М.Л., Салдусова Л.В. Соколова С.И., Фасхутдинов Д.К. Нормативные показатели поступления секреторного иммуноглобулина в ротовую полость. *Dental forum*. 2013; 2: 14-6.
  7. Томиловская Е.С. Эксперимент с 5-суточной иммерсией: задачи, объем, структура исследований, особенности методических подходов. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2011; 45(6): 3-7.
  8. Kim D., Park S.-H. Effects of age, sex, and blood pressure on the blood flow velocity in dental pulp measured by Doppler ultrasound technique. *Microcirculation*. 2016; 23: 523-9.
  9. Orekhova L.Y., Barmasheva A.A. Doppler flowmetry as a tool of predictive, preventive and personalised dentistry. *EPMA Journal*. 2013; 4(1), 21.
  10. Kerdvongbundit V., Vongsavan N., Soo-ampon S., Phankosol P., Hasegawa A. Microcirculation of the healthy human gingiva. *Odonatology*. 2002; 90(1): 48-51.
  11. Kerémi B., Csempesz F., Vág J., Györfi A., Fazekas A. Blood flow in marginal gingiva as measured with laser Doppler flowmetry. *Fogorvosi szemle*. 2000; 93(6): 163-8.
  12. Ильин В.К., Воложин А.И., Ви́ха Г.В. *Колонизационная резистентность организма в измененных условиях обитания*. М.: Наука; 2005.
  13. Ильин В.К., Скедина М.А., Соловьева З.О. Контроль состояния тканей пародонта при воздействии факторов космического полета. В кн.: *Гагаринский сборник: материалы XLIII Общественно-научных чтений, посвященных памяти Ю.А. Гагарина*. Гагарин: БФ Мемориального музея Ю.А. Гагарина; 2016: 260-7.
  3. Tsarev V.N. et al. *Microbiology, virology, immunology of the oral cavity*. [Mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya polosti rta]. Moscow; GEHOTAR-Media; 2016. (in Russian)
  4. Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V. Periodontopathogenic bacteria of the main factors of emergence and development of periodontitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; (5): 101-12. (in Russian)
  5. Zelenova E.G., Zaslavskaya M.I., Salina E.V., Rassanov S.P. *Microflora of the oral cavity: norm and pathology*. [Mikroflora polosti rta: norma i patologiya]. Nizhny Novgorod; NGMA; 2004. (in Russian)
  6. Sashkina T.I., Zaychenko O.V., Markina M.L., Saldusova I.V., Sokolova S.I., Fashutdinov D.K. Normative rates of secretory immunoglobulin secretion in oral cavity. *Dental forum*. 2013; 2: 14-6. (in Russian)
  7. Tomilovskaya E.S. Experiment with 5-day dry immersion: objectives, content and structure of the investigations, methods. *Aviakosmicheskaya i ehkologicheskaya meditsina*. 2011; 45(6): 3-7. (in Russian)
  8. Kim D., Park S.-H. Effects of age, sex, and blood pressure on the blood flow velocity in dental pulp measured by Doppler ultrasound technique. *Microcirculation*. 2016; 23: 523-9.
  9. Orekhova L.Y., Barmasheva A.A. Doppler flowmetry as a tool of predictive, preventive and personalised dentistry. *EPMA Journal*. 2013; 4(1): 21.
  10. Kerdvongbundit V., Vongsavan N., Soo-ampon S., Phankosol P., Hasegawa A. Microcirculation of the healthy human gingiva. *Odonatology*. 2002; 90(1): 48-51.
  11. Kerémi B., Csempesz F., Vág J., Györfi A., Fazekas A. Blood flow in marginal gingiva as measured with laser Doppler flowmetry. *Fogorvosi szemle*. 2000; 93(6): 163-8.
  12. Ilyin V.K., Volozhin A.I., Viha G.V. *Colonization resistance of the organism in changed habitat conditions*. [Kolonizatsionnaya rezistentnost' organizma v izmenennykh usloviyakh obitaniya]. Moscow; Nauka; 2005. (in Russian)
  13. Ilyin V.K., Skedina M.A., Soloviova Z.O. *Monitoring the state of periodontal tissues under the influence of space flight factors*. [Kontrol' sostoyaniya tkaney parodonta pri vozdeystvii faktorov kosmicheskogo poleta]. In: *Gagarin's collection: materials of the XLIII Social and scientific readings dedicated to the memory of Yu.A. Gagarin*. [Gagarinskiy sbornik: materialy XLIII Obshchestvenno-nauchnykh chteniy, posvyashchennykh pamyati Yu.A. Gagarina. Gagarin, 9-12 marta, 2016]. Gagarin; 2016: 260-77. (in Russian)

## References

1. Dmitrieva L.A. (Eds.) *Periodontics: National leadership*. [Parodontologiya: natsional'noe rukovodstvo]. Moscow; GEHOTAR-Media; 2013. (in Russian)
2. Loktionov A.L., Konoplya A.I., Lunev M.A., Karauiov A.V. Immune and oxidant disorders in the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *Immunologiya*. 2015; 36(5): 319-28. (in Russian)

## Сведения об авторах:

**Ильин Вячеслав Константинович**, доктор мед. наук, проф., зав. отделом санитарно-гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания, зав. лаб. микробной экологии человека ГНЦ РФ-ИМБП РАН, e-mail: piton2004@bk.ru;

**Царев Виктор Николаевич**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова;

**Скедина Марина Анатольевна**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. научно-организационного отдела ГНЦ РФ-ИМБП РАН;

**Соловьева Зоя Олеговна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. микробной экологии человека ГНЦ РФ-ИМБП РАН;

**Николаева Елена Николаевна**, доктор мед. наук, проф. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова;

А.И. Евдокимова;

**Ковалёва Анна Александровна**, науч. сотр. научно-организационного отдела ГНЦ РФ-ИМБП РАН;

**Рыкова Марина Петровна**, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологии иммунной системы ГНЦ РФ-ИМБП РАН;

**Антропова Евгения Николаевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. физиологии иммунной системы ГНЦ РФ-ИМБП РАН;

**Усанов Нонна Альбертовна**, ст. науч. сотр. лаб. микробной экологии человека ГНЦ РФ-ИМБП РАН;

**Морозова Юлия Алексеевна**, науч. сотр. лаб. микробной экологии человека ГНЦ РФ-ИМБП РАН.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 618-019

Досова С.Ю., Стольникова И.И., Червинец Ю.В., Червинец В.М.

## Исследование вагинального микробиома женщин с привычным невынашиванием беременности, а также спектра выделяемых ими газовых сигнальных молекул

ФГБУО ВО «Тверской государственный медицинский университет»,  
г. Тверь, Россия, ул. Советская, д. 4

**Введение.** Проблема невынашивания беременности в настоящее время не теряет своей актуальности. Частота данной патологии по оценкам различных авторов составляет от 2 до 5% в общей популяции. Как известно, инфекционный фактор играет весьма значимую роль в генезе привычного невынашивания. Вопрос об этиологической роли инфекции в привычном невынашивании широко дискутируется в литературе. **Цель исследования** – анализ микробиома влагалища здоровых женщин и женщин с привычным невынашиванием беременности, а также спектра выделяемых лактобациллами газовых сигнальных молекул, играющих важную роль в поддержании здоровой жизнедеятельности организма. **Методика.** Забор материала из влагалища производили стерильным тампоном на полистироловой палочке с площади 1 см<sup>2</sup> и в течение 2 ч доставляли в бактериологическую лабораторию. Для выделения факультативно анаэробных и аэробных бактерий использовали питательные среды: Эндо агар для энтеробактерий, маннит-солевой агар (M118) для стафилококков, микрококков, для выявления лецитиназной активности – агар Бэрда-Паркера и так далее. Культивирование проводили при температуре 37 °С в течение 24-48 ч. Количество колоний выражали в Ig КОЕ/мл. Продукцию газовых сигнальных молекул (H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, NO, H<sub>2</sub>S) определяли с помощью метода газовой хроматографии на приборе Хроматэк-кристалл 5000.2. Количество выделенных газов измеряли в ppm (млн<sup>-1</sup>). **Результаты.** Спектр основного микробиома влагалища здоровых женщин в возрасте 19-23 лет представлен бактериями нормальной микрофлоры родов *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* (эпидермальные штаммы). Условно-патогенные грибы рода *Candida*, бактероиды, золотистый стафилококк, стрептококки, микрококки, вейлонеллы, гарднереллы и актиномицеты выделялись в редких случаях. Различные штаммы лактобацилл выделялись у 91% здоровых женщин. Среди газовых молекул, продуцируемых лактобациллами, преобладали: CO<sub>2</sub>, CO и NO. Установлены дисбиотические нарушения микробиома влагалища у небеременных женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе. Также у данной группы пациентов отмечено снижение продукции газовых сигнальных молекул: CO и NO, и повышение продукции H<sub>2</sub>S и CH<sub>4</sub>. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют об угнетении иммунного ответа у данной категории больных и необходимости коррекции дисбиотических нарушений еще на этапе прегравидарной подготовки.

**Ключевые слова:** вагинальный микробиом; газовые сигнальные молекулы; лактобациллы.

**Для цитирования:** Досова С.Ю., Стольникова И.И., Червинец Ю.В., Червинец В.М. Исследование вагинального микробиома женщин с привычным невынашиванием беременности, а также спектра выделяемых ими газовых сигнальных молекул. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 84-90.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.84-90

**Для корреспонденции:** Досова С.Ю., e-mail: snegaru1@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской помощи

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

**Поступила** 18.06.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Dosova S.Yu., Stolnikova I.I., Chervinets Yu.V., Chervinets V.M.

### The vaginal microbiome and the spectrum of gaseous signal molecules released by lactobacillus in women with habitual miscarriage

Tver State Medical University,  
Sovetskaya Str. 4, Tver 170000, Russia

**Background.** The issue of habitual miscarriage is very important at the present time. Prevalence of this pathology is approximately 2-5%. Infection considerably contributes to the pathogenesis of habitual miscarriage. The etiology of infection has been widely

discussed in the literature. **Aim.** To study the vaginal microbiome of healthy women and women with habitual miscarriage as well as the spectrum of gaseous signal molecules released by lactobacillus, which is essential for maintaining healthy vital activity. **Method.** Samples of vaginal material were collected with a sterile swab on a polystyrene stick from an area of 1 cm<sup>2</sup>; the samples were delivered to the bacteriological laboratory within 2 hours. Facultative anaerobic and aerobic bacteria were isolated using the following nutrient media: Endo agar for enterobacteria; mannitol-salt agar (M118) for staphylococci and micrococci; Baird-Parker agar for detection of lecithinase activity, etc. Cultivation was performed at 37°C for 24-48 hours. The number of colonies was expressed in lg CFU/ml. Production of gaseous signaling molecules (H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, NO, and H<sub>2</sub>S) was determined using a Chromatech Crystal 5000.2 gas chromatograph. The amount of gases was measured in ppm. **Results.** The major vaginal microbiome spectrum of healthy women (19-23 years) was represented by normal microbiota bacteria of the genera *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, and *Staphylococcus* (epidermal strains). Opportunistic fungi of the genera *Candida*, *Bacteroides*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococci*, *Micrococci*, *Weylonella*, *Gardnerella*, and *Actinomycetes* were found rarely. Lactobacillus strains were isolated from 91% of healthy women. Lactobacilli produced most of CO<sub>2</sub>, CO, and NO molecules. Dysbiotic vaginal microbiome was found in non-pregnant women with a history of habitual miscarriage. These patients also had decreased production of CO and NO, and increased production of H<sub>2</sub>S and CH<sub>4</sub>. **Conclusion.** The study demonstrated suppression of the immune response in this category of patients. Dysbiosis requires correction prior to pregnancy.

**Keywords:** vaginal microbiome, gas signaling molecules, lactobacilli.

**For citation:** Dosova S.Yu., Stolnikova I.I., Chervinets Yu.V., Chervinets V.M. The vaginal microbiome and the spectrum of gaseous signal molecules released by lactobacillus in women with habitual miscarriage. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 84-90. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.84-90

**For correspondence:** *Dosova Snezhana Yurevna*, assistant of department of Obstetric and gynecology TSMU, e-mail [snegar1@mail.ru](mailto:snegar1@mail.ru)

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

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

**Received** 17.07.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

Вагинальный микробиом женщины, который содержит примерно 10% женской микробиоты, играет исключительную роль в поддержании в физиологической норме флоры мочеполового тракта, предупреждая развитие в нем патологических изменений.

Вагинальный микробиом, содержащий не менее 50 видов микроорганизмов, находится в тесной симбиотической связи со структурными компонентами влагалища и другими биотопами микробной экологической системы, а также с функциональной активностью всей мочеполовой системы, особенно ее иммунной и эндокринной составляющей.

Эстрогены способствуют насыщению эпителия гликогеном, который в качестве основного питательного субстрата используют микроорганизмы, способные к его метаболизму [1, 3, 4]. Это одна из причин доминирующего положения в составе вагинального микробиома здоровой женщины репродуктивного возраста штаммов лактобацилл, для которых гликоген является оптимальным субстратом для обеспечения жизнедеятельности.

Дополнительными факторами селективных преимуществ вагинальных лактобацилл по сравнению с

другими микроорганизмами является высокая скорость размножения во влажной слизи, адгезия к поверхности эпителиоцитов с формированием биопленки, синтез перекиси водорода, лизоцима, бактериоцинов, стимуляция местного иммунитета [6]. Благодаря этим свойствам лактобациллы в процессе эволюции оказались наиболее приспособленными к колонизации влагалища и конкурентному вытеснению из него других микроорганизмов. Об этом свидетельствует высокая концентрация лактобацилл в вагинальном секрете (до 10<sup>9</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>).

Помимо лактобацилл, в составе вагинального микробиома всегда присутствуют факультативные микроорганизмы. Их популяционный уровень в норме не превышает 3–4%, однако видовой состав достаточно разнообразен [1, 2]. Все эти микроорганизмы являются условно-патогенными, и при снижении активности и популяционного уровня нормальной микробиоты могут вызывать различные заболевания.

При нормальном состоянии микробиома они не продолжительно персистируют в вагинальном биотопе, не увеличивая уровень своих популяций выше 10<sup>4</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> и не вызывая патологических изменений.

Коммуникации между микроорганизмами реализуются посредством регуляторной системы, получившей название *quorum sensing*, в которой механизм авторегуляции развития микробных популяций осуществляется при достижении развивающейся культурой определенной плотности популяции [2]. Микроорганизмы в биопленке непрерывно обмениваются между собой сигнальными молекулами, активирующими или приостанавливающими развитие сообщества.

Цель исследования – анализ состава и функциональной активности микробиома влагалища здоровых женщин и женщин с привычным невынашиванием беременности, а также выявление продукции простых сигнальных молекул у лактобацилл.

### Методика

Обследуемый контингент был разделен на 2 группы:

Основная группа – небеременные женщины, страдающие привычным невынашиванием (ПНБ) в анамнезе на этапе прегравидарной подготовки – 30 человек

Группа контроля – здоровые небеременные женщины в возрасте 19-23 лет – 30 человек.

Материал из влагалища забирали в 1-ю фазу менструального цикла утром до мочеиспускания стерильным тампоном на полистироловой палочке с площадью 1 см<sup>2</sup> и в течение 2 ч доставляли в бактериологическую лабораторию.

Для выделения факультативно анаэробных и аэробных бактерий использовали следующие среды – Эндо агар для энтеробактерий, маннит-солевой агар (M118) для стафилококков и микрококков, для выявления лецитиназной активности – агар Бэрда-Паркера, M 304 – стрептококковый агар, МРС – лактоагар, Сабуро декстроза агар – для дрожжевых грибов, Колумбия кровяной агар – для энтерококков, бацилл, а также хромогенные среды фирмы «HiMedia». Для культивирования анаэробов использовали среды бифидоагар и кровяной Шедлер агар. Анаэробные условия создавались в анаэрогатах при помощи газогенераторных пакетов BBL. Культивирование проводили при температуре 37 °С в течение 24-48 ч. Количество колоний выражали в lg КОЕ/мл. Идентификация осуществлялась по биохимической активности с применением API систем (bioMérieux). В работе был использован программно-аппаратный комплекс Диаморф Цито (Диаморф, Россия).

Производство газовых сигнальных молекул (H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, NO, H<sub>2</sub>S) определяли с помощью метода газовой хроматографии на приборе Хроматэк-кристалл 5000.2, оснащенного детектором по теплопроводности (ДТП), пламенно-ионизационным детек-

тором (ПИД) и электрозахватным детектором (ЭЗД), подключенными последовательно, что обеспечивает одновременный анализ горючих и негорючих компонентов. ПИД используется для детекции углеродсодержащих газов (CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>), ЭЗД для определения NO, H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>O, а ДТП – для H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>. Разделение газовой смеси проводится на трехметровой надосадочной и капиллярной хроматографической колонках, заполненной полимером MN270, фракции 100-125 мкм. В качестве эталона для калибровочных кривых используются чистые газы (CO, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, Ar, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, NO) с объемной долей компонентов (производитель ООО «Мониторинг» Санкт-Петербург). Анализ проводится в режиме программирования температуры в течение от 6 до 15 мин. Количество выделенных газов измеряли в ppm<sub>1</sub> (от англ. *parts per million*, – «частей на миллион», млн ) 1 ppm = 0,001 mg/mL.

Статистическая обработка данных и все расчеты производились с использованием пакетов программы IBM SPSS Statistics version 22 (Официальная лицензия от 21.02.2018 г.) и WINPEPI version 11.65 (J.H. Abramson, 2016).

### Результаты

В материале из влагалища 33 здоровых женщин (рис. 1) чаще выделялись лактобациллы (63,6% выявлений), энтерококки (57,6%), бифидобактерии (48,5%). Реже выделялись эпидермальные стафилококки, пептококки (36,4%), пептострептококки (33,3%), бациллы (27,3%), грибы рода *Candida* (21,2%), бактериоды (18,2%) и менее 10% проходило на золотистый стафилококк, стрептококки, микрококки, вейлонеллы, гарднереллы, актиномицеты.

Количество микроорганизмов варьировало (рис. 2) от 2,2 lg КОЕ/см<sup>2</sup> у золотистого стафилококка до 6,77 lg КОЕ/см<sup>2</sup> у гарднерелл. Количество лактобацилл в среднем составляло 3,8 lg КОЕ/см<sup>2</sup>, количество энтерококков, бифидобактерий, пептококков, пептострептококков, бактериодов, микрококков, вейлонелл – более 4 lg КОЕ/см<sup>2</sup>.

Микроорганизмы выделялись в ассоциации от 2 до 6, чаще лактобациллы, энтерококки, пептококки, пептострептококки, бифидобактерии, бактериоды.

Из исследуемого материала выделено 30 штаммов лактобацилл. С помощью API систем идентифицированы различные их виды: *L.rhamnosus*, *L.salivarius*, *L.acidophilus*, *L.fermentum*, *L.plantarum*, *L.buchneri*, *L.paracasei spp.paracasei*.

В 1-й группе небеременных с проблемой невынашиваемости беременности (рис. 3) энтерококки встречались у 60% женщин, в 40% – стрептобациллы и *Va-*

*cillus subtilis*, в 26,7% – эпидермальный стафилококк и *Klebsiella pneumoniae*, в 20% – пептострептококки, в 13,3% – кишечная палочка и вейлонеллы и в 6,7% – золотистый стафилококк, стоматококки, протей, клостридии, бактероиды, гарднереллы и лактобациллы.

В количестве более 4 lg КОЕ/см<sup>2</sup> (от 4,02 до 6,95) выделялись *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*, пептококки, пептострептококки, клостридии, вейлонеллы, стрептобациллы и гарднереллы. В количестве ниже 4 lg КОЕ/см<sup>2</sup> (от 2,63 до

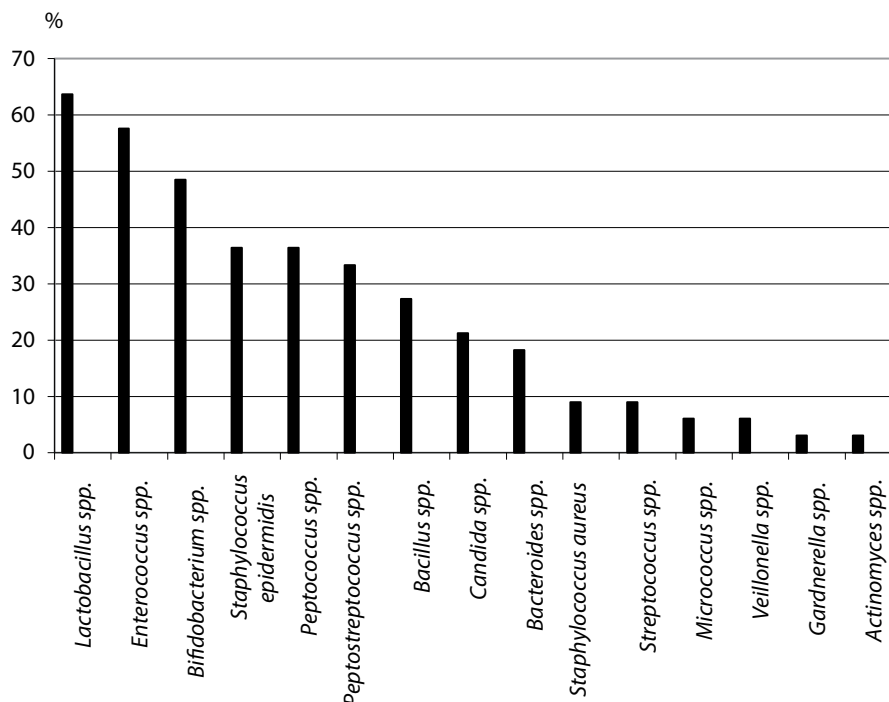


Рис. 1. Спектр и частота встречаемости микроорганизмов влагалища у здоровых девушек.

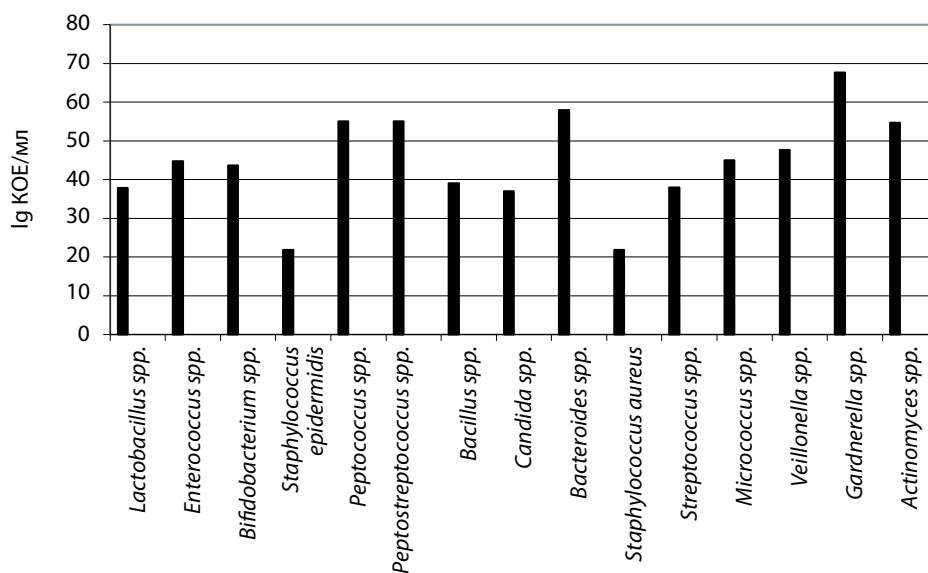


Рис. 2. Количество микроорганизмов влагалища у здоровых девушек.

3,83) высевались эпидермальный стафилококк, микрококки, энтерококки, стоматококки, бактероиды, кандиды, бациллы и лактобациллы.

В процессе своей жизнедеятельности лактобациллы вырабатывают разнообразные газовые сигнальные молекулы, но наиболее значимыми в группе здоровых женщин оказались: CO<sub>2</sub>, CO и NO. Все выделенные штаммы лактобациллы обеспечивают большую концентрацию. CO<sub>2</sub> (Me -35543 ppm), и активно потребляют O<sub>2</sub> (-7 ppm) и N<sub>2</sub> (-18 ppm).

Продукция CO была зарегистрирована у 23 штаммов лактобацилл (76,7%), Me – 218,5 ppm. У 7 штаммов (23,3%) обнаружены отрицательные результаты, т.е. они используют CO. Окись азота вырабатывают 27 штаммов лактобацилл в разных концентрациях, в основном относящимся к видам *Lactobacillus fermentum* и *L.plantarum*. У 9 штаммов (30%) концентрация NO ко-

лебалась от 100 до 23752 ppm, Me Медиана? составила 3568 ppm. У 18 штаммов бактерий (60%) концентрация окиси азота варьировала от 10 до 100 ppm (в среднем 45,3 ppm), и 3 штамма этот газ не выделяли.

Продукция других газов (H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S) была очень низкой, составляя не более 3 ppm.

Что касается пациенток с привычным невынашиванием беременности, то наиболее значимые результаты были получены также по трем газовым сигнальным молекулам – CO, NO и CO<sub>2</sub>. Однако данные цифры оказались значительно ниже, чем в группе контроля: продукция NO составила в Me – 322 ppm, в то время как у здоровых женщин – Me 3568 ppm. Данные различия являются статистически значимыми (p=0,0054 Критерий Манна-Уитни 262). Также статистически значимо ниже оказалась продукция CO: Me – 51,3 ppm, (p=0,0258, критерий Манна-Уитни - 289). Продукция же 2 других

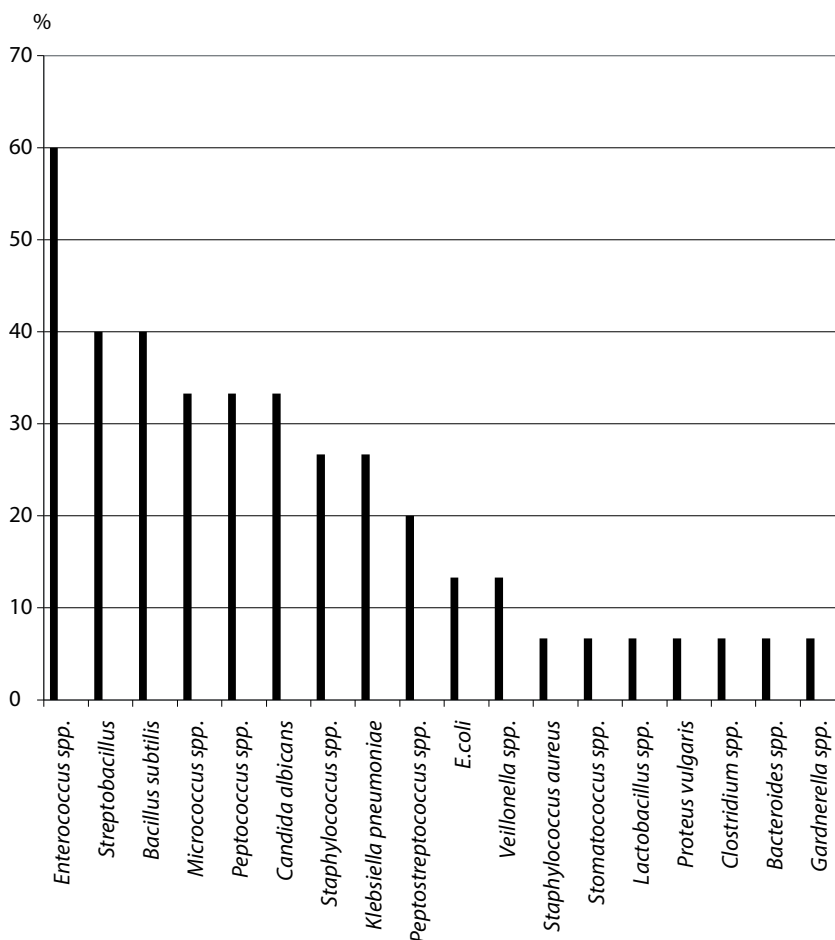


Рис. 3. Частота встречаемости микроорганизмов влагалища у небеременных женщин с проблемой невынашиваемости беременности.



газов (H<sub>2</sub>S и CH<sub>4</sub>) в основной группе также была статистически значимо выше, (для H<sub>2</sub>S Me = 7,4, критерий Манна-Уитни 13,5, p=0,01, для CH<sub>4</sub> Me = 2,81, p<0,0001, критерий Манна-Уитни – 100).

За последние годы проведены многочисленные исследования, показывающие чрезвычайно важную роль данных газообразных веществ в организме человека. Так, окись азота способствует поддержанию гомеостаза сосудистой системы, вызывая расслабление гладких мышц стенок сосудов и задерживая их рост и формирование утолщений интимы сосудов (гипертензивное ремоделирование сосудов), а также адгезию и агрегацию тромбоцитов, адгезию лейкоцитов к эндотелию сосудов. Кроме того, NO секретируется фагоцитами в процессе иммунного ответа в качестве одного из свободных радикалов и является высокотоксичным для бактерий и внутриклеточных паразитов. Эндогенный угарный газ (CO) – также одна из важных эндогенных сигнальных молекул, модулирует функции ЦНС и сердечно-сосудистой системы, ингибирует агрегацию тромбоцитов и их адгезию к стенкам сосудов. Этот газ является одним из важнейших медиаторов ауторегуляции кровотока. Он является мощным вазодилататором, оказывает положительное хронотропное и инотропное действие на миокард, а также влияет на деятельность иммунной системы, повышает сопротивляемость организма к бактериальным и вирусным инфекциям, участвует в обмене биологически активных веществ, влияет на проница-

емость клеточных мембран и активность ферментов. CO<sub>2</sub> регулирует возбудимость нервных клеток, стабилизирует интенсивность продукции гормонов и степень их эффективности, участвует в процессе связывания белками ионов кальция и железа [5-9].

### Выводы

Таким образом, установлено, что спектр основного микробиома влагалища здоровых женщин в возрасте 19-23 лет отличается от такового у небеременных женщин с проблемой невынашиваемости беременности.

Установлены дисбиотические нарушения микробиома влагалища у небеременных женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе. Также у данной группы пациенток отмечено снижение продукции газовых сигнальных молекул: CO и NO, и повышение продукции H<sub>2</sub>S и CH<sub>4</sub>. На фоне уменьшения встречаемости лактобацилл, которые должны обеспечивать регуляторную функцию различных сторон жизнедеятельности организма женщин, условно-патогенные бактерии своими метаболитами могут играть отрицательную роль, не только поддерживая воспалительные процессы во влагалище, но и негативно действовать на плод. Полученные результаты свидетельствуют об угнетении иммунного ответа у данной категории больных и необходимости коррекции дисбиотических нарушений еще на этапе прегравидарной подготовки.

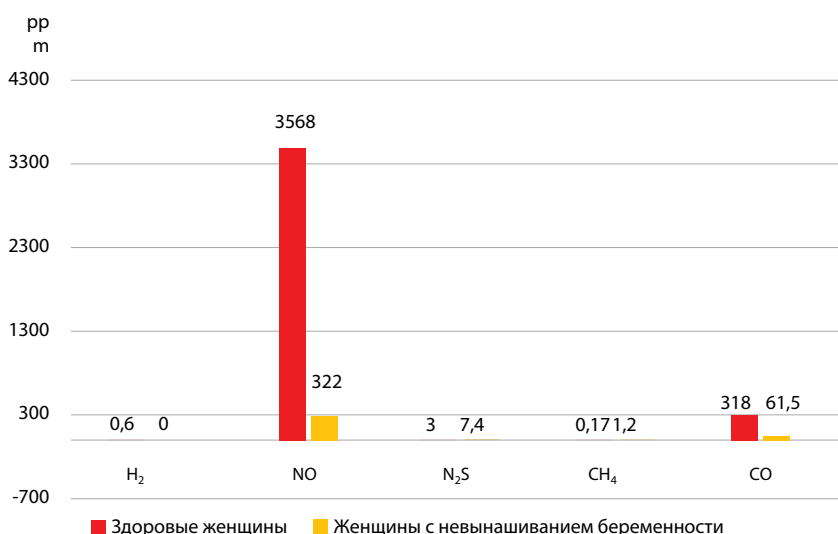


Рис. 4. Продукция газовых сигнальных молекул лактобациллами в основной и контрольной группах.

**Участие авторов:**

Концепция и дизайн исследования – С.Ю. Досова, И.И. Стольникова, В.М. Червинец  
 Сбор и обработка материала – С.Ю. Досова, Ю.В. Червинец  
 Статистическая обработка – С.Ю. Досова, Ю.В. Червинец  
 Написание текста – С.Ю. Досова, В.М. Червинец, Ю.В. Червинец  
 Редактирование – И.И. Стольникова, Ю.В. Червинец

**Литература**

- Анкирская А.С. Бактериальный вагиноз. *Акушерство и гинекология*. 2005; 3: 10–3.
- Гинцбург А.Л., Ильина Т.С., Романова Ю.М. «Quorum sensing» или социальная жизнь бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии*. 2003; 5: 86–93.
  - Кира Е.Ф., Берлев И.В., Молчанов О.Л. Особенности течения беременности, родов и послеродового периода у женщин с дисбиотическими нарушениями влагалища. *Журнал акушерства и женских болезней*. 1999; XLVII(2): 8–11.
  - Плотко Е.Э., Донников А.Е., Ворошилина Е.С., Хаютин Л.В. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? *Акушерство и гинекология*. 2011; 1: 66–70.
  - Янковский Д.С., Дымент Г.С. Улучшение репродуктивного здоровья женщины путем оптимизации микроэкологии пищеварительного и урогенитального тракта. *Репродукт. здоровье женщины*. 2007; 3: 148–54.
  - Aleshkin V.A., Voropaeva E.A., Shenderov B.A. Vaginal microbiota in healthy women and patients with bacterial vaginosis and nonspecific vaginitis. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2006; 18: 71–4.
  - Li L., Moore P.K. An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules. *Biochemical Society Transactions*. – Great Britain. 2007; 35(5): 1138–41.
  - Rui Wang. Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochemical Science*. 2014; 39(5): 227–32.
  - Zhou X., Bent S.J., Schneider M.G., Davis C.C., Islam M.R., Forney L.J. Characterization of vaginal microbial communities in adult-healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*. 2004; 2565–73.
  - Червинец Ю.В., Червинец В.М., Миронов А.Ю. *Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта*. Монография Тверь. 2016, ред.-изд. Центр Тверь. гос. мед. университета.
  - Chervinets Y., Chervinets V., Shenderov B., Belyaeva E., Troshin A., Lebedev S., Valery Danilenko. Adaptation and probiotic potential of

lactobacilli, isolated from the oral cavity and intestines of healthy people. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2018; 10(1): 22–33. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9348-9>.

- Червинец В.М., Червинец Ю.В., Беляева Е.А., Петрова О.А., Ганина Е.Б. Метаболическая активность высокоантагонистических штаммов лактобацилл здорового человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018; 4: 11–7.

**References**

- Ankirkaya, A.S. Bacterial vaginosis. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2005; 3: 10–3.
- Ginzburg A.L., Ilyina T.S., Romanova Yu.M. «Quorum sensing» or social life of bacteria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunologii*. 2003; 5: 86–93. (in Russian)
- Kira E. F., Berlev I. V., Molchanov O. L. Features of the course of pregnancy, childbirth and the postpartum period at women with vaginal dysbiotic disorders. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 1999; XLVII(2): 8–11. (in Russian)
- Plotko E.N., Donnikov A.E., Voroshilina E.S., Hayutin L.V. The biocenosis of the vagina from the point of view of quantitative PCR: what is normal? *Akusherstvo i ginekologiya*. 2011; 1: 66–70. (in Russian)
- Yankovsky D.S., Dymont G.S. Improving the reproductive health of women by optimizing the microecology of the digestive and urogenital tract. *Reproduktivnoe zdorov'e zhenshchiny*. 2007; 3: 148–54. (in Russian)
- Aleshkin V.A., Voropaeva E.A., Shenderov B.A. Vaginal microbiota in healthy women and patients with bacterial vaginosis and nonspecific vaginitis. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2006; 18: 71–4.
- Li L., Moore P.K. Moore. An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules. *Biochemical Society Transactions*. – Great Britain. 2007; 35 (5): 1138–41.
- Rui Wang. Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochemical Science*. 2014; 39(5): 227–32.
- Zhou X., Bent S.J., Schneider M.G., Davis C.C., Islam M.R., Forney L.J. Characterization of vaginal microbial communities in adult-healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*. 2004; 2565–73.
- Chervinets Yu.V., Chervinets V.M., Mironov A.Yu. *Symbiotic relationship of lactobacilli and microorganisms of gastrointestinal tract. Monography Tver. [Simbioticheskie vzaimootnosheniya laktobatsill i mikroorganizmov zheludochno-kishechnogo trakta. Monografiya Tver]*. 2016, ed. The Center Of Tver state university. (in Russian)
- Chervinets Y., Chervinets V., Shenderov B., Belyaeva E., Troshin A., Lebedev S., Danilenko V. Adaptation and probiotic potential of lactobacilli, isolated from the oral cavity and intestines of healthy people. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2018; 10(1): 22–33. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9348-9>.
- Chervinets V. M., Chervinets Yu. V., Belyaeva E. A., Petrova O. A., Ganina E. B. Metabolic activity of high-antagonistic strains of healthy human lactobacilli. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunologii*. 2018; 4: 11–7.

**Сведения об авторах:**

**Досова Снежана Юрьевна**, аспирант, ассистент каф. акушерства и гинекологии ТГМУ;  
**Стольникова Ирина Ивановна**, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. акушерства и гинекологии ТГМУ;  
**Червинец Вячеслав Михайлович**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии;  
**Червинец Юлия Вячеславовна**, доктор мед. наук, проф., каф. микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Мамедзаде А.Я., Алиев М.Х., Гусейнова Ш.М., Агамалыева У.Д., Ахмедзаде У.И., Шахвердиев Г.Г.

## Эндотелиальная дисфункция и нарушение лимфатического дренажа тканей в патогенезе диабетических микроангиопатий

Азербайджанский Медицинский Университет,  
1022Az, г. Баку, Азербайджан, ул. Бакиханова, д. 23

К наиболее грозным осложнениям сахарного диабета относят осложнения сосудистого генеза. При этом роль лимфатической системы в патогенезе микроангиопатий исследована недостаточно. **Цель исследования** – изучение роли перекисного окисления липидов и эндотелиальной дисфункции в нарушениях свертываемости лимфы и лимфатического дренажа тканей при моделировании стрептозотоцинового сахарного диабета и их значение в патогенезе диабетических микроангиопатий. **Методика.** Эксперименты выполнены на 23 кроликах Шиншилла. Сахарный диабет моделировали введением стрептозотоцина (50 мг/кг в 1 мл физиологического раствора внутривенно). В течение ночи перед введением препарата животные не получали пищи. Контрольным животным (4 кролика) вместо стрептозотоцина вводили физиологический раствор. Перекисное окисление липидов в лимфе оценивали по уровню диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и содержанию восстановленного глутатиона. Для оценки состояния системы свертывания лимфы определяли: активизированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, фактор Виллебранда, тромбиновое время, концентрацию фибриногена, растворимые фибрин мономерные комплексы, продукты деградации фибриногена, антитромбин-III и фибринолитическую активность. Показатели свертываемости лимфы определяли на полуавтоматическом коагулометре «Хумаклот-Дуо» (Германия) с помощью готовых наборов реактивов фирмы «Хуман» (Германия) и «Коагулотест» (Россия). Состояние дренажной функции лимфатической системы сердца изучали при введении лимфотропного красителя. **Результаты.** Показано, что моделирование стрептозотоцинового сахарного диабета способствует активации процессов перекисного окисления липидов, приводит к развитию эндотелиальной дисфункции с последующим выбросом прокоагулянтов не только в кровь, но, как показали, наши исследования, и в лимфу. Все это способствовало активации внутрисосудистого свертывания лимфы и нарушениям лимфатического дренажа, что сопровождалось накоплением в межклеточном пространстве вокруг кровеносных и лимфатических капилляров токсичных продуктов нарушенного метаболизма, способствующим развитию сосудистых осложнений. Изменение гемо-лимфатического равновесия отражалось на системе микроциркуляции в конкретном регионе, в частности приводило к нарушению дренажной функции лимфатической системы сердца. Неполный дренаж продуктов распада клеток, крупномолекулярных частиц и токсичных метаболитов, их накопление в интерстиции отрицательно влияет на микроциркуляторное русло, играя тем самым немаловажную роль в патогенезе диабетических микроангиопатий. **Заключение.** Суммируя результаты исследований можно заключить, что при построении лечебно-профилактических схем предотвращения развития диабетических микроангиопатий необходимо учитывать состояние дренажной функции лимфатической системы тканей.

**Ключевые слова:** сахарный диабет; перекисное окисление липидов; эндотелиальная дисфункция; лимфатический дренаж тканей; диабетическая микроангиопатия; свертываемость лимфы.

**Для цитирования:** Мамедзаде А.Я., Алиев М.Х., Гусейнова Ш.М., Агамалыева У.Д., Ахмедзаде У.И., Шахвердиев Г.Г. Эндотелиальная дисфункция и нарушение лимфатического дренажа тканей в патогенезе диабетических микроангиопатий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 91-97.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.91-97

**Для корреспонденции:** Алиев Мамед Хасы оглы, e-mail: aliev.mamed.76@mail.ru

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

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

**Поступила** 23.01.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Mamedzade A.I., Aliyev M.Kh, Hyseynova Sh.M., Agamaliev U.D., Akhmedzade U.I. Zhakhverdiyev G.G.

### Endothelial dysfunction and impairment of lymphatic drainage from tissues in the pathogenesis of diabetic microangiopathy

Department of Pathological Physiology,  
Azerbaijan Medical University, Bakikhanova Str. 23, Baku 1022Az, Azerbaijan

Chronic vascular complications are the most dangerous complications of diabetes mellitus. The role of lymphatic system in the pathogenesis of diabetic microangiopathy is understudied. **The aim** of this study was to investigate the role of lipid peroxidation and endothelial dysfunction in disorders of lymph coagulation and lymphatic drainage from tissues on a model of streptozotocin diabetes mellitus and their significance in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. **Methods.** Experiments were performed on 23 Chinchilla rabbits in compliance with all rules for conducting experiments on laboratory animals. Diabetes mellitus was modeled with an intraperitoneal injection of streptozotocin (Keocyt, Malakoff, France) dissolved in 1 ml of 0.9% NaCl at a dose of 50 mg/kg. Animals fasted overnight before the injection. Control rabbits ( $n=4$ ) received an injection of 0.9% NaCl solution instead of streptozotocin. Peroxide oxidation of lipids in lymph is appreciated in the level of diene conjugates, malonic dialdehyde and amount of reduced glutathione. For assessments the state of coagulation of lymph is determined: activated partial thromboplastin time, prothrombin time, Willebrand factor, thrombin time, concentration of fibrinogen, dissolved fibrin monomeric complexes, products of degradation of fibrinogen, antithrombin III and fibrinolytic activity. Indices of coagulation of lymph determined on semi-automatic coagulometer «Humaclot -Duo» (Germany) with ready set of reagents firm of «Human» (Germany) «Coagulotest» (Russia). The state of drainage function of lymphatic system of the heart is investigated during injection of lymphotropic dyes. **Results.** Streptozotocin diabetes mellitus activated lipid peroxidation, which resulted in endothelial dysfunction and discharge of procoagulants into both the blood and lymph. This facilitated intravascular lymph coagulation and inhibition of lymphatic drainage from tissues associated with accumulation of toxic metabolites in the interstitial space around blood and lymphatic capillaries and development of vascular complications. The changes in hemolymphatic balance affected microcirculation of organs, as evidenced by the impaired drainage function of the heart lymphatic system in experimental diabetes mellitus. Incomplete drainage of cell decay products, large molecular particles, and toxic metabolites and their accumulation in the interstitium adversely affect the microhemo- and microlymphocirculation and, thereby, plays a major role in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. **Conclusion.** In development of preventive measures for diabetic microangiopathy, the state of lymphatic drainage from tissues, particularly in the heart, should be taken into account.

**Keywords:** diabetes mellitus; lipid peroxidation; endothelial dysfunction; tissue lymphatic drainage; diabetic microangiopathy; lymph coagulation.

**For citation:** Mamedzade A.I., Aliyev M.Kh, Hyseynova Sh.M., Agamaliev U.D., Akhmedzade U.I. Zhakhverdiyev G.G. Endothelial dysfunction and impairment of lymphatic drainage from tissues in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 91-97. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.91-97

**For correspondence:** *Aliiev Mamed Khasy*, MD, professor of department of pathological physiology of Azerbaijan medical university. Azerbaijan, e-mail: aliev.mamed.76@mail.ru

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

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest.

**Received** 23.01.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

Численность больных сахарным диабетом (СД) в мире неуклонно растет и по различным прогнозам к 2040 г. превысит 600 млн человек. Несмотря на то, что разработаны и широко применяются высококачественные препараты инсулина и других сахароснижающих препаратов в лечении СД, невозможно обеспечивать полной компенсации нарушенного обмена веществ и предотвратить развитие многочисленных осложнений СД, на основе которых лежат макро- и микроангиопатии [1–4]. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что повреждающее действие гипергликемии на сосудистую стенку опосредуется свободными радикалами, образование которых усиливается с повышением скорости аутоокисления глюкозы при хронической гипергликемии [5]. Все это, в конечном сче-

те приводит к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) и эндотелиальной дисфункции [6–8], что сопровождается усиленным выбросом в кровь фактора Виллебранда (ФВ), простациклина, активатора плазминогена, тромбоглобулина и т. д. [7, 9] и развитию нарушений системы гемостаза [10]. Именно такого рода нарушения лежат в основе хронических сосудистых осложнений в виде микроангиопатий, что сопровождается расстройствами микроциркуляции с морфологическими и функциональными изменениями тканей, нарушением функции органов. Микроангиопатии являются особенностью СД и носят генерализованный характер [11], поражающий всю систему микроциркуляции. При СД создаются благоприятные условия для накопления в межклеточном пространстве потенциально токсических

продуктов, оказывающих пагубное влияние на клетки [12, 13]. В то же время известно, что транспорт из межклеточных пространств токсичных метаболитов, крупномолекулярных частиц и остатков разрушенных клеток осуществляется в основном лимфатической системой [14–16]. Однако до настоящего времени состояние лимфатического дренажа тканей при СД исследовано недостаточно. Цель исследования – изучение роли активации перекисного окисления липидов и эндотелиальной дисфункции в нарушениях свертываемости лимфы и лимфатического дренажа тканей при экспериментальном сахарном диабете.

### Методика

Опыты выполнены на 23 кроликах «Шиншилла» обоего пола массой 2,5–3,0 кг. 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 этическим комитетом Азербайджанского Медицинского Университета. Животные содержались на стандартном рационе вивария.

Сахарный диабет моделировали внутрибрюшинным введением утром натошак стрептозотоцина (Malakoff, France – «Keosut») растворенного в 1 мл физиологического раствора (50 мг/кг). Для предупреждения развития гипогликемического шока сразу после инъекции стрептозотоцина животные вместо воды получали 5%-ый раствор глюкозы. Контрольным животным (4 кролика) вводили физиологический раствор. О развитии СД судили по уровню глюкозы, определяемой в крови животных натошак при помощи глюкометра (SensoLite Nova, Budapest-Hungary) на 5-е, 15-е, 30-е, 60-е и 90-е сут после введения стрептозотоцина. Продолжительную гипергликемию наблюдали уже с 3-х–5-х сут. Критериями включения в эксперимент являлись уровень глюкозы более 13 ммоль/л (СД средней тяжести) и выживание животных в течение всего периода исследования. Экспериментальных животных (20%), у которых на 5-е сут развивалось крайне тяжелое состояние с гипергликемией выше 20–30 ммоль/л, выводили из эксперимента. Лимфу для анализа получали методом дренирования грудного протока [17, 18] под наркозом (калипсол, 8 мг/кг и димедрол, 0,15 мг/кг). Препараты вводили в ушную вену уха кролика. Скорость лимфооттока (СЛО) определяли по объему лимфы, оттекающей из дренированного грудного протока в единицу времени на 1 кг массы тела животного (мл. мин/кг).

Перекисное окисление липидов в лимфе оценивали по уровням диеновых конъюгатов [19], малонового диальдегида (МДА) [20] и содержанию восстановленного глутатиона (QSH) [21]. Для оценки состояния системы свертывания лимфы определяли: активизированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), фактор Виллебранда (ФВ), тромбиновое время (ТВ), концентрацию фибриногена (КцФ), растворимые фибрин мономерные комплексы (РФМК), продукты деградации фибриногена (ПДФ), антитромбин-III (АТ-III) и фибринолитическую активность (ФА). Показатели свертываемости лимфы определяли на полуавтоматическом коагулометре «Хумаклот-Дуо» (Германия) с помощью готовых наборов реактивов фирмы «Хуман» (Германия) и «Коагулотест» (Россия). Состояние дренажной функции лимфатической системы сердца изучали при введении лимфотропного красителя (синий Эванса Т–1824). Раствор красителя (0,1 мг на 100 г массы сердца) вводили туберкулиновой иглой субэпикардially в заднебоковую стенку левого желудочка в области верхушки сердца [22]. Определение скорости выведения лимфотропного красителя производили на уровне «надсердечного» лимфатического ствола, в отделе, примыкающем к сердечному лимфоузлу. Визуально с помощью бинокулярной лупы-МГ81006а регистрировали время (с) от момента инъекции до появления красителя в лимфе «надсердечного» лимфатического ствола (I-этап выведения), также время (с) полного очищения сердца от лимфотропного красителя (II-этап выведения).

При статистической обработке результатов применяли пакеты программ EXCEL, Statistika. Использовали непараметрические и параметрические методы анализа Стьюдента, Фишера и Вилкоксона.

### Результаты

Результаты исследования показателей ПОЛ в лимфе представлены в табл. 1. Как видно из таблицы при стрептозотоциновом СД значительно активизируются процессы ПОЛ, о чем свидетельствует увеличение содержания продуктов ПОЛ начиная с 5-х сут исследования. Статистически значимо увеличивалось содержание в лимфе как первичных (ДК на 66,6%), так и вторичных (МДА более чем в 2,6 раза) продуктов ПОЛ. По мере увеличения сроков исследования уровни ДК и МДА в лимфе возрастали на фоне заметного уменьшения антиоксидантного потенциала – содержание восстановленного глутатиона через 30 сут снижалось до 73,8% ( $p < 0,05$ ). Нарастание содержания продуктов

ПОЛ в лимфе регистрировалось в течение 30 сут, при этом уровни ДК и МДА превышали исходные значения на 3,2 раза и 2,2 раза, соответственно ( $p < 0,001$ ). С 60-х сут проявлялась тенденция к их снижению на фоне прогрессирующего падения антиоксидантного потенциала лимфы – к концу исследования содержание QSH в лимфе уменьшалось до 66,6% ( $p < 0,001$ ).

Показатели свертываемости лимфы представлены в табл. 2. Как видно из табл. 2 моделирование стрептозотоцинового СД сопровождалось заметным повышением свертывающей способности лимфы. Это выражалось в изменении показателей свертываемости лимфы, таких как АЧТВ, ПВ и ТВ. Начиная с 5-х сут в лимфе существенно (на 26,1%) повышался уровень

ФВ. Через 30 сут после введения стрептозотоцина наиболее выражены были изменения показателей АЧТВ и ТВ, которые снижались на 42,2% и на 32,9%, соответственно, по сравнению с исходными. В этот период наблюдения в лимфе обнаруживались маркеры внутрисосудистой активации свертываемости, такие как РФМК и ПДФ на фоне заметного угнетения активности АТ-III. По мере увеличения сроков исследования выявленные сдвиги показателей внутрисосудистого свертывания лимфы усугублялись. Уже через 60 сут в лимфе определились маркеры эндотелиальной дисфункции и активации внутрисосудистого свертывания лимфы такие, как РФМК и ПДФ на фоне угнетения ФА. Такая же динамика изменений изученных пока-

Таблица 1

## Показатели перекисного окисления липидов в лимфе при экспериментальном сахарном диабете

Показатели	Исходные данные (n=4)	После введения стрептозотоцина (сутки)				
		5-е (n=3)	15-е (n=3)	30-е (n=3)	60-е (n=3)	90-е (n=3)
DK Mkm/l	1,5±0,2	2,5±0,2***	3,9±0,3***	4,8±0,2***	3,7±0,4***	3,8±0,3***
MDA Mkm/l	3,1±0,5	4,4±0,3**	6,5±0,8***	6,9±0,5***	5,8±0,5***	5,7±0,4***
QSH Mkm/l	4,2±0,4	4,0±0,2	3,3±0,19**	3,1±0,4**	3,0±0,3**	2,8±0,4***

**Примечание.** DK – диеновые конъюгаты, MDA – малоновый диальдегид, QSH – восстановленный глутатион; статистически значимые различия с исходными данными: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Таблица 2

## Динамика показателей коагуляционного лимфостаза при экспериментальном стрептозотоциновом сахарном диабете

Показатели	Исходные данные (n = 3)	После введение стрептозотоцина (сутки)				
		5-е (n = 3)	15-е (n = 4)	30-е (n = 3)	60-е (n = 3)	90-е (n = 3)
ФВ (%)	55,1±3,9	69,5±4,4*	85,3±4,7**	99,8±5,1***	90,9±4,8***	79,5±5,4**
АЧТВ (с)	53,4± 2,1	47,3 ± 3,1	30,9 ± 1,3***	33,4±2,1***	32,3±1,8***	36,7±1,4**
ПВ (с)	33,2±1,9	24,4±1,1**	27,1 ± 1,2 *	24,1±1,3 **	27,2±0,9 *	25,4±1,1**
ТВ (с)	27,4±1,3	20,9±0,7*	18,4± 0,4***	20,4±7,9 **	23,4 ± 0,7	27,6± 0,8
КцФ (г/л)	2,7±0,05	2,9±0,03	3,2±0,02 *	3,0±0,01*	2,9±0,02*	2,8±0,01
РКФМ (±)	-	-	+	+	+	+
ПДФ (±)	-	-	+	+	+	+
АТ-III (с)	120,4±6,9	90,9±5,9	81,1±4,8 **	75,9±6,4**	80,9±4,7**	91,6±4,8*
ФА (мин)	21,4±1,1	20,9±1,2	22,2±0,9	16,9±0,4*	12,4±1,1 **	10,6±0,8 ***
СЛО (мл мин/кг)	0,22±0,02	0,25±0,01	0,20±0,02 *	0,18±0,01**	0,15±0,01***	0,14±0,01***

**Примечание.** ФВ – фактор Виллебранда, АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, ПВ – протромбиновое время, ТВ – тромбиновое время, КцФ – концентрация фибриногена, РФМК – растворимые фибринмономерные комплексы, ПДФ – продукты деградации фибриногена и АТ-III – антитромбина III, ФА – фибринолитическая активность, СЛО – скорость лимфотока. Статистически значимые различия с исходными показателями: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Таблица 3

**Состояние лимфатического дренажа сердца при моделировании сахарного диабета у кроликов**

Серии	Этапы выведения красителя	Исходные данные	После введения физиологического раствора (сутки)				
			5-е	15-е	30-е	60-е	90-е
Контроль	I этап (с)	182,4±6,8 (n=4)	176,7±8,4 (n=4)	170,9±9,3 (n=4)	155,4±8,7 (n=4)	171,4±6,8 (n=4)	196,7±8,2 (n=4)
	II этап (с)	355,7±9,3 (n=4)	346,7±12,4 (n=4)	349,7±11,2 (n=4)	366,9±9,7 (n=4)	359,5±12,3 (n=4)	308,2±11,4 (n=4)
			После введение стрептозотоцина (сутки)				
Опыт	I этап (с)	167,4±6,2 (n=4)	177,5±7,3 (n=3)	214,4±8,3** (n=3)	257,6±9,3*** (n=3)	264,4±7,6*** (n=3)	341,5±8,2*** (n=3)
	II этап (с)	373,4±11,3 (n=4)	390,7±9,7 (n=3)	428,9±12,3 (n=3)	456,4±10,7** (n=3)	495,4±9,8*** (n=3)	555,4±9,1*** (n=3)

**Примечание.** Статистически значимые различия с исходными показателями: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

зателей сохранялась и в последующие сроки наблюдения. Исследование скорости лимфотока из грудного протока показало, что моделирование СД у кроликов сопровождается фазными изменениями дренажной функции лимфатической системы. Через 5 сут СЛЮ незначительно возрастала, а по мере увеличения сроков наблюдения постепенно уменьшалась. Об этом свидетельствует статистически значимое уменьшение (до 81,8% от исходного) СЛЮ из грудного протока, начиная с 30-х сут.

Подобная динамика сохранялась в течение всего эксперимента. Наиболее выраженное снижение СЛЮ из грудного протока (до 63,6% от исходного) фиксировалось к концу исследования (табл. 2). Таким образом результаты исследования показали, что при моделировании СД значительно нарушается дренажная функция лимфатической системы тканей, что создает благоприятные условия для накопления токсичных метаболитов на клеточном и органном уровнях. Исследования дренажной функции лимфатической системы сердца при экспериментальном СД подтвердили это предположение – у кроликов наблюдалось существенное угнетение дренажной функции лимфатической системы сердца (табл. 3). Об этом свидетельствует увеличение продолжительности как I, так и II этапа выведения лимфотропного красителя из сердца. При этом следует заметить, что наиболее выраженному изменению подвергался I этап выведения лимфотропного красителя.

Так, через 30 сут I этап стал продолжительнее (на 28,1%) по сравнению с исходным. Подобная динамика сохранялась и в последующие периоды наблюдения. К концу исследования указанный показатель превышал исходный уровень на 57,9%. Между тем II этап

выведения лимфотропного красителя из сердца по сравнению с I-м, заметно изменялся только через 2 мес после введения стрептозотоцина, превышая исходный уровень на 22,2%. Такая динамика сохранялась и в последующем периоде наблюдения – II этап выведения лимфотропного красителя из сердца стал продолжительнее на 32,7% по сравнению с исходным.

**Обсуждение**

Таким образом, результаты наших исследований показали, что при моделировании сахарного диабета активация ПОЛ сопровождалась эндотелиальной дисфункцией, способствующей нарушению свертываемости лимфы и лимфатического дренажа сердца. Сопоставляя данные настоящего исследования с данными других авторов [14, 23-25], можно заключить, что активация перекисного окисления липидов и эндотелиальная дисфункция с усилением внутрисосудистого усиления свертывания лимфы отрицательно сказывается на дренажной функции лимфатической системы при моделировании стрептозотоцинового сахарного диабета. Все это создает благоприятные условия для накопления в межклеточном пространстве в миокарде токсичных продуктов нарушенного метаболизма, что усугубляет эндотоксикоз на клеточном и органном уровне. Эндотоксикоз является неотъемлемым компонентом нарушения морфофункционального состояния тканей и развития сосудистых осложнений сахарного диабета.

Таким образом, можно прийти к заключению, что активация ПОЛ с последующей эндотелиальной дисфункцией способствует нарушению свертываемости не только крови [7, 10], но и лимфы с нарушением дренаж-

ной функции лимфатической системы. Все это создает благоприятные условия для развития поздних сосудистых осложнений и свидетельствует о необходимости учета состояния свертываемости лимфы и дренажной функции лимфатической системы сердца при составлении лечебно-профилактических схем коррекции микроангиопатий у больных сахарным диабетом.

#### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Алиев М.Х., Гусейнова Ш.М.

Сбор и обработка материала — Агамалыева У.Д., Шахвердиев Г.Г.

Статистическая обработка — Ахмедзаде У.И.

Написание текста — Мамедзаде А.Я.

Редактирование текста — Алиев М.Х.

#### Литература

1. Кудина Е.В., Барт Б.Я., Михайлузова М.П., Ларин В.Г. Осложнения сахарного диабета: современное состояние проблемы. *Справочник поликлинического врача*. 2018; 6: 49-54.
2. Степченков Р.П. Диагностика синдрома диабетической стопы в амбулаторных условиях. *Справочник врача общей практики*. 2019; 6: 24-36.
3. Liebl A., Neiss A., Spannheimer A. et al. Complications, co-morbidity, and blood glucose control in type 2 diabetes mellitus patients in Germany — results from the CODE2 study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002; 110: 10–6.
4. Ighodaro O.M., Adeosun A.M. Vascular complications in diabetes mellitus. *Glob J Endocrinol Metab*. 2017; 1(2): 1–3.
5. Khaled A.A., Sekaran M., Ikram S.I. Type 2 diabetes and vascular complications: a pathophysiologic view. *Biomedical Research*. 2010; 21(2): 147–55.
6. Vanhoutte P.M., Shimokawa H., Tang E.H. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009; 196: 193–222.
7. Сизиков В.И., Нелаева А.А., Хасанова Ю.В., Быкова И.Ю. Дисфункция эндотелия и нарушения тромбоцитарно-коагуляционного гемостаза в развитии диабетической нефропатии при сахарном диабете 2 типа. *Сахарный диабет*. 2007; 1: 24-8.
8. Ighodaro O.M., Adeosun A.M. Vascular complications in diabetes mellitus. *Glob J Endocrinol Metab*. 2017; 1(2): 1–3.
9. Балаболкин М.И., Кремнинская В.М., Клебанова Е.М. Роль окислительного стресса в патогенезе диабетической нейропатии и возможность его коррекции препаратами  $\alpha$ -липоевой кислоты. *Проблемы эндокринологии*. 2005; 51(3): 22-32.
10. Краснопеццева И.П., Бондарь И.А., Пиков И.В. Особенности сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза у больных сахарным диабетом первого типа. *Медицина и образование в Сибири*. 2013; 3: 134-8.
11. Деревянко (Семёник) И.А., Новаковская С.А. Микроциркуляторное русло миокарда на ранней стадии развития диабетической кардиомиопатии. *Новости медико-биологических наук*. 2016; 13(1): 23-8.
12. Аметов А.С., Курочкин И.О., Зубков А.А. Сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания. *РМЖ*. 2014; 13: 954-7.

13. Forbes J.M., Cooper M.E. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013; 93(1): 137–88.
14. Левин Ю.М. *Практическая лимфология*. Баку; «Маариф»; 1982.
15. Мамедов Я.Д. *Инфаркт миокарда. Лимфатическая система сердца. Патофизиология и патогенетические основы лечения*. М.; Медицина, 1989.
16. Миннебаев М.М. Физиология и патофизиология лимфатической системы. Результаты исследований и научные перспективы развития кафедры. *Казанский медицинский журнал*. 2015; 96(1): 118-23.
17. Корниенко А.А., Куликовский Н.Н., Сорокатый А.Е. Актуальные вопросы топографической анатомии и оперативной хирургии. М.; 1977; 1: 22–6.
18. Алиев М.Х., Мамедов В.К. Способ получения центральной лимфы в хроническом эксперименте. *Азербайджанский Медицинский Журнал*. 1990; 11: 48–50.
19. Гаврилова В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Изменение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гаптенных и изопрופןановых экстрактов. *Лабораторное дело*. 1988; 2: 60-64.
20. 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.
21. Ellman G. Tissue sulphydryl groups. *Arc. Biochem. Biophys*. 1959; 82: 70-7.
22. Кедик А.А. Стимуляция дренажной функции лимфатической системы сердца при острой очаговой ишемии миокарда. Автореферат к.м.н., М.; 1984.
23. Гусейнова Ш.М., Алиев С.Д., Алиев М.Х. Состояние свертываемости лимфы и лимфатического дренажа сердца при экспериментальном диабете. *Естественные и технические науки*. 2012; 3(59): 446-50.
24. Хугаева В.К. Нарушения лимфообращения. *Кардиология*. 1996; 8: 64-70.
25. Кузник Б.И., Левин Ю.М. Свертываемость и фибринолитическая система. *Гематология и трансфузиология*. 2012; 57(5): 42-7.

#### References

1. Kudina E.V., Bart B.Ja., Mihajlusova M.P., Larin V.G. Complications of diabetes mellitus: the current state of the problem. *Spravochnik poliklinicheskogo vracha*. 2018; 6: 49-54. (in Russian)
2. Stepchenkov R.P. Diagnosis of diabetic foot syndrome in outpatient settings. *Spravochnik vracha obshchey praktiki*. 2019; 6: 24-36. (in Russian)
3. Liebl A., Neiss A., Spannheimer A. et al. Complications, co-morbidity, and blood glucose control in type 2 diabetes mellitus patients in Germany — results from the CODE2 study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002; 110: 10–6.
4. Ighodaro O.M., Adeosun A.M. Vascular complications in diabetes mellitus. *Glob J Endocrinol Metab*. 2017; 1(2): 1–3.
5. Khaled A.A., Sekaran M., Ikram S.I. Type 2 diabetes and vascular complications: a pathophysiologic view. *Biomedical Research*. 2010; 21(2): 147–55.
6. Vanhoutte P.M., Shimokawa H., Tang E.H. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009; 196: 193–222.
7. Sizikov V.I., Nelaeva A.A., Hasanova Yu.V., Bykova I.Yu. Dysfunction of endothelium and disorders of platelet-coagulation hemostasis in the development of diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Sakharnyy diabet*. 2007; 1: 24-8. (in Russian)



8. Ighodaro O.M., Adeosun A.M. Vascular complications in diabetes mellitus. *Glob J Endocrinol Metab.* 2017; 1(2): 1–3.
9. Balabolkin M.I., Kreminkaia V.M., Klebanova E.M. Role of oxidative stress in pathogenesis of diabetic neuropathy and possibility of its correction by preparations of  $\alpha$ -lipoic acid. *Problemy endokrinologii.* 2005; 51(3): 22–32. (in Russian)
10. Krasnopenvtseva I.P., Bondar I.A., Pikov I.V. Features of vascular-platelet and coagulation hemostasis in patients with diabetes mellitus of the first type. *Meditsina I obrazovaniie v Sibiri.* 2013; 3: 134–8. (in Russian)
11. Derevianko (Semenik) I.A., Novakovskaia S.A. Microcirculatory myocardial channel at early stage of diabetic cardiomyopathy development. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk.* 2016; 13(1): 23–8. (in Russian)
12. Ametov A.S., Kurochkin I.O., Zubkov A.A. Diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal.* 2014; 13: 954–7. (in Russian)
13. Forbes J.M., Cooper M.E. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013; 93(1): 137–88.
14. Levin I.M. *Practical limfologiya [Prakticheskaya limfologiya].* Baku, «Maarif», 1982. (in Russian)
15. Mamedov Ya.D. *Myocardial infarction. Heart lymphatic system. Pathophysiology and pathogenetic bases of treatment [Infarkt miokarda. Limfaticeskaya sistema serdtsa. Patofiziologiya i patogeneticheskie osnovy lecheniya].* Moscow; Meditsina, 1989. (in Russian)
16. Minnebaiev M.M. Physiology and pathophysiology of the lymphatic system. Research results and scientific prospects of the Department. *Kazanskiy Meditsinskiy Zhurnal.* 2015; 96(1): 118–23. (in Russian)
17. Kornienko A.A., Kulikovskiy N.N., Sorokatyy A.E. *Topical issues of topographic anatomy and operative surgery [Aktual'nye voprosy topograficheskoy anatomii i operativnoy khirurgii].* Moscow; 1977; 1: 22–6. (in Russian)
18. Aliev M.X., Mamedov V.K. Metod for preparing central lymph in chronic eksperiment. *Azerbaydzhanskiy Meditsinskiy Zhurnal.* 1990; 11: 48–50. (in Russian)
19. Gavrilova V.B., Gavrilova A.R., Khmara N.F. Change of diene conjugates in blood plasma by UV absorption of hapten and isopropane extracts. *Laboratornoe delo.* 1988; 2: 60–4. (in Russian)
20. Andreeva L.I., Kozhemiakin L.A., Kishkun A.A. Modification of the method for determining lipid peroxides in a thiobarbituric acid test. *Laboratornoe delo.* 1988; 11: 41–3. (in Russian)
21. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups. *Arc. Biochem. Biophys.* 1959; 82: 70–7.
22. Kedik A.A. *Stimulation of the drainage function of the heart lymphatic system in acute myocardial focal ischemia [Stimulyatsiya drenazhnoy funktsii limfaticeskoy sistemy serdtsa pri ostroy ocha-govoy ishemii miokarda].* Avtoreferat k. m. n., Moscow; 1984. (in Russian)
23. Guseynova Sh.M., Aliev S.D., Aliev M.H. The state of clotting of the lymph and lymphatic drainage of the heart in experimental diabetes. *Estestvennye i tehnicheckie nauki.* 2012; 3(59): 446–50. (in Russian)
24. Hugaeva V.K. Violations of a limfotsirkulyation. *Kardiologiya.* 1996; 8: 64–70. (in Russian)
25. Kuznik B.I., Levin Yu.M. Clotting and fibrinolytic system. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2012; 57(5): 42–7. (in Russian)

#### Сведения об авторах:

**Мамедзаде Айтен Ягуб кызы**, доктор философии по медицине, доцент каф. терапевтической и педиатрической пропедевтики Азербайджанского медицинского университета;

**Алиев Мамед Хасы оглы**, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии Азербайджанского медицинского университета;

**Гусейнова Шола Могуб кызы**, доктор философии по медицине, доцент каф. патологической физиологии Азербайджанского медицинского университета;

**Агамальева Улкен Джафар кызы**, ассистент каф. патологической физиологии Азербайджанского медицинского университета;

**Ахмедзаде Улвия Исрафил кызы**, доктор философии по медицине, ассистент каф. патологической физиологии Азербайджанского медицинского университета;

**Шахвердиев Гасан Гольбага оглы**, ассистент каф. патологической физиологии Азербайджанского медицинского университета.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 615.324

Куксгауз И.А., Кашкин В.А., Шекунова Е.В., Гушин Я.А., Макаров В.Г., Макарова М.Н.

## Изучение терапевтической эффективности препарата Алфлутоп на модели открытого перелома бедренной кости у крыс

ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»,

188663, Россия, Ленинградская область, Всеволожский район, городской поселок Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, корпус 245

**Введение.** Клиническое применение гликозаминогликанов предотвращает разрушение макромолекулярных структур интерстициальной ткани и тканей суставного хряща, стимулирует процессы восстановления и обладает противовоспалительным действием. Эти эффекты синергичны и ведут к активации восстановительных процессов в тканях. **Цель исследования** – оценка терапевтической эффективности препарата Алфлутоп (К.О. Биотехнос С.А., Румыния) на модели открытого перелома бедренной кости у крыс. **Методика.** В области средней трети диафиза бедренной кости делали 2 расположенных перпендикулярно отверстия диаметром 1 мм, после чего перелом кости осуществляли вручную. Репозицию и фиксацию отломков осуществляли с помощью спиц Киршнера. Препарат (0,2 и 0,45 мл/кг) вводили внутримышечно, начиная с 1-х сут формирования патологии, на протяжении 20 сут. Эффективность препарата оценивали по особенностям формирования костной мозоли (рентгенологическое исследование) и скорости регенерации костной ткани (гистологическое исследование). Оценку проводили непосредственно после окончания терапии и через 2 нед после ее завершения. **Результаты.** Показано, что репаративный остеогенез был более выражен у животных, получавших препарат Алфлутоп. На фоне терапии в участке перелома возрастало число случаев перекрытия промежутка костной щели, а также статистически значимо увеличивалась площадь первичной костной мозоли. При гистологическом исследовании в участке перелома непосредственно после завершения терапии наблюдались признаки формирования хрящевой мозоли, а к исходу 2-й нед – костной мозоли с формированием костных балок, т. е. выявлялась отчетливая тенденция к активации репаративных процессов. **Заключение.** Использование препарата Алфлутоп в клинической практике целесообразно в качестве сопутствующей терапии при переломах костей.

**Ключевые слова:** Алфлутоп; открытый перелом трубчатой кости; крысы.

**Для цитирования:** Куксгауз И.А., Кашкин В.А., Шекунова Е.В., Гушин Я.А., Макаров В.Г., Макарова М.Н. Изучение терапевтической эффективности препарата Алфлутоп на модели открытого перелома бедренной кости у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 98-107.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.98-107

**Для корреспонденции:** Кашкин Владимир Александрович, e-mail: kashkinv@gmail.com

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

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

**Поступила** 02.10.2019

**Принята в печать** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Kuksgauz I.A., Kashkin V.A., Shekunova E.V., Guschin Ya.V., Makarov V.G., Makarova M.N.

### Theurapeutic effects of Alflutop in a rat model of femoral fracture

JSC St. Petersburg Institute of Pharmacy,

b. 245, 3, st. Zavodskaya Str. 3, Blvd. 245, Vsevolzhskiy District, Urban-type Settlement Kuzmolovskiy of the Leningrad Region 188663, Russia

**Aim.** This study was designed to evaluate the therapeutic efficacy of Alflutop (K.O. Biotehnos C.A., Romania) using a rat model of femoral fracture. **Methods.** In the middle third region of the diaphysis of the femur, two perpendicular holes (diameter, 1 mm) were made, and the bone was manually broken. An intramedullary fixation was performed manually using a stainless Kirschner wire. Alflutop (0.2 and 0.45 ml/kg, i.m.) was injected into the rats daily for 20 days after the injury. The effect of Alflutop was evaluated immediately at the end of the treatment period and 2 weeks after the treatment completion using X-ray (callus formation) and histological data (bone regeneration). **Results.** The therapy resulted in some cases in partial bone fusion in the fracture line and significantly increased the area of cartilage callus. The most pronounced therapeutic effect was observed on day 35 of the experiment. Histological examination revealed signs of fracture healing in all experimental groups. Immediately after the therapy period, the formation of cartilage callus was observed in the fracture line. In 2 weeks after the therapy, signs of the formation of mineralized callus were noted. Along with the cartilaginous tissue, which was widely present, formation of trabecular bone and bone beams was observed.

Two weeks after the therapy completion, the fracture healing process was more intensive in animals treated with Alflutop in either dose. **Conclusion.** The study confirmed that Alflutop can be used as a concomitant therapy for fracture healing in clinical practice.

**Keywords:** Alflutop; bone femur fracture; rat.

**For citation:** Kungskgauz I.A., Kashkin V.A., Shekunova E.V., Guschin Ya.V., Makarov V.G., Makarova M.N. Alflutop therapeutic effects in the rat femoral fracture model. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 98-107. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.98-107

**For correspondence:** *Kashkin V.A.*, Candidat of Medical Sciences, Senior researcher, department of experimental pharmacology, e-mail: kashkinv@gmail.com

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

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

#### Information about authors:

Kungskgauz I.A., <https://orcid.org/0000-0002-2610-6888>

Kashkin V.A., <https://orcid.org/0000-0002-7202-0233>

Shekunova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-2689-6891>

Makarova M.N., <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

Makarov V.G., <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

**Received** 02.10.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

Алфлутоп — хондропротектор, активным компонентом которого является биоактивный концентрат из мелкой морской рыбы. Концентрат содержит гликозаминогликаны, в т.ч. хондроитин-4 и 6-сульфат, дерматансульфат, кератансульфат; глюконовую кислоту, аминокислоты, миоинозитол фосфаты и низкомолекулярные полипептиды ( $\leq 50$  кДа). Алфлутоп обладает противовоспалительным действием, предотвращает разрушение макромолекулярных структур нормальных тканей, стимулирует процессы восстановления в интерстициальной ткани и ткани суставного хряща, что объясняет его обезболивающее действие. Оба эти эффекта синергичны и обуславливают активацию восстановительных процессов в тканях (в частности, восстановление структуры хряща) [1].

Протеогликаны кости представлены в основном хондроитин сульфатом, который очень важен для обмена веществ костной ткани. Он образует с белками основное вещество кости и важен в обмене  $\text{Ca}^{2+}$ . Хондроитин сульфат в условиях стабильной фиксации длинных трубчатых костей приводит к улучшению кровоснабжения костной ткани в зоне перелома, что способствует адекватному образованию костной мозоли и в целом значительно сокращает сроки лечения и реабилитации больных [2]. В костной ткани также присутствует гиалуроновая кислота, которая играет важную роль в морфогенезе. [3].

Фармакологическое действие препарата Алфлутоп определяется не только как хондропротективное, но и как противовоспалительное, анальгезирующее, стиму-

лирующее регенерацию тканей. В основе этих эффектов лежит способность компонентов препарата подавлять активность гиалуронидазы и нормализовать биосинтез гиалуроновой кислоты [4]. Другой механизм противовоспалительного действия препарата Алфлутоп заключается в блокаде высвобождения интерлейкинов ИЛ-6 и ИЛ-8, основных модуляторов прогрессирования острой фазы воспаления в хондроцитах у человека [5]. Все это дает основание рассматривать препарат Алфлутоп в качестве лекарственного средства, ускоряющего регенерацию костной ткани при переломе.

Исследованию хондроитин сульфата, входящего в состав тестируемого препарата, посвящен ряд клинических исследований, где была доказана эффективность хондроитин сульфата только при лечении остеоартроза коленных и тазобедренных суставов со степенью доказательности А (EULAR, Европейская противоревматическая лига). В то же время, в комплексной терапии переломов двойных слепых, плацебо контролируемых исследований не проводилось [6]. Однако, принимая во внимание взаимосвязь механизмов регенерации хрящевой ткани суставов и костной ткани, можно предполагать, что хондроитин сульфат будет эффективен и при лечении переломов кости.

Была выбрана методика открытой поперечной остеотомии средней трети бедра у крыс, поскольку открытый перелом конечностей является часто встречающейся травмой, лечение больных сложное и дли-

тельное, наблюдается высокая частота гнойно-некротических осложнений, формирование ложных суставов и посттравматических дефектов тканей [7, 8]. При множественной и сочетанной травме особенно высока частота нарушений консолидации переломов [9, 10]. Поэтому в настоящее время проблема поиска путей нормализации механизмов регенерации открытых переломов крайне актуальна. Для решения данной проблемы и трансляционного переноса экспериментальных данных в клиническую область применения тестируемого препарата Алфлутоп нами было проведено моделирование перелома бедренной кости по открытому типу. Данный метод формирования патологии широко используется в экспериментальных исследованиях, например, при изучении влияния препаратов на эффективность консолидации переломов при остеопорозе [11], репаративного гистогенеза костной ткани на фоне применения препарата «Винфар» [12], или на фоне использования метаболитов *bacillus subtilis 804*, содержащих фактор роста фибробластов [13]. Применение модели остеотомии по открытому типу часто востребовано для изучения влияния различных антибактериальных препаратов на скорость репаративных процессов в костной ткани [14, 15].

Также известно, что нестабильность в месте перелома на стадии репарации стимулирует более активное образование наружной мозоли. Эти микродвижения активируют созревание мозоли и ее трансформацию из хрящевой в более твердую костную ткань [16], что нашло продолжение в разработке метода лечения открытого перелома кости при помощи механической стимуляции с использованием внешних фиксаторов [17].

Цель исследования – оценка терапевтической эффективности препарата Алфлутоп на модели перелома бедренной кости у крыс.

### Методика

Эксперименты выполнены на самцах аутбредных крыс массой 220–260 г (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Россия). Животных содержали в условиях 24-х-часового фоторежима (12 ч день: 12 ч ночь, включение света в 8:00), контролируемой температуры ( $22 \pm 2$  °C) и влажности ( $65 \pm 10\%$ ) воздуха при свободном доступе к очищенной воде и стандартному корму (гранулированный комбикорм). За неделю до начала эксперимента животные были рассажены в клетки индивидуального содержания.

Исследование выполнено в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010

года по охране животных. Исследование соответствовало принципам 3 «R» (*reduction, refinement and replacement*). Работа была одобрена биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», протокол № 2.74/18.

**Моделирование патологического процесса.** Для моделирования экспериментальной патологии использовали общую анестезию смесью препаратов Zoletil 100 («Virbac Sante Animale», Франция) и Xila («Interchemie werken «De Adelaar» B.V», Нидерланды) (20 мг/мл, 1:1; 50 мкл на крысу массой 250 г), внутримышечно (в/м).

Моделирование открытого перелома бедренной кости осуществляли на правой тазовой конечности крыс при соблюдении правил асептики и антисептики. После подготовки операционного поля в области латеральной поверхности правого бедра делали продольный разрез кожи приблизительно 1,5 см в длину. Бедренную кость выделяли с двух сторон путем тупого препарирования *m. biceps femoris*. В области средней трети диафиза бедренной кости перпендикулярно оси делали 2 отверстия диаметром 1 мм, после чего перелом кости осуществляли вручную. Репозицию и фиксацию отломков осуществляли открытым ручным способом. Для этого подбирали часть спицы Киришнера, которая соответствовала диаметру интрамедуллярного просвета бедренной кости (1,2; 1,5 или 1,8 мм). Кость фиксировали на спице путем ручного погружения подобранной спицы в обе части интрамедуллярного пространства [18]. Таким образом, в эксперименте воспроизводили открытый инвазивный вид остеосинтеза, обеспечивающий прямое сращение перелома. Рану послойно ушивали, после чего обрабатывали антисептиком. В послеоперационный период животным внутримышечно вводили Кетонал в дозе 5 мг/кг, однократно [19].

**Препараты, использованные для терапии.** В исследовании использовали препарат Алфлутоп, в лекарственной форме раствор для инъекций, серия 3360418 (К.О. Биотехнос С.А., Румыния). Контрольные животные получали физиологический раствор.

**Дизайн исследования.** В эксперимент включены 3 группы по 12 крыс в каждой. Открытый перелом воспроизводили у всех животных. Терапию начинали непосредственно после проведения операции по моделированию перелома. Животные 1-й группы (контроль) получали физиологический раствор в объеме 0,45 мл/кг. Животные 2-й и 3-й групп – раствор готовой лекарственной формы Алфлутопа в дозах 0,2 мл/кг и 0,45 мл/кг соответственно, которые с учетом межвидового коэффициента пересчета доз соответствовали 2 и 5 терапевтическим клиническим дозам. Курс терапии составил 20 сут. Алфлутоп или физиологический

раствор вводили ежедневно, один раз в сут, в/м в мышцы бедра левой тазовой конечности. Эвтаназию проводили с помощью CO<sub>2</sub>-камеры, в условиях постепенного заполнения камеры диоксидом углерода: на 21-е сут (50% крыс из каждой группы) и на 35-е сут (оставшиеся животные).

**Рентгенологическое исследование.** После эвтаназии у каждого животного ампутировали правую конечность на уровне тазобедренного сустава и проводили рентгенологическое исследование места перелома с помощью установки (Orange – 1040HF; EcoRay Co., Ltd, Сеул, Южная Корея) с параметрами экспозиции: 1,25 mAc и анодного напряжения: 41 кВ. По результатам рентгенологического исследования производили расчет площади костной мозоли. Площадь (мм<sup>2</sup>) видимого участка периостальной части костной мозоли (регенерата) измеряли путем ввода изображений в программу «ImageJ» вер.1.52i (NIH, Bethesda, MD) и визуализации любого участка костной мозоли, видимого за исходной поверхностью периостальной части кости.

Стадию заживления перелома на каждом этапе определяли с использованием 4-балльной системы оценки рентгенограмм методом S.J. Warden и соавт. [20]: 0 – отсутствие признаков заживления; 1 – образование костной мозоли без перекрытия линии перелома; 2 – образование костной мозоли с возможным перекрытием линии перелома; 3 – полное закрытие линии перелома.

Контраст изображения был изменен для облегчения разграничения исходной периостальной поверхности для мозолей с повышенной непрозрачностью. Двум исследователям, осуществлявшим анализ рентгенологических снимков независимо друг от друга, не было известно о принадлежности животного к определенной экспериментальной группе.

**Гистологическое исследование.** Материал (бедренную кость) фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, декальцинировали в растворе на основе муравьиной и соляной кислот, обезвоживали и пропитывали парафином. Срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические препараты просматривали при увеличении x100 (микроскоп Accu-Score 3000 SERIES, США). Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры TOUPCAM UCOS05100KPA и программного обеспечения TourView 3.7.7892 (Китай).

Полуколичественный анализ проводили с учетом факторов, влияющих на регенерацию кости:

1) воспалительный инфильтрат: 0 – отсутствует; 1 – слабо выражен; 2 – умеренно выражен; 3 – отчетливо выражен.

2) коллагеновые волокна и признаки формирования новой кости: 0 – отсутствуют; 1 – слабо выражены; 2 – умеренно выражены; 3 – отчетливо выражены.

3) восстановление кортикальной пластинки: 0 – отсутствует; 1 – нечеткий контур краев; 2 – покрыто около 50% ширины фрагмента; 3 – покрыто более 50% ширины фрагмента.

Результаты оценивали по сумме баллов всех признаков в каждой группе [21].

**Статистическая обработка.** Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим межгрупповым сравнением с применением критерия Тьюки. Для сравнения 2 групп использовали t-тест. Для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, применяли критерий Краскала-Уоллиса. Различия были определены при 0,05 уровне значимости. Статистический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения Statistica 10.0. (StatSoft, США).

## Результаты

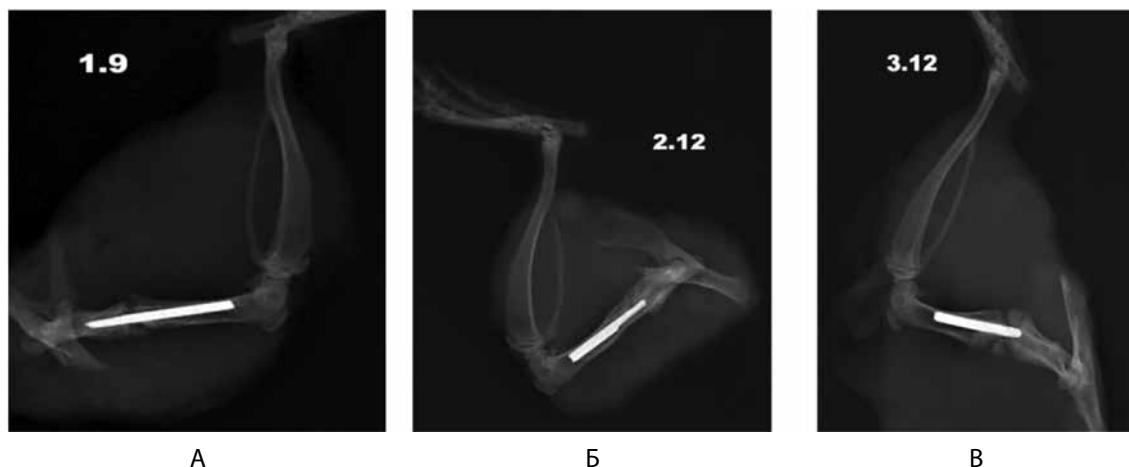
**Результаты рентгенологического исследования.** На 35-е сут после моделирования патологии в группах, получавших Алфлутоп, в отличие от контрольной группы, в единичных случаях были отмечены участки сращения перелома, несмотря на отсутствие статистически значимых отличий (**рис. 1**).

Следует отметить, что непараметрический анализ данных показал отсутствие статистически значимого влияния препарата на процесс заживления перелома по результатам полуколичественной оценки по методу S. Warden и соавт. 2009 [20] ( $p>0,05$ , критерий Краскала-Уоллиса, **табл. 1**).

В ходе эксперимента обнаружена тенденция к усилению репаративных процессов.

Проведение однофакторного дисперсионного анализа показало влияние фактора «группа» на площадь костной мозоли на 35-е сут эксперимента ( $p=0,009$ , ANOVA). При последующем межгрупповом сравнении установлено увеличение площади костной мозоли в группах, получавших тестируемый препарат в дозах 0,2 и 0,45 мл/кг (**рис. 2**) по сравнению с показателем в контрольной группе. Статистически значимого отличия на 21-е сут эксперимента между экспериментальными группами по сравнению с контрольной группой не обнаружено (**рис. 2**).

Таким образом, анализ рентгенологических снимков показал, что в группах животных, получавших терапию тестируемым препаратом, по сравнению с группой контроля наблюдали увеличение случаев перекры-

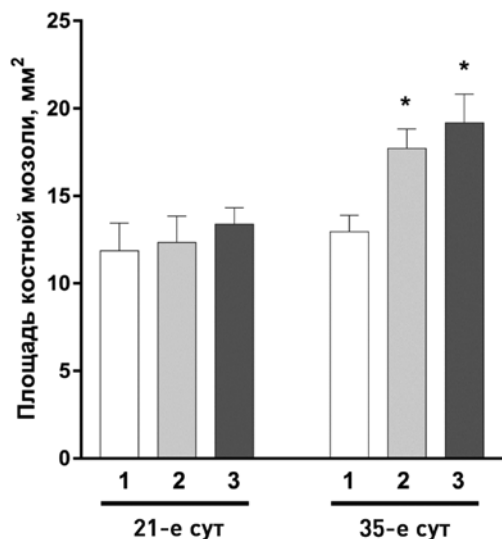


**Рис. 1.** Рентгенограмма (боковая проекция) правой тазовой конечности крыс контрольной группы (А), групп, получавших препарат Алфлутоп в дозах 0,2 мл/кг (Б) и 0,45 мл/кг (В). 35-е сут эксперимента.

**Влияние препарата Алфлутоп на процесс сращения костной ткани, баллы, Ме (Q1:Q3), n=6**

Таблица 1

Группа	Доза препарата мл/кг	День эксперимента	
		21-е сут	35-е сут
Контрольная	0	1,0 (0,0;1,0)	1,5 (1,0;2,0)
Алфлутоп	0,2	1,0 (0,0;1,0)	2,0 (1,0;3,0)
	0,45	1,0 (1,0;2,0)	2,0 (1,0;2,0)



**Рис. 2.** Влияние препарата Алфлутоп на площадь костной мозоли. По оси ординат – площадь костной мозоли в мм². По оси абсцисс – экспериментальные группы. 1 – контрольная группа; 2 – Алфлутоп в дозе 0,2 мл/кг; 3 – Алфлутоп в дозе 0,45 мл/кг; \* –  $p < 0,05$ , статистически значимые отличия от контрольной группы (критерий Тьюки).

тия промежутка костной щели, увеличение площади первичной костной мозоли. Терапевтический эффект препарата достиг статистической значимости на 35-е сут после индукции патологии.

*Результаты гистологического исследования.* На 21-е сут эксперимента в месте перелома во всех экспериментальных группах наблюдали образование первичной костной мозоли, заполняющей дефект и состоящей из грануляционной ткани, богатой сосудами, хрящевой ткани и небольших очагов остеогенной грубоволокнистой соединительной ткани. Хрящевые тяжи проникали в центральную – интрамедиарную зону. Наблюдалась пролиферация остеобластов в зоне перелома, что указывает на процесс формирования хрящевой мозоли. Небольшие участки воспалительной лимфоцитарной инфильтрации и кровоизлияния располагались в перистальной и в интрамедиарной зонах. К 35-м сут в месте перелома отмечалось заполнение дефекта небольшими полями костной ретикулофиброзной и преимущественно хрящевой ткани с крупными хондроцитами и признаками дегенерации (рис. 3, А). В дистальных отделах наблюдали формирование грубоволокнистых костных балок без обызвествления с большим количеством остеобластов и некоторым количеством замурованных остеоцитов (рис. 3, Б). Между трабекулами пространство было заполнено гемопоэтической тканью (рис. 3, В). На 35-е сут у животных всех групп был завершён процесс образования хрящевой мозоли и наблюдался этап замещения ее на костную (рис. 3, Г).

При анализе данных (критерий Краскела-Уоллиса) ни на 21-е, ни на 35-е сут эксперимента различий по исследуемым показателям между группами не установлено (табл. 2).

На 35-е сут эксперимента отмечена тенденция к увеличению выраженности репаративных изменений в месте перелома у крыс, получавших тестируемый

препарат в дозах 0,2 мл/кг и 0,45 мл/кг (табл. 2), не достигшая статистической значимости. Восстановление кортикальной пластинки имело место у 50% живот-

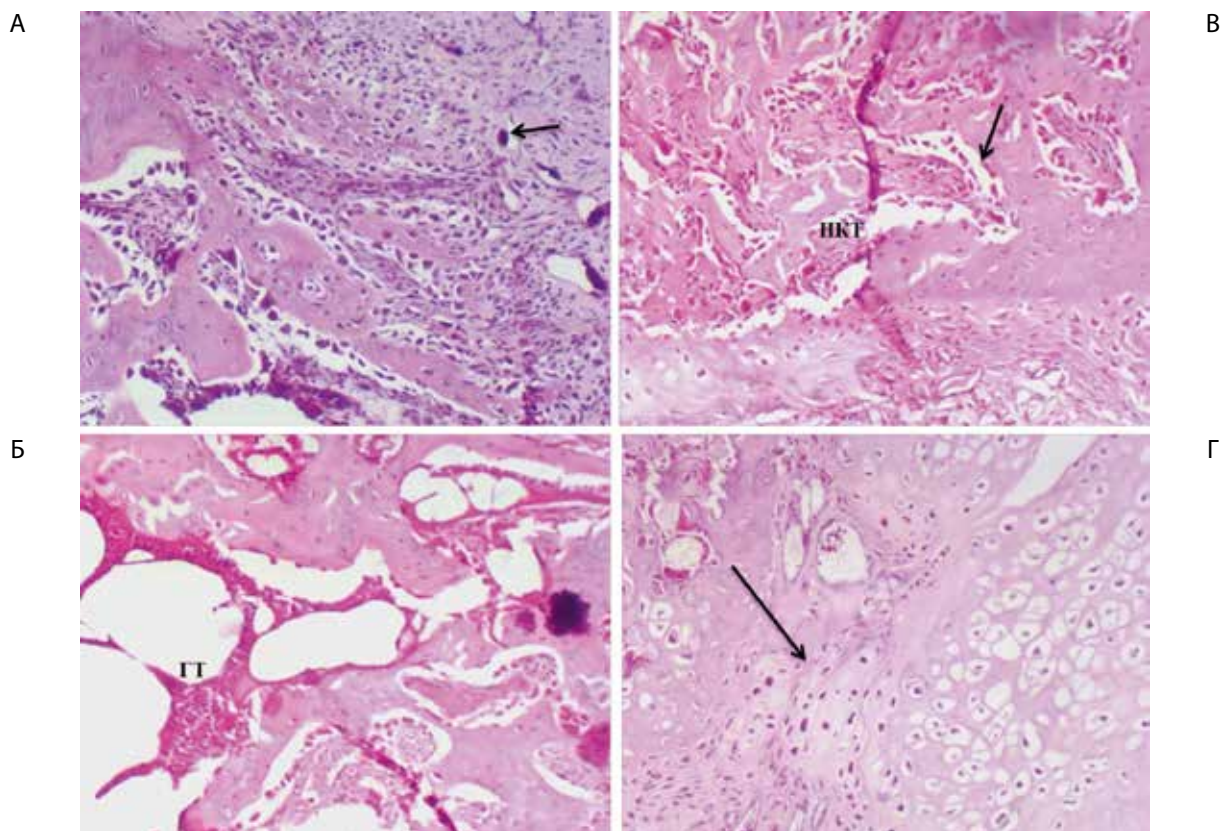


Рис. 3. Срез бедренной кости. Ув. ×100. Окраска гематоксилин-эозин.

**А** – Эндостальная костная мозоль (стрелка) заполняет пространство между костными балками; **Б** – Формирование новых костных балок (НКТ), большое количество остеобластов (стрелка); **В** – Формирование новых костных балок, между которыми обнаруживается гемопоэтическая ткань (ГТ); **Г** – Замещение хрящевой ткани костной, (стрелка).

Таблица 2

Полуколичественная оценка выраженности репаративных изменений (сумма баллов, n=6)

Группа	Доза препарата мл/кг	Оцениваемые показатели		
		Выраженность воспаления	Коллагеновые волокна, формирование новой кости	Восстановление кортикальной пластинки
<i>21-е сут эксперимента</i>				
Контрольная	0	14	8	1
Алфлутоп	0,2	12	9	0
	0,45	15	9	1
<i>35-е сут эксперимента</i>				
Контрольная	0	7	14	1
Алфлутоп	0,2	9	13	2
	0,45	9	14	3

ных, получавших Алфлутоп в максимальной дозе, тогда как в контрольной группе данный признак был обнаружен только в 1 случае.

### Обсуждение

Таким образом, по результатам гистологического исследования во всех группах имело место заживление костного дефекта. На 35-е сут отмечена тенденция к усилению репаративных процессов в месте перелома у животных, получавших Алфлутоп в дозах 0,2 мл/кг и 0,45 мл/кг.

Анализ рентгенологических снимков показал, что репаративный остеогенез был более выражен у животных, получавших Алфлутоп, по сравнению с группой контроля. На фоне терапии в участке перелома наблюдали увеличение количества случаев перекрытия промежутка костной щели, значимое увеличение площади первичной костной мозоли. Наиболее выраженный терапевтический эффект отмечался на 35-е сут после моделирования перелома. В ходе гистологического исследования во всех группах отмечены признаки заживления костного дефекта. На 21-е сут в месте перелома обнаружены отчетливые признаки формирования хрящевой мозоли. К 35-м сут наблюдалась стадия формирования костной мозоли. Хрящевая ткань по-прежнему сохранялась на значительной площади, но при этом наблюдалось образование губчатой костной ткани с формированием костных балок. К 35-м сут эксперимента проявлялась тенденция к усилению репаративных изменений в месте перелома у животных, получавших Алфлутоп в дозах 0,2 мл/кг и 0,45 мл/кг.

По данным литературы к 35-м сут после индукции перелома может наблюдаться оссификация первичной костной мозоли с редукцией её площади и наличием участков полного сращения перелома [20]. В основном такая динамика процесса характерна для моделей, при которых перелом кости формируется по «закрытому» типу, при этом полная консолидация перелома наблюдается лишь к 56-м сут [20]. В проведенном исследовании к 35-м сут полная консолидация костного дефекта не происходила, что обусловлено особенностью моделирования перелома кости (по «открытому» типу) [18]. При таком способе моделирования перелома формируется повреждение костной ткани максимальной степени, а также отсутствует возможность полной иммобилизации конечности животного. При этом процесс заживления перелома происходит по вторичному, или непрямому типу репаративной регенерации (усиленной физиологической регенерации). В клинической практике он наблюдается при лечении переломов длинных трубчатых костей, когда полностью обездвижить костные отломки невозможно, или в случаях недостаточной

иммобилизации конечности гипсовой повязкой. В таких случаях на второй стадии заживления перелома отмечается гипертрофия периостальной костной мозоли, а между отломками процесс заживления начинается с образования хрящевой ткани. Только при обездвижении зоны перелома хрящевая интермедиарная мозоль рассасывается за счет периоста и эндоста и замещается костной. Таким образом, при вторичном типе заживления значительно удлиняется вторая стадия образования костной мозоли. Поскольку полностью иммобилизовать конечность крысы невозможно, животное начинает опираться на нее достаточно быстро (уже на 3-4-е сут после операции), наблюдается замедленная консолидация перелома, которая характеризуется задержкой перехода хрящевой мозоли в костную. На рентгенограмме сохраняется линия перелома и слабые признаки вторичной костной мозоли [22]. При переломе бедренной кости у крыс по «открытому» типу даже на 61-е сут эксперимента интермедиарная костная мозоль может быть представлена разросшейся ретикулофиброзной костной тканью с очагами деградирующего гиалинового хряща и немногочисленными костномозговыми полостями без признаков формирования костномозгового канала [12, 23].

В проведенном исследовании к 35-м сут отмечено усиление образования хрящевой мозоли в группах, получавших Алфлутоп. Это может быть обусловлено стимулирующим действием препарата на хондрогенез, которое было доказано в экспериментах *in vitro* [5, 24], а также рядом клинических исследований, где Алфлутоп использовали у пациентов с остеоартрозом [4, 25]. Особенностью фармакодинамического профиля Алфлутопа является его способность предотвращать разрушение макромолекулярных структур нормальных тканей, стимулировать процессы восстановления в интерстициальной ткани и суставном хряще. Стоит отметить, что на фоне применения высокомолекулярной гиалуроновой кислоты на модели дефекта бедренной кости у крыс было показано ее стимулирующее влияние на формирование кости, обусловленное стимуляцией дифференциации мезенхимальных клеток в области дефекта [26].

Механизм действия препарата Алфлутоп опосредован фармакологической активностью компонентов, входящих в его состав, а именно хондроитина сульфата, который, являясь полимерным сульфатированным гликозаминогликаном, обладает тропностью к хрящевой ткани, инициирует фиксацию серы в процессе синтеза хондроитин-серной кислоты, что, в свою очередь, способствует отложению кальция в костях, замедляет резорбцию костной ткани и снижает потерю  $Ca^{2+}$ . Улучшается также фосфорно-кальциевый об-



мен в хрящевой ткани, ускоряются процессы ее восстановления, задерживаются процессы дегенерации хрящевой и соединительной ткани. Известно, что гликозаминогликаны взаимодействуют с остеоцитами, остеобластами и остеокластами напрямую через интегриновые рецепторы [27] или через другие специфические рецепторы поверхности клеток [28], оказывая тем самым прямое и косвенное влияние на рост, миграцию, дифференцировку и адгезию этих клеток.

Положительное влияние хондроитин сульфата на формирование костной ткани было подтверждено в ряде исследований с использованием различных экспериментальных моделей при остеотомии по открытому типу на мелких и крупных животных [29]. Также хондроитин сульфат способствует усилению взаимодействия спицы Киршнера или любого другого импланта с клетками костной ткани, так как он является посредником для связывания остеобластов и остеокластов с внеклеточной матрицей кости и способствует привлечению в места контактов с имплантом различных медиаторов, таких как факторы роста и цитокины [30]. Поэтому терапия переломов костей препаратами, содержащими хондроитин сульфат, такими как Алфлутоп, приводит к формированию благоприятной среды для остеобластов, в результате улучшается заживление костей вокруг металлических имплантатов путем создания искусственной внеклеточной матрицы на них. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что адсорбционная иммобилизация коллагена и хондроитин сульфата на поверхностях из титана является биологически стабильной и усиливает остеобластную пролиферацию [31], не провоцируя при этом длительных воспалительных или иммунных реакций [32].

Таким образом, в анаболическую фазу после перелома кости хондроитин сульфат, который является основным компонентом препарата Алфлутоп, активирует анаболические процессы и подавляет катаболические, в которых участвуют металлопротеиназы -3,-9,-13, катепсин В, лейкоцитарная эластаза, улучшает микроциркуляцию в субхондральной кости и синовиальной ткани, а также подавляет апоптоз хондроцитов, ингибирует индуцируемую нуклеотидной транслокацией NFκB [33].

Стоит заметить, что эффективность раннего начала введения Алфлутопа согласуется с данными литературы, где было показано, что введение хондроитин сульфата начиная с первого дня способствует более ранней активации клеток хрящевой ткани. Это в свою очередь позволяет ускорить формирование фиброзно-хрящевой мозоли и обеспечить более ранние сроки начала ее минерализации, что способствует более быстрому формированию костной мозоли при переломах и трещинах [34].

## Заключение

Таким образом, Алфлутоп, являясь комплексным препаратом, в состав которого входят высокомолекулярные сульфатированные гликозаминогликаны и глюкоуроновая кислота, стимулирует хондрогенез с последующей оссификацией костной мозоли и репарацией повреждения, что позволяет рассматривать препарат в качестве средства терапии при переломах костей. В целом, полученные к 35-м сут после моделирования патологии результаты говорят об интенсификации процессов консолидации перелома бедренной кости у животных, получавших в течение 20 сут терапию препаратом Алфлутоп в дозах 0,2 мл/кг и 0,45 мл/кг. Данные свидетельствуют о возможности применения препарата в качестве сопутствующей терапии при переломах костей различной степени тяжести.

## Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Куксгауз И.А., Кашкин В.А., Шекунова. Е.В.

Сбор и обработка материала – Куксгауз И.А., Кашкин В.А., Шекунова. Е.В., Гушин Я.В.

Статистическая обработка – Куксгауз И.А., Кашкин В.А., Шекунова. Е.В.

Написание текста – Куксгауз И.А., Кашкин В.А., Шекунова Е.В.

Редактирование – Макаров В.Г., Макарова М.Н.

## Литература

1. Алфлутоп (Alflutop®). Available at: [https://grls.rosminzdrav.ru/Grls\\_View\\_v2.aspx?routingGuid=e8ad7e7f-98c1-4389-a6d6-1fc8c4cd969a&t](https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=e8ad7e7f-98c1-4389-a6d6-1fc8c4cd969a&t).
2. Волошин В.П., Сараванан С.А., Еремин А.В. и др. Исследование эффективности действия препарата хондрогард (хондроитин сульфат) у пациентов с переломами различной локализации. *Фарматека*. 2016; 7: 76-9.
3. Вавилова Т.П. *Биохимия тканей и жидкостей полостей рта: учебное пособие*. Глава 5. Биохимия костной ткани. 2-е изд., испр. и доп.; М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008.
4. Пешехонова Л.К., Красюков П.А., Пешехонов Д.В. Оценка роли Алфлутопа в терапии остеоартроза: показания, клиническая эффективность, переносимость и влияние на качество жизни. *Медицинский совет*. 2016; 11: 100-4.
5. Olariu L, Pyatigorskaya N, Dumitriu B, Manuela D, Pavlov A, Rosoiu N. Alflutop® modulates "in vitro" relevant mechanisms of osteoarthritic pathology. *Academy of Romanian Scientists Annals Series on Biological Sciences*. 2017; 6(1): 82-99.
6. McAlindon T.E., LaValley M.P., Gulin J.P., Felson D.T. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. *Jama*. 2000; 283(11): 1469-75.
7. Мартель И.И. Чрескостный остеосинтез по Илизарову в комплексном лечении больных с открытыми повреждениями конечностей. *Гений ортопедии*. 2011; 2: 44-8.

8. Мироманов А.М., Герасимов А.А., Намоконов Е.В., Мироманова Н.А. Прогнозирование гнойно-воспалительных осложнений при открытых переломах длинных трубчатых костей. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2009; 168(3): 57-60.
9. Ключевский В.В., Соловьёв И.Н., Литвинов И.И., Тимушев А.А. Лечение открытых переломов голени. *Врач-аспирант*. 2015; 68(1.1): 199-203.
10. Кавалерский Г.М., Петров Н.В., Бровкин С.В., Смирнов А.Е., Калашник А.Д., Карев А.С. и др. К вопросу о лечении открытых переломов голени. *Московский хирургический журнал*. 2014; 6: 33-6.
11. Mathavan N., Tägil M., Isaksson H. Do osteoporotic fractures constitute a greater recalcitrant challenge for skeletal regeneration? Investigating the efficacy of BMP-7 and zoledronate treatment of diaphyseal fractures in an open fracture osteoporotic rat model. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2017; 28(2): 697-707.
12. Миханов В.А., Полякова В.С., Копылов В.А., Мхитарян Е.Е. Репаративный гистогенез костной ткани в условиях открытого перелома диафиза длинной трубчатой кости у крыс при использовании препарата «ВИНФАР». *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 3: 162.
13. Копылов В.А., Сафронов А.А., Захаров В.В. Стимуляция репаративного остеогенеза при лечении открытых переломов с помощью метаболитов bacillus subtilis 804, содержащих фактор роста фибробластов. *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal)*. 2016; 9: 72-9.
14. Penn-Barwell J.G., Baker B., Wenke J.C. Local bismuth thiols potentiate antibiotics and reduce infection in a contaminated open fracture model. *J Orthop Trauma*. 2015; 29(2): e73-8.
15. Mills R., Cheng T.L., Mikulec K., Peacock L., Isaacs D., Genberg C., et al. CSA-90 Promotes Bone Formation and Mitigates Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Infection in a Rat Open Fracture Model. *Clinical orthopaedics and related research*. 2018; 476(6): 1311-23.
16. Frost H. M. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res*. 1989; 248: 283-93.
17. Currey J.A., Mancuso M., Kalikoff S., Miller E., Day S. Controlled cyclic compression of an open tibial fracture using an external fixator affects fracture healing in mice. *J Biomech Eng*. 2015; 137(5): 051011.
18. Metineren H, Dulgeroglu TC, Metineren MH, Aydin E. Effect of neivolol on fracture healing: An experimental rat model. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*. 2017; 26(6): 919-23.
19. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals at UCSF. The Regents of the University of California. Available at: <http://www.iacuc.ucsf.edu/Proc/awRbtFrm.asp>.
20. Warden SJ, Komatsu DE, Rydberg J, Bond JL, Hassett SM. Recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34) and low-intensity pulsed ultrasound have contrasting additive effects during fracture healing. *Bone*. 2009; 44(3): 485-94.
21. Магруппов Б.А., Шадманов Т.Т., Ташпулатов А.А., Ходжаев Р.Р., Валиев Э.Ю. Реакция костной ткани на некоторые имплантаты в эксперименте. *Морфология*. 2012; VI(2): 19-28.
22. Вологовский А.И., Макаревич Е.Р., Чирак В.Э. *Регенерация костной ткани в норме и при патологии: метод. рекомендации*. Минск; БГМУ; 2010.
23. Garcia P, Histing T, Holstein JH, et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *European cells & materials*. 2013; 26: 1-12; discussion 12-14.
24. Olariu L, Pyatigorskaya N, Dumitriu B. "In vitro" chondro-restitutive capacity of Allflutop® proved on chondrocytes cultures. *Romanian Biotechnological Letters*. 2016; 22(6): 12047-53.
25. Чичасова Н.В. Современная терапия остеоартроза. *Медицинский совет*. 2017; 17: 138-45.
26. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*. 1995; 16(1): 9-15.
27. Grzesik W. J. Integrins and bone-cell adhesion and beyond. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1997; 45(4): 271-5.
28. Lee J. W., Juliano R. Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells*. 2004; 17(2): 188-202.
29. Dudeck J., Rehberg S., Bernhardt R., Schneiders W., Zierau O., Inderchand M., et al. Increased bone remodelling around titanium implants coated with chondroitin sulfate in ovariectomized rats. *Acta Biomater*. 2014; 10(6): 2855-65.
30. Ruoslahti E., Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991; 64(5): 867-9.
31. Bierbaum S., Douglas T., Hanke T., Scharnweber D., Tippelt S., Monsees T. K., Funk R. H., Worch H. Collageneous matrix coatings on titanium implants modified with decorin and chondroitin sulfate: characterization and influence on osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 77(3): 551-62.
32. Rammelt S., Illert T., Bierbaum S., Scharnweber D., Zwipp H., Schneiders W. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials*. 2006; 27(32): 5561-71.
33. Федоров В.Г. *Импрессионные переломы костей нижних конечностей. Определение, классификация, тактика лечения. Книга 1*. Ижевск; ОАО «Ижевская республиканская типография»; 2014.
34. Шелудченко О.С. Способ лечения повреждений опорно-двигательного аппарата, связанных с нарушением целостности кости, фармацевтический препарат для его осуществления и применение хондроитин сульфата для ускорения формирования фиброзно-хрящевой мозоли. Патент 2667468, РФ, 2018.

## References

1. Allflutop (Allflutop®). Available at: [https://grls.rosminzdrav.ru/Grls\\_View\\_v2.aspx?routingGuid=e8ad7e7f-98c1-4389-a6d6-1fc8c4cd969a&t](https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=e8ad7e7f-98c1-4389-a6d6-1fc8c4cd969a&t).
2. Voloshin VP, Saravanan SA, Eremin AV, et al. Study of chondroguard (chondroitin sulfate) efficacy in patients with fractures of different localization. *Farmateka*. 2016; 7: 76-9. (in Russian)
3. Vavilova TP. *Biochemistry of tissues and oral fluids: A training manual. Chapter 5 Bone Biochemistry 2nd ed. [Biokhimiya tkaney i zhidkostey polostey rta: uchebnoe posobie. Glava 5 Biokhimiya kostnoy tkani 2 izd]*; Moscow; GEOTAR-Media; 2008. (in Russian)
4. Peshehonova LK, Krasjukov PA, Peshehonov DV. Assessing the role of Allflutopus in osteoarthritis therapy: indications, clinical efficacy, tolerance and impact on quality of life. *Meditsinskiy sovet*. 2016; 11: 100-4. (in Russian)
5. Olariu L, Pyatigorskaya N, Dumitriu B, Manuela D, Pavlov A, Rosoiu N. Allflutop®modulates "in vitro" relevant mechanisms of osteoarthritic pathology. *Academy of Romanian ScientistsAnnals Series on BiologicalSciences*. 2017; 6(1): 82-99.
6. McAlindon T.E., LaValley M.P., Gulin J.P., Felson D.T. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. *Jama*. 2000; 283(11): 1469-75.
7. Martel' I.I. Abrupt osteosynthesis by Ilizarov in the complex treatment of patients with open limb injuries. *Geniy ortopedii*. 2011; 2: 44-8. (in Russian)
8. Miromanov A.M., Gerasimov A.A., Namokonov E.V., Miromanova N.A. Prediction of purulent-inflammatory complications in open fractures of long tubular bones. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova*. 2009; 168(3): 57-60. (in Russian)

9. Kluchevskiy V.V., Solov'yov I.N., Litvinov I.I., Timushev A.A. Treatment of open tibia fractures. *Vrach-aspirant*. 2015; 68(1.1): 199-03. (in Russian)
10. Kavalerskiy G.M., Petrov N.V., Brovkin S.V., Smirnov A.E., Kalashnik A.D., Karev A.S., et al. On the issue of treating open tibia fractures. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2014; 6: 33-6. (in Russian)
11. Mathavan N., Tägil M., Isaksson H. Do osteoporotic fractures constitute a greater recalcitrant challenge for skeletal regeneration? Investigating the efficacy of BMP-7 and zoledronate treatment of diaphyseal fractures in an open fracture osteoporotic rat model. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2017; 28(2): 697-07.
12. Mihanov V.A., Polyakova V.S., Kopylov V.A., Mhitaryan E.E. Reparative bone histogenesis in open fracture of long bone diaphysis in rats using «WINFAR». *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 3: 162. (in Russian)
13. Kopylov V.A., Safronov A.A., Zakharov V.V. Stimulation of reparative osteogenesis in the treatment of open fractures using metabolites of bacillus subtilis 804 containing the fibroblast growth factor. *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal)*. 2016; 9: 72-9. (in Russian)
14. Penn-Barwell J.G., Baker B., Wenke J.C. Local bismuth thiols potentiate antibiotics and reduce infection in a contaminated open fracture model. *J Orthop Trauma*. 2015; 29(2): e73-8.
15. Mills R., Cheng T.L., Mikulec K., Peacock L., Isaacs D., Genberg C., et al. CSA-90 Promotes Bone Formation and Mitigates Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Infection in a Rat Open Fracture Model. *Clinical orthopaedics and related research*. 2018; 476(6): 1311-23.
16. Frost H.M. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res*. 1989; 248: 283-93.
17. Currey J.A., Mancuso M., Kalikoff S., Miller E., Day S. Controlled cyclic compression of an open tibial fracture using an external fixator affects fracture healing in mice. *J Biomech Eng*. 2015; 137(5): 051011.
18. Metineren H, Dulgeroglu TC, Metineren MH, Aydin E. Effect of nebulivolol on fracture healing: An experimental rat model. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*. 2017; 26(6): 919-23.
19. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals at UCSF. The Regents of the University of California. Available at: <http://www.iacuc.ucsf.edu/Proc/awRbtFrm.asp>.
20. Warden SJ, Komatsu DE, Rydberg J, Bond JL, Hassett SM. Recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34) and low-intensity pulsed ultrasound have contrasting additive effects during fracture healing. *Bone*. 2009; 44(3): 485-94.
21. Magrupov B.A., Shadmanov T.T., Tashpulatov A.A., Hodzhaev R.R., Valiev E.Yu. Response of bone tissue to some implants in the experiment. *Morfologiya*. 2012; VI(2): 19-28. (in Russian)
22. Volotovskiy A.I., Makarevich E.R., Chirak V.Y. *Bone regeneration in normal and pathological conditions: guidelines*. Minsk; BGMU; 2010. (in Russian)
23. Garcia P, Histing T, Holstein JH, et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *European cells & materials*. 2013; 26: 1-12; discussion 12-14.
24. Olariu L, Pyatigorskaya N, Dumitriu B. "In vitro" chondro-restitutive capacity of Allutop® proved on chondrocytes cultures. *Romanian Biotechnological Letters*. 2016; 22(6): 12047-53.
25. Chichasova N.V. Modern osteoarthritis therapy. *Meditsinskiy sovet*. 2017; 17: 138-45. (in Russian)
26. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronin acid. *Bone*. 1995; 16(1): 9-15.
27. Grzesik W.J. Integrins and bone-cell adhesion and beyond. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1997; 45(4): 271-5.
28. Lee J.W., Juliano R. Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells*. 2004; 17(2): 188-202.
29. Dudeck J., Rehberg S., Bernhardt R., Schneiders W., Zierau O., Inderchand M., Goebels J., Vollmer G., Fratzl P., Scharnweber D., Rammelt S. Increased bone remodelling around titanium implants coated with chondroitin sulfate in ovariectomized rats. *Acta Biomater*. 2014; 10(6): 2855-65.
30. Ruoslahti E., Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991; 64(5): 867-9.
31. Bierbaum S., Douglas T., Hanke T., Scharnweber D., Tippelt S., Monsees T. K. et al. . Collageneous matrix coatings on titanium implants modified with decorin and chondroitin sulfate: characterization and influence on osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 77(3): 551-62.
32. Rammelt S., Illert T., Bierbaum S., Scharnweber D., Zwipp H., Schneiders W. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials*. 2006; 27(32): 5561-71.
33. Fedorov V.G. *Impressionne fractures of the lower extremities. Definition, classification, therapeutic approach. Book 1. [Impressionnye perelomy kostey nizhnikh konechnostey. Opredelenie, klassifikatsiya, taktika lecheniya. Kniga 1]*. Izhevsk: OAO «Izhevskaya respublikanskaya tipografiya»; 2014. (in Russian)
34. Sheludchenko O.S. *Method for treating damage of musculoskeletal system related to solution of continuity, pharmaceutical medication for its implementation and use of chondroitin sulfate for accelerating formation of fibrocartilagenous callus. [Sposob lecheniya povrezhdeniy oporno-dvigatel'nogo apparata, svyazannykh s narusheniem tselostnosti kosti, farmatsevticheskiy preparat dlya ego osushchestvleniya i primeneniye hondroitin sul'fata dlya uskoreniya formirovaniya fibrozno-khryashchevyy mozoli. Patent 2667468]*. RF, 2018. (in Russian)

**Сведения об авторах:**

**Куксгауз Илона Александровна**, фармаколог отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии;

**Кашкин Владимир Александрович**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отдел экспериментальной фармакологии, e-mail: kashkinv@gmail.com;

**Шекунова Елена Васильевна**, канд. биол. наук, руководитель отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии;

**Гущин Ярослав Александрович**, руководитель отдела гистологии и патоморфологии;

**Макарова Марина Николаевна**, доктор мед. наук, заместитель директора по науке;

**Макаров Валерий Геннадьевич**, доктор мед. наук, проф., директор, ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации».

## Краткие сообщения

© Коллектив авторов, 2020  
УДК 615:616.33:616.34:615.243

Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Стрелкова Л.Б., Курманов Р.К., Шейченко О.П.

# Изучение противовоспалительной активности экстракта змееголовника молдавского

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

Змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.) в народной медицине используется в качестве противовоспалительного, ранозаживляющего, отхаркивающего и седативного средства. В ФГБНУ ВИЛАР разработан змееголовника молдавского травы экстракт сухой под условным названием «Люкатыл» (сумма фенольных соединений 64,12% в пересчёте на цинарозид). **Цель работы** – изучение острой токсичности и противовоспалительной активности экстракта змееголовника для разработки на его основе лекарственного препарата. **Методика.** Проведено определение параметров острой токсичности и противовоспалительной активности экстракта. При изучении острой токсичности экстракта по методу Кербера использованы белые нелинейные мыши-самцы в количестве 30 особей. «Люкатыл» вводили животным внутрижелудочно в дозах 500, 1000, 1500 и 2000 мг/кг. Для выявления противовоспалительной активности экстракта змееголовника молдавского использована *in vitro* ферментная биотест-система на основе индуцибельной NO-синтазы. Для выявления противовоспалительной активности экстракта *in vivo* использованы нелинейные мыши-самцы. Оценку влияния экстракта в дозе 200 мг/кг на экссудативную стадию воспаления проводили на модели 1% формалинового отёка. В качестве препарата сравнения использовали индометацин (5 мг/кг). Формалиновый отёк вызывали однократным субплантарным введением под апоневроз задней правой лапки мыши 0,05 мл 1% формалина в качестве флогогенного агента. Величину отёка определяли по разнице в массе лапок контрольных и опытных животных и рассчитывали процент снижения степени отёка. **Результаты.** При однократном введении экстракт «Люкатыл» не приводил к гибели животных, изменения внешнего вида и поведенческих реакций мышей не наблюдалось. В соответствии с классификацией токсичности химических веществ по ГОСТ 12.1.007-76 «Люкатыл» является малотоксичным веществом. *In vitro* установлена высокая противовоспалительная активность экстракта, при этом остаточная активность iNOS снижалась до 25%. Экстракт в дозе 200 мг/кг *in vivo* обладал статистически значимым противовоспалительным эффектом. Он подавлял развитие экссудативной фазы воспаления на 33,7%, по сравнению с контрольной группой животных, уступая противовоспалительному эффекту индометацина. **Заключение.** Змееголовника молдавского травы экстракт сухой под условным названием «Люкатыл» является малотоксичным веществом, обладает выраженным противовоспалительным эффектом в опытах *in vitro*, *in vivo* и является перспективным объектом для дальнейшего фармакологического изучения в качестве противовоспалительного лекарственного средства.

**Ключевые слова:** змееголовника молдавского травы экстракт сухой; экссудативная стадия воспаления, противовоспалительная активность; биотест-системы, острая токсичность.

**Для цитирования:** Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Стрелкова Л.Б., Курманов Р.К., Шейченко О.П. Изучение противовоспалительной активности экстракта змееголовника молдавского. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(1): 108-112.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.108-112

**Для корреспонденции:** Курманова Елена Николаевна, e-mail: kurmanova1968@yandex.ru

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

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

**Поступила** 15.04.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Strelkova L.B., Kurmanov R.K., Sheichenko O.P.

## Anti-inflammatory activity of the moldavian dragonhead extract

All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Grina Str. 7, Bld. 1, Moscow 117216, Russia

Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) is used in traditional medicine as an anti-inflammatory, wound-healing, expectorant, and sedative means. In our Institute, a Moldavian dragonhead herb dry extract (total phenolic content, 64.12% in

cynaroside equivalent) was developed and conventionally named Lyukatil. **Objective.** To study acute toxicity and anti-inflammatory activity of the dragonhead extract for developing a drug based on this extract. **Method.** Parameters of acute toxicity and anti-inflammatory activity of the extract were assessed. The study of acute toxicity of the extract was performed using the Kerber method on male white mongrel mice (n=30). Lyukatil was administered to the animals intragastrically at doses of 500 mg/kg, 1000 mg/kg, 1500 mg/kg, and 2000 mg/kg. Anti-inflammatory activity of the Moldavian dragonhead extract was determined *in vitro* using an enzyme Biotest system based on inducible NO synthase. Mongrel male mice were used to study the anti-inflammatory activity of the extract *in vivo*. The effect of the extract at a dose of 200 mg/kg on the exudative phase of inflammation was evaluated on a model of 1% formalin-induced edema. Indomethacin 5 mg/kg was used as a reference drug. Formalin edema was induced by a single subplantar injection of 0.05 ml of 1% formalin as a phlogogenic agent under the aponeurosis of the right hind leg. The degree of edema was determined by the difference in leg weights in control and experimental animals; then the decrease in edema was calculated in per cent. **Results.** A single administration of the extract Lyukatil did not cause death of animals, changes in the appearance or in behavioral responses, shortness of breath, or drowsiness. In accordance with the toxicity classification for chemical substances as per GOST Standard 12.1.007-76, Lyukatil is a low-toxic substance. The extract at a dose of 200 mg/kg exerted a significant anti-inflammatory effect as shown by suppression of the exudative phase of formalin-induced inflammation by 33.7% compared to the control group. However, this effect was inferior to the anti-inflammatory effect of indomethacin. **Conclusions.** The Moldavian dragonhead herb dry extract under the conventional name of Lyukatil is a low-toxic substance that has a significant anti-inflammatory effect both *in vitro* and *in vivo* and is a promising target for further pharmacological studies as an anti-inflammatory drug.

**Keywords:** змееголовника молдавского травы экстракт сухой; экссудативная стадия воспаления, противовоспалительная активность; биотест-системы, острая токсичность.

**For citation:** Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Strelkova L.B., Kurmanov R.K., Sheichenko O.P. Anti-inflammatory activity of the moldavian dragonhead extract. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 108-112. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.108-112

**For correspondence:** Kurmanova E.N. Researcher, Department of Experimental and Clinical Pharmacology, e-mail: kurmanova1968@yandex.ru

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

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

#### Information about authors:

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

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

**Received** 15.04.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

Воспаление – важный патогенетический компонент многих заболеваний и его фармакологическая коррекция является актуальной проблемой современной медицины. Поражение суставов и боли в спине являются частыми состояниями, с которыми больные обращаются к врачу и которые приводят к инвалидизации пациентов [1]. При заболеваниях, в основе которых лежит воспаление, наряду с кортикостероидными, иммунодепрессивными и нестероидными противовоспалительными средствами могут успешно использоваться и препараты из лекарственных растений, обладающие противовоспалительными свойствами. Змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.) издавна используется в народной медицине в качестве противовоспалительного, ранозаживляющего, отхаркивающего и седативного средства. В надземной части этого растения обнаружены эфирные масла, флавоно-

иды, тритерпеновые кислоты, оксикоричные кислоты (хлорогеновая, феруловая, цикориевая) [2]. В ФГБНУ ВИЛАР более 10 лет проводятся комплексные исследования по разработке оригинального лекарственного средства на основе змееголовника молдавского. Это растение введено в культуру, разработана агротехнология, создан новый сорт «Нежность» [3]. В отделе фитохимии разработан способ получения змееголовника молдавского травы экстракта сухого под условным названием «Люкати́л» (сумма фенольных соединений 64,12% в пересчёте на цинарозид).

Цель исследования – изучение острой токсичности и противовоспалительной активности экстракта для разработки лекарственного препарата на его основе.

## Методика

В отделе экспериментальной и клинической фармакологии проведено определение параметров острой

токсичности и противовоспалительной активности змееголовника молдавского травя экстракта сухого под условным названием «Люкати́л». Эксперименты проведены в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Москва, 2012), Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Протокол экспериментов одобрен биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР. Производитель животных – Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБТ» ФМБА России (Московская область). Животные содержались в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе.

*Определение параметров острой токсичности при однократном внутрижелудочном введении экстракта по методу Кербера [4].* В эксперименте по изучению острой токсичности использованы белые нелинейные мыши самцы в количестве 30 особей, массой 20–22 г, в группах по 6 животных. Сухой экстракт змееголовника молдавского «Люкати́л» растворяли в дистиллированной воде и вводили животным внутрижелудочно в дозах 500, 1000, 1500, 2000 мг/кг. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду в эквивалентном объёме. Наблюдение за состоянием подопытных животных проводили в течение 14 сут, оценивали изменение внешнего вида и поведенческие реакции мышей, следили за двигательной активностью, реакцией на внешние раздражители и сроками гибели.

*Разработка специфических биотест-систем.* В ФГБНУ ВИЛАР в течение ряда лет ведется разработка приоритетного направления создания молекулярных специфических биотест-систем *in vitro*, проявляющих высокую избирательность к биологически активным веществам (БАВ), обладающим соответствующими фармакологическими свойствами. Разработаны и запатентованы оригинальные биотест-системы на основе ферментов антиоксидантной защиты (каталазы, глутатионредуктазы), воспаления (индуцибельной NO-синтазы), иммунной системы (НАДФН-оксидазы), ферментов биотрансформации – системы цитохрома P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазы. Оригинальные биотест-системы обладают помимо высокой избирательности информативностью, чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, быстротой достижения результатов, что позволяют оптимизировать доклинические исследования.

Для оптимизации выявления биологической активности экстракта змееголовника молдавского используется ферментная биотест-система на основе индуди-

бельной NO-синтазы (iNOS), которая входит в состав Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС) ФГБНУ ВИЛАР [5]. Исследован водный раствор экстракта змееголовника молдавского в исходной концентрации 2 мг/мл.

При определении скорости ферментативной реакции, катализируемой индуцибельной NO-синтазой, концентрация экстрактов змееголовника составляла 13,3 мкг на 1 мл реакционной пробы. Скорость iNOS-реакции определяли на двухлучевом спектрофотометре «Shimadzu UV1800» (Япония) при длине волны 340 нм используя программу кинетических исследований.

При изучении противовоспалительной активности экстракта *in vivo* использованы белые нелинейные мыши самцы в количестве 30 особей, массой 19–20 г. Оценку влияния экстракта на течение экссудативной стадии воспаления проводили на модели 1% формалинового отёка. Животные были разделены на 3 группы: 1-я группа – формалиновый отёк без лечения (контроль), 2-я – формалиновый отёк + экстракт змееголовника (200 мг/кг) и 3-я группа – формалиновый отёк + препарат сравнения. В каждой группе было по 10 крыс. Экстракт змееголовника вводили внутрижелудочно (200 мг/кг) в течение 3 сут до введения и через 1 ч после введения формалина. В качестве препарата сравнения использовано известное противовоспалительное средство индометацин (таблетки 25 мг «Софарма», Болгария) в расчетной дозе 5 мг/кг. Индометацин вводили внутрижелудочно по аналогичной схеме. Формалиновый отёк вызывали однократным субплантарным введением под апоневроз задней правой лапки мыши 0,05 мл 1% формалина в качестве флогогенного агента [6]. Через 3 ч после введения формалина (на пике воспаления) животных подвергали эвтаназии в CO<sub>2</sub> камере и регистрировали прирост объёма экссудата ампутированных конечностей мышей (мг). Величину отёка определяли по разнице в массе лапок у контрольных и опытных животных и рассчитывали выраженность отека в процентах по формуле:

$$\text{выраженность отёка (\%)} = \frac{P_k - P_0}{P_k} \times 100$$

где P<sub>k</sub> – разность масс лапок с отёком и без отёка у животных контрольной группы; P<sub>0</sub> – разность масс лапок с отёком и без отёка у животных опытной группы.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (Stat Soft, США). При исследовании *in vitro* для нормального распределения величин статистическую значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента. В опытах *in vivo* значимость различий между группами оценивали по критерию Манна – Уитни.

Различия статистически достоверны по сравнению с контролем при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты

*Изучение острой токсичности препарата «Люкати́л» in vivo.* При однократном введении сухого экстракта змееголовника молдавского «Люкати́л» (сумма фенольных соединений 64,12% в пересчёте на цинарозид) в дозах 500, 1000, 1500, 2000 мг/кг не наблюдалось гибели животных, изменения их внешнего вида, поведенческих реакций, а также отсутствовала одышка и сонливость. Животные были активны, охотно поедали корм, адекватно реагировали на внешние раздражители. При изучении острой токсичности препарата не установлены показатели ЛД<sub>50</sub>, так как внутрижелудочное введение исследуемых доз не приводило к гибели животных. В соответствии с классификацией токсичности химических веществ по ГОСТ 12.1.007-76 сухой экстракт змееголовника молдавского «Люкати́л» относится к малотоксичным веществам [7].

*Противовоспалительная активность змееголовника молдавского in vitro.* Результаты исследований приведены в **таблице 1**.

Для оценки противовоспалительной активности экстракта змееголовника молдавского с применением *iNOS* тест-системы определяли скорость ферментативной *iNOS*-реакции до (контроль) и после добавления в реакционную пробу исследуемого образца (опыт) в условиях *in vitro*. При анализе полученных данных уста-

новлена высокая противовоспалительная активность экстракта змееголовника молдавского, при этом остаточная активность *iNOS* снижалась до 25%. Таким образом, установлено, что образец экстракта змееголовника молдавского в условиях опытов *in vitro* обладает выраженной противовоспалительной активностью.

*Влияние препарата «Люкати́л» на выраженность формалинового отека.* Результаты изучения влияния сухого экстракта змееголовника молдавского на выраженность экссудативной фазы воспаления представлены в **таблице 2**.

Данные, представленные в **таблице 2**, свидетельствуют о том, что исследуемый экстракт (200 мг/кг) при 3-х-суточном введении обладает статистически значимым противовоспалительным эффектом. Он подавляет развитие экссудативной фазы, вызванной введением 1% раствора формалином, на 33,7% по сравнению с контролем, но уступал противовоспалительному эффекту индометацина, который подавлял развитие экссудативной фазы, вызванной формалином, на 42,8%.

### Заключение

Таким образом, змееголовника молдавского травы экстракт сухой под условным названием «Люкати́л» является малотоксичным веществом, обладающим выраженным противовоспалительным эффектом в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Препарат является перспек-

Таблица 1

**Влияние экстракта змееголовника молдавского на скорость ферментативной реакции, катализируемой индуцибельной NO-синтазой**

Вариант опыта	Скорость <i>iNOS</i> –реакции	
	нмоль НАДФН/ мин. мг белка	Опыт/ контроль (%)
Контроль (без препарата)	4,384 ± 0,087	100
экстракт змееголовника молдавского	1,096 ± 0,064*	25

**Примечание.** \* – различия статистически значимы по сравнению с контролем при  $p \leq 0,05$ .

Таблица 2

**Изучение влияния змееголовника молдавского травы экстракта сухого «Люкати́л» на течение экссудативной фазы воспаления у мышей при 3-х-суточном введении**

Препарат (n=10)	Доза, мг/кг	Прирост объема экссудата на пике воспаления, мг	Противовоспалительный эффект (% к контролю)
Контроль (вода дистиллированная)	–	184,2±4,1	–
Люкати́л	200 мг/кг	122,1±1,84*	33,7
Индометацин	5 мг/кг	105,38±2,3*	42,8

**Примечание.** \* – различия статистически значимы по сравнению с контролем при  $p \leq 0,05$ .

тивным объектом для дальнейшего изучения в качестве противовоспалительного лекарственного средства.

Исследования были проведены по теме: «Проведение доклинических исследований отдельных фракций, субстанций и лекарственных препаратов из лекарственного растительного сырья», шифр темы № 0576-2019-0009/

**Участие авторов:**

Концепция и дизайн исследования – Курманова Е.Н., Ферубко Е.В.

Сбор и обработка материала – Курманов Р.К., Стрелкова Л.Б., Шейченко О.П.

Статистическая обработка – Курманова Е.Н., Ферубко Е.В.

Написание текста – Курманова Е.Н.

Редактирование текста – Ферубко Е.В.

**Литература**

1. Чичасова Н.В. Место медленнодействующих препаратов в рациональной терапии деформирующего остеоартроза. *Consilium Medicum*. 2005; 8: 634-8.
2. Соколов П.Д. *Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Hippuridaceae-Lobeliaceae*. СПб; Наука, 1991.
3. Тоцкая С.А. Станишевская И.Е., Хазиева Ф.М., Сидельников Н.И. Приёмы повышения урожайности и качества семян змеголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L.) *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2012; 7: 47-50.
4. Сернов Л.Н., Гацура В.В. *Элементы экспериментальной фармакологии*. М.; Медицина, 2000.
5. Стрелкова Л.Б., Кондакова Н.В., Дубинская В.А., Быков В.А. Индуцибельная NO-синтаза как ферментная биотест-система

ма для выявления веществ с противовоспалительными свойствами *in vitro*. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2013; 11: 75–80.

6. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть первая. М.; Гриф и К, 2012.
7. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Хим.-фарм. журн.* 2003; 37(3): 32-4.

**References**

1. Chichasova N. In. The place of slow-acting drugs in the rational therapy of deforming osteoarthritis. *Consilium Medicum*. 2005; 8: 634-8. (in Russian)
2. Sokolov P.D. *Plant resources of the USSR. Flowering plants, their chemical composition, use. Families Hippuridaceae-Lobeliaceae. [Rastitel'nye resursy SSSR: Tsvetkovye rasteniya, ikh khimicheskiiy sostav, ispol'zovanie; Semeystva Hippuridaceae-Lobeliaceae]*. Sankt Peterburg; Nauka, 1991. (in Russian)
3. Tockaya S.A., Stanishevskaya I.E., Hazieva F.M., Sidelnikov N.I. Methods of increase of productivity and quality of seeds of a dragonhead Moldavian (*Dracocephalum moldavica* L.) *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2012; 7: 47-50. (in Russian)
4. Sernov L.N., Gatsura V.V. *Elements of experimental pharmacology [Elementy eksperimental'noy farmakologii]*. Moscow; Meditsina, 2000. (in Russian)
5. Strelkova, L.B., Kondakova N.V., Dubinskaya V.A., Bykov V.A. Inducible NO-synthase as an enzyme Biotest system for the detection of substances with anti-inflammatory properties *in vitro*. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2013; (11): 75-80
6. *Guide to carrying out preclinical researches of pharmaceuticals. Part one. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. Chast' pervaya. Moscow; Grif i K; 2012. (in Russian)
7. Berезovskaya I.V. Classification of chemicals according to the parameters of acute toxicity in parenteral administration. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2003; 37(3): 32-4.

**Сведения об авторах:**

**Курманова Елена Николаевна**, науч. сотр. отдела экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: kurmanova1968@yandex.ru;

**Ферубко Екатерина Владимировна**, канд. мед. наук, зав. отделом экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

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

**Курманов Ришат Каримович**, науч. сотр. отдела экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

**Шейченко Ольга Петровна**, канд. хим. наук, зав. отделом фитохимии ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений».



© Коллектив авторов, 2020

УДК 615.32: 612.017.1

Хобракова В.Б.<sup>1,2</sup>, Халзанова А.В.<sup>2</sup>, Оленников Д.Н.<sup>1</sup>, Павлова С.И.<sup>3</sup>, Абидуева Л.Р.<sup>2</sup>

## Иммунотропная активность экстракта сухого *Silene jenseensis* Willd при экспериментальном иммунодефиците

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН,

670047, г. Улан-Удэ, Россия, ул. Сахьяновой, д. 6;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет»,

670000, г. Улан-Удэ, Россия, ул. Смолина, д. 24а;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»,

428015, г. Чебоксары, Россия, Московский просп., д. 15

**Цель исследования** – оценка иммунотропных свойств экстракта сухого *Silene jenseensis* Willd в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при циклофосфановой иммуносупрессии. **Методика.** Опыты проведены на 60 мышах-самцах линии F1 (СВАхС57В1/6) массой 18–20 г. Иммунодефицит моделировали внутрибрюшинным однократным введением циклофосфана (250 мг/кг). Опытная группа животных получала экстракт сухой *Silene jenseensis* Willd 1 раз в сутки внутривенно в экспериментально-терапевтической дозе 100 мг/кг в течение 14 сут на фоне циклофосфановой иммуносупрессии. Интактная группа мышей получала очищенную воду по той же схеме. Действие испытуемого средства на состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ. Состояние гуморального звена иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по A.J. Cunningham. **Результаты.** Показано, что курсовое применение экстракта сухого *Silene jenseensis* Willd способно ослаблять супрессивное действие цитостатика циклофосфана на реакцию гиперчувствительности замедленного типа и антителогенез. Применение экстракта сухого *Silene jenseensis* Willd приводило к увеличению индекса реакции гиперчувствительности замедленного типа в 1,6 раза, абсолютного и относительного числа АОК в 1,5 и 1,7 раза соответственно по сравнению с уровнем супрессии. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что экстракт сухой *Silene jenseensis* Willd обладает иммунотропным действием в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при циклофосфановой иммуносупрессии, что обосновывает целесообразность его дальнейшего исследования для создания новых эффективных иммунотропных средств.

**Ключевые слова:** экстракт сухой; *Silene jenseensis* Willd; иммунотропная активность; циклофосфан; иммуносупрессия; реакция гиперчувствительности замедленного типа; антителогенез.

**Для цитирования:** Хобракова В.Б., Халзанова А.В., Оленников Д.Н., Павлова С.И., Абидуева Л.Р. Иммунотропная активность экстракта сухого *Silene jenseensis* Willd при экспериментальном иммунодефиците. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 113–117.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.113-117

**Для корреспонденции:** Хобракова Валентина Бимбаевна, e-mail: val0808@mail.ru**Финансирование.** Исследования проведены в рамках выполнения темы госзадания № АААА-А17-117011810037-0.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**Поступила** 06.08.2019**Принята к печати** 16.01.2020**Опубликована** 25.02.2020Khorakova V.B.<sup>1,2</sup>, Khalzanova A.V.<sup>2</sup>, Olennikov D.N.<sup>1</sup>, Pavlova S.I.<sup>3</sup>, Abidueva L.R.<sup>2</sup>

### Immune-modulating activity of a dry extract from *Silene jenseensis* Willd in experimental immunodeficiency

<sup>1</sup>Institute of General and Experimental Biology,  
Sakh'yanovoy Str. 6, Ulan-Ude 670047, Russia.<sup>2</sup>Buryat State University,  
Smolina Str. 24a, Ulan-Ude 670000, Russia;<sup>3</sup>N.N. Uljyanov Chuvash State University,  
Moskovskiy Prospekt 15, Cheboksary 428015, Russia

**The aim** of the study was to evaluate the immune-modulating effect of a dry extract from *Silene jenseensis* Willd on cellular and humoral immune responses in cyclophosphamide-induced immune suppression. **Methods.** The experiments were performed

on 60 F1 male mice (CBAxС57Bl/6) weighing 18-20 g. Immune deficiency was modeled by a single intraperitoneal injection of cyclophosphamide at a dose of 250 mg/kg. The experimental group of animals received the dry extract from *Silene jenseensis* Willd once a day at a dose of 100 mg/kg, intragastrically, for 14 days in the conditions of cyclophosphamide-induced immune suppression. The intact group was administered with purified water on the same protocol. The effect of dry extract on cellular immunity was evaluated by the delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction according to the standard method of local DTH. State of the humoral immunity was evaluated by the number of antibody-forming cells (AFC) using the A.J. Cunningham (1965) method of local hemolysis. **Results.** The treatment with the dry extract from *Silene jenseensis* Willd significantly reduced the suppressive effect of the cytostatic cyclophosphamide on the DTH reaction and antibody response. The tested remedy increased the DTH-index (1.6 times) and the absolute and relative numbers of AFC (1.5 and 1.7 times, respectively) compared to the control group. **Conclusion.** The dry extract from *Silene jenseensis* Willd showed a pronounced immune-modulating activity in cyclophosphamide-induced immune suppression and therefore, is promising as a new and effective immune modulator.

**Keywords:** the dry extract from *Silene jenseensis* Willd; immune modulating activity; cyclophosphamide; immune suppression; delayed-type hypersensitivity response; antibody response.

**For citation:** Khobrakova V.B., Khalzanova A.V., Olennikov D.N., Pavlova S.I., Abidueva L.R. Immune-modulating activity of a dry extract from *Silene jenseensis* Willd in experimental immunodeficiency. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 113-117. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.113-117

**For correspondence:** **Valentina B. Khobrakova**, Doctor of Biological Sciences, head of the laboratory of experimental pharmacology, Institute of General and Experimental Biology SB RAS; 6, ul. Sakh'yanovoi, Ulan-Ude, 670047, Russian Federation, e-mail:val0808@mail.ru

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

**Acknowledgments.** Research carried out in the framework of the state assignment theme № АААА-А17-117011810037-0.

**Information about authors:**

Khobrakova V.B., <http://orcid.org/0000-0002-4689-5706>

Olennikov D.N., <http://orcid.org/0000-0001-8194-1061>

Pavlova S.I., <http://orcid.org/0000-0001-9976-7866>

**Received** 06.08.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

В последнее время при воздействии неблагоприятной экологической обстановки, повышенной радиации, недостаточного и нерационального питания, массивного воздействия ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов на организм, происходит нарушение работы иммунной системы с развитием вторичных иммунодефицитных состояний, что проявляется неспособностью иммунной системы эффективно элиминировать чужеродные агенты (бактерии, вирусы и грибы) [1, 2]. Поиск новых средств и методов коррекции нарушений иммунологической реактивности – одна из актуальных задач иммунофармакологии. Одним из перспективных направлений в данной области является использование средств растительного происхождения [3–8]. Объектом данного исследования явился экстракт сухой из надземной части смолевки енисейской – *Silene jenseensis* Willd, применяемый в народной медицине Монголии и Забайкалья в качестве противовоспалительного средства [9, 10]. В сырье *S. jenseensis* обнаружены экистероиды и ациллированные тритерпеновые сапонины [11–13].

Цель исследования – определение иммуномодулирующих свойств экстракта сухого *Silene jenseensis* Willd в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при циклофосфановой иммуносупрессии.

## Методика

**Растительное сырье.** Трава *Silene jenseensis* была собрана в окрестностях с. Кырен (Тункинский район, Республика Бурятия), высушена в конвекционной печи при 50 °С до значения влажности не более 5%. Экстракт сухой из травы *S. jenseensis* был получен в результате последовательной экстракции измельченного сырья 70% и 40% этанолом и последующего концентрирования испарением спирта (выход 21% от массы воздушно-сухого сырья). Стандартизацию экстракта сухого осуществляли по содержанию 20-гидроксиэкдизона (не менее 2%) и суммы С-гликозилфлавонов (не менее 2.5%) с применением метода ВЭЖХ [11, 14].

Эксперименты выполнены на мышах линии F1 (CBA×C57Bl/6) массой 18-20 г. (питомник РАН Столбовая). Животные находились в стандартных условиях вивария в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (GLP) и приказом МЗ РФ № 199н от

01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Эксперименты проведены в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики» и «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей». Из эксперимента животных выводили дислокацией шейных позвонков под легким эфирным наркозом. Работа одобрена этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол № 2 от 05.11.2017 г.).

Действие экстракта сухого *S. jenseensis* изучено на интактных животных, и животных, находящихся в состоянии иммунодепрессии, вызванной введением цитостатика циклофосфана (ООО «ВЕРОФАРМ» Россия). Циклофосфан (в дозе 250 мг/кг) вводили животным контрольной и опытной групп внутривенно однократно [15]. Экстракт сухой *S. jenseensis* (доза 100 мг/кг) вводили мышам с иммуносупрессией перорально 1 раз в сут в течение 14 сут. Интактная группа животных получала по аналогичной схеме в соответствующем объеме очищенную воду. Действие экстракта сухого *S. jenseensis* на клеточное звено иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ [16]. Мышей сенсибилизировали внутрибрюшинным введением 0,1% взвеси эритроцитов барана (ЭБ) в физиологическом растворе. На 4-е сут под апоневроз подошвы задней лапки вводили разрешающую дозу антигена – 50 мкл 50% взвеси эритроцитов барана. В контрлатеральную лапку инъецировали физиологический раствор в том же объеме. Оценка реакции ГЗТ проводили через 24 ч по разнице масс опытной и контрольной лап. Индекс реакции ГЗТ ( $I_p$ ) рассчитывали по формуле:  $I_p = [(M_{оп} - M_k) / M_k] \times 100\%$ , где  $M_{оп}$  – масса опытной лапы,  $M_k$  – масса контрольной лапы. Состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по А.Д. Cunningham (1965) [17]. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе  $2 \cdot 10^8$  клеток/мышь.

Выраженность иммунного ответа оценивали по числу антителообразующих клеток (АОК) на селезенку и на  $10^6$  клеток с ядрами на 5-е сут после иммунизации.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента [18].

### Результаты и обсуждение

При исследовании влияния экстракта сухого *S. jenseensis* на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что исследуемое средство восстанавливает индекс данной реакции в условиях циклофосфановой иммуносупрессии. Введение циклофосфана приводило к снижению индекса реакции ГЗТ на 27% по сравнению с тем же показателем в интактной группе (табл. 1). После введения животным с иммунодепрессией (опыт) экстракта сухого *S. jenseensis* (100 мг/кг) отмечалось увеличение индекса реакции ГЗТ в 1,6 раза по сравнению с данными контроля.

При изучении влияния экстракта сухого *S. jenseensis* на процессы антителообразования установлено, что экстракт повышает уровень гуморального иммунного ответа в условиях циклофосфановой иммуносупрессии. Введение циклофосфана приводило к снижению

Таблица 1

**Влияние экстракта сухого *S. jenseensis* на выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа при циклофосфановой иммуносупрессии**

Группы животных	$I_p$ , %
Интактная ( $n = 10$ )	$43,91 \pm 2,31$
Контроль (ЦФ+H <sub>2</sub> O), $n = 10$	$32,09 \pm 1,74^*$
Опыт (ЦФ+ <i>S. jenseensis</i> ), $n = 10$	$50,00 \pm 4,06^{**}$

**Примечание.** Здесь и в табл. 2 различия статистически значимы по сравнению с данными: \* – интактной группы, \*\* – контрольной группы при  $p \leq 0,05$ ;  $n$  – количество животных в группе, ЦФ – циклофосфан.

Таблица 2

**Изменение количества антителообразующих клеток селезенки мышей под влиянием *S. jenseensis* на фоне циклофосфановой иммуносупрессии**

Группа животных	Количество АОК на селезенку	Количество АОК на $10^6$ спленоцитов
Интактная ( $n = 10$ )	$69\ 548 \pm 5797$	$361,04 \pm 12,09$
Контроль (ЦФ+H <sub>2</sub> O), $n = 10$	$47\ 500 \pm 2577^*$	$278,37 \pm 9,03^*$
Опыт (ЦФ+ <i>S. jenseensis</i> ), $n = 10$	$69\ 740 \pm 1444^{**}$	$389,27 \pm 53,3^{**}$

**Примечание.** АОК – антителообразующие клетки. Остальные обозначения см. табл. 1.

как абсолютного числа АОК, так и числа АОК на  $10^6$  спленцитов на 32% и 23% соответственно, по сравнению с соответствующими показателями в интактной группе (табл. 2).

При введении экстракта сухого *S. jeniseensis* на фоне иммуносупрессии наблюдали достоверное увеличение количества АОК как в абсолютных значениях, так и при расчете на  $10^6$  спленцитов; при этом первый показатель превышал уровень циклофосфановой супрессии в 1,5 раза, а второй – в 1,7 раза.

На основании проведенных исследований по выявлению иммуностропной активности *S. jeniseensis* установлено, что средство обладает способностью восстанавливать показатели клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа в условиях циклофосфановой иммуносупрессии.

Результаты проведенного нами исследования согласуются с данными литературы, демонстрирующими иммуномодулирующее действие растений рода *Silene*. В работе R. Eldomany и соавт. [19] установлено, что при введении мышам с индуцированным иммунодефицитом метанольного экстракта *Silene nocturna* наблюдалось увеличение количества лейкоцитов, клеточности костного мозга и массы селезенки. Выраженную стимуляцию гуморального иммунного ответа проявляет также обогащенная фракция экидистероидов из бутанольного экстракта *Silene viridiflora* L. [20]. Индивидуальные и суммарные экидистероидсодержащие препараты из *Silene viridiflora* также усиливают процесс первичного антителообразования и активируют фагоцитоз [21, 22].

Таким образом, можно заключить, что экстракт сухой *Silene jeniseensis* Willd обладает иммуностропным действием в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при экспериментальной циклофосфановой иммуносупрессии, что свидетельствует о целесообразности его дальнейшего изучения с целью создания новых эффективных иммуномодуляторов.

**Финансирование.** Исследования проведены в рамках выполнения темы госзадания № АААА-А17-117011810037-0.

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

#### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Хобракова В.Б.  
Сбор и обработка материала – Халзанова А.В.,  
Абидуева Л.Р.

Статистическая обработка – Оленников Д.Н.

Написание текста – Хобракова В.Б.

Редактирование текста – Павлова С.И.

#### Литература

1. Любошенко Т.М., Варнавских Е.А. Анализ заболеваемости населения РФ и Сибирского федерального округа отдельными нозологическими формами, связанными с вторичными иммунодефицитами. *Омский научный вестник*. 2014; 1(128): 38-41.
2. Доценко Э.А., Рождественский Д.А., Юпатов Г.И. Иммунодефициты и некоторые иммуномодулирующие средства. *Аллергология и иммунология. Вестник ВГМУ*. 2014; 13(3): 103-20.
3. Борсук О.С., Масная Н.В., Шерстобоев Е.Ю. Новые перспективные иммунокорректоры растительного происхождения. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2009; 11: 9–12.
4. Корепанов С.В., Опенко Т.Г. Применение лекарственных растений с иммуномодулирующими свойствами в онкологии. *Российский биотерапевтический журнал*. 2012; 11(4): 15-20.
5. Хобракова В.Б. Перспективы использования средств растительного происхождения для коррекции иммунодефицитов. «*Бюллетень ВШЦ СО РАМН*». 2010; 3 (73): 278-80.
6. Wala N.A. Immunomodulatory and Natural Immunomodulators. *J Allergy and Inflammation*. 2017; 1(2): 1-4.
7. Mahima, Ingle A.M., Verma A.K., Tiwari R., Karthik. Immunomodulators in day to day life: A review. *Pakistan J Biol Sciences*. 2013; 16: 826-43.
8. Muruganathan G., Shamanna M., Pabithi S.C., Debanjan D. Immunomodulatory constituents from plant origins: A review of isolated biomolecules. *Intern J of Pharm Sci And Research*. 2013; 4(7): 2459-69.
9. Лавренов К.В., Лавренова Г.К. *Энциклопедия лекарственных растений*. «Донеччина»; 1997.
10. Варлаков М.Н. Лекарственные растения Восточного Забайкалья. *Химико-фармацевтическая промышленность*. 1932; 2(3): 84-91.
11. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. Phytoecdysteroids from *Silene jeniseensis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2017; 53(6): 1199-201.
12. Lacaille-Dubois M.A., Hanquet B., Cui Z.-H., Lou Z.C., Wagner H. Jeniseenoides C and D, biologically active acylated triterpene saponins from *Silene jeniseensis*. *Phytochemistry*. 1997; 45(5): 985-90.
13. Mamadaliyeva N.Z. Phytoecdysteroids from *Silene* plants: distribution, diversity and biological (antitumor, antibacterial and antioxidant) activities. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2012; 11: 474-97.
14. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. Phytoecdysteroids and flavonoids from *Gastrolychnis tristis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2018; 54(1): 204–206.
15. Масная Н.В., Борсук О.С., Шерстобоев Е.Ю., Исайкина Н.В., Калинин Г.И. Коррекция растительными полифенольными соединениями цитостатического иммунодефицита. *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2011; 2(2): 44-5.
16. Миронов А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, часть 1*. М.; Гриф и К, 2012.
17. Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody forming cells. *Nature*. 1965; 207(5001): 1106-7.
18. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. *Математическая статистика в клинических исследованиях*. М.; ГЭОТАР-Медиа; 2006.
19. Eldomany R., Abdelaziz A., Soliman H. Evaluation of immunomodulatory effect of three herbal plants growing in Egypt. «*Immunopharmacology and Immunotoxicology*». 2011; 33(1): 141-5.
20. Бобаев И.Д., Алимова М.Т., Путиева Ж.М., Косназаров С.Т., Рамазанов Н.Ш. Экспериментальное изучение иммуностиму-

- лирующего действия фитостероидов *Silene viridiflora* L. *Теоретическая и прикладная экология*. 2012; 1: 55-7.
21. Shakhmurova G.A. Efficiency of phytoecdysteroids on immunogenesis. *European science*. 2018; 4 (36): 75-7.
  22. Шахмурова Г.А., Батырбеков А.А., Эгамова Ф.Р., Хушбактова З.А., Сыров В.Н. Экспериментальная оценка иммуностропного действия суммарных экдистероидсодержащих препаратов из *Silene brahuica* и *Ajuga turkestanica*. *Иммунология*. 2013; 1: 24-6.
- ### References
1. Lyuboshenko T.M., Varnavskikh E.A. Analysis of the morbidity of the population of the Russian Federation and the Siberian Federal District have nosological forms associated with secondary immunodeficiencies. *Omskiy nauchnyy vestnik*. 2014; 1 (128): 38-41. (in Russian).
  2. Dotsenko E.A., Rozhdestvensky D.A., Yupatov G.I. Immunodeficiency and some immunomodulatory drugs. *Allergologiya i immunologiya. Vestnik VGMU*. 2014, 13(3): 103-120. (in Russian)
  3. Borsuk O.S., Masnaya N.V., Sherstoboev E.Yu. New promising immunocorrectors of plant origin. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2009; 11: 9-12. (in Russian).
  4. Korepanov S.V., Openko T.G. Application of medicinal plants with immunomodulatory properties in Oncology. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2012; 11(4): 15-20. (in Russian)
  5. Khobrakova V.B. Prospects for the use of plant origin for the correction of immunodeficiencies. *Byulleten' VSNTS SO RAMN*. 2010 3; 73: 278-80. (in Russian)
  6. Walaa N.A. Immunomodulatory and Natural Immunomodulators. *Journal of Allergy and Inflammation*. 2017; 1; 2: 1-4.
  7. Mahima, Ingle AM, Verma AK, Tiwari R, Karthik. Immunomodulators in day to day life: A review. *Pakistan J Biol Sciences*. 2013; 16: 826-43.
  8. Muruganathan G., Shamanna M., Pabbithi S.C., Debanjan D. Immunomodulatory constituents from plant origins: A review of isolated biomolecules. *Intern J of Pharm Sciences And Research*. 2013; 4(7): 2459-69.
  9. Lavrenov K.V., Lavrenova G.K. *Encyclopedia of medicinal plants. [Entsiklopediya lekarstvennykh rasteniy]. Donechchina; 1997.* (in Russian)
  10. Varlakov M.N. Medicinal plants of East Transbaikalia. *Khimiko-farmatsevticheskaya promyshlennost*. 1932; 2 (3): 84-91. (in Russian)
  11. Olennikov D.N., Kashchneko N.I. Phytoecdysteroids from *Silene jeniseensis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2017; 53(6): 1199-201.
  12. Lacaille-Dubois M.A., Hanquet B., Cui Z.-H., Lou Z.-C., Wagner H. Jeniseensoides C and D, biologically active acylated triterpene saponins from *Silene jeniseensis*. *Phytochemistry*. 1997; 45(5): 985-90.
  13. Mamadaliyeva N.Z. Phytoecdysteroids from *Silene* plants: distribution, diversity and biological (antitumour, antibacterial and antioxidant) activities. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2012; 11: 474-97.
  14. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. Phytoecdysteroids and flavonoids from *Gastrolychnis tristis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2018; 54(1): 204-6.
  15. Masnaya N.V., Borsuk O.S., Sherstoboev E.U., Isaykina N.V., Kalinkina G.I. Correction of cytotoxic immune deficiency by plant polyphenolic compounds. *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2011; 2(2): 44-5. (in Russian)
  16. Mironov A. N. *Guidelines for preclinical studies of drugs, part 1. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv, chast' 1]*. Moscow; Grif i K; 2012. (in Russian)
  17. Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody forming cells. *Nature*. 1965; 207(5001): 1106-7.
  18. Sergienko V.I., Bondareva I.B. *Mathematical statistics in clinical studies. [Matematicheskaya statistika v klinicheskikh issledovaniyakh]*. M.: GEOTAR-Media; 2006. (in Russian)
  19. Eldomany R., Abdelaziz A., Soliman H. Evaluation of immunomodulatory effect of three herbal plants growing in Egypt. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2011; 33(1): 141-5.
  20. Bobaev I.D., Alimova M.T., Putieva Z.M., Kosnazarov S.T., Ramazanov N.Sh. Experimental study of the immunostimulating action of phytoecdysteroids from *Silene viridiflora* L. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2012; 1: 55-7. (in Russian)
  21. Shakhmurova G.A. Efficiency of phytoecdysteroids on immunogenesis. *European science*. 2018; 4(36): 75-7.
  22. Shakhmurova G.A., Bатырбеков А.А., Эгамова Ф.Р., Хушвактова З.А., Сыров В.Н. Experimental evaluation of immunotropic action of total antiseritonic drugs from *Silene brahuica* and *Ajuga turkestanica*. *Immunologiya*. 2013; 1: 24-6. (in Russian)

**Сведения об авторах:**

**Хобракова Валентина Гимбаевна**, доктор биол. наук, доцент, зав. лаб., e-mail: val0808@mail.ru;

**Халзанова Антонида Валерьевна**, аспирант;

**Оленников Даниил Николаевич**, доктор фарм. наук, вед. науч. сотр.;

**Павлова Светлана Ивановна**, доктор биол. наук, доцент, зав. каф.;

**Абидуева Лызжима Ранжуровна**, канд. биол. наук, ст. преподаватель.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.381-008.9

Арсютлов О.В., Арсютлов В.П., Черкесов Л.И., Вазанов А.А., Иванов Л.Н., Волков А.Н.

## Пуриновый обмен у пациентов с острой хирургической патологией органов брюшной полости

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»,  
428015, г. Чебоксары, Россия, Московский проспект, д. 15

**Цель** работы – изучение динамики активности основного фермента пуринового катаболизма ксантинооксидазы у пациентов с острой хирургической патологией органов брюшной полости в послеоперационном периоде. **Методика.** В клиническую группу вошли 238 больных (166 мужчин и 72 женщины) в возрасте 18-62 лет с различной острой хирургической патологией органов брюшной полости. Оценивали состояние мочекишечного обмена и ПОЛ. Определяли активность ксантинооксидазы модифицированным методом J.H. Marimont, M. London. В параллельных пробах крови определяли концентрацию молекул средней массы (СМ254 и СМ280), уровень мочевины, креатинина, гемоглобина, билирубина, калия, глюкозы и общего белка, активность ферментов АлАТ и АсАТ, а также проводили подсчет количества лейкоцитов, эритроцитов, рассчитывали лейкоцитарный индекс интоксикации. Уровень малонового диальдегида определяли согласно рекомендациям A.L. Tappel, H. Lalkin, СМ254 и СМ280 – по Holloway С. и соавт. Нормой служила случайная выборка показателей, полученных при обследовании жителей Чувашской Республики. **Результаты.** Активность ксантинооксидазы больных при поступлении статистически значимо превышало норму. Начиная с 1-х сут после операции активность фермента возрастала, достигая максимума на 3-и сут, затем снижалась, приближаясь к 7-м сут к исходным значениям. Установлена прямая корреляция активности ксантинооксидазы с уровнем малонового диальдегида, что подтверждает сопряженность усиления пуринового катаболизма при острой хирургической патологии с активацией ПОЛ. Полученные результаты согласуются с данными авторов о вовлеченности ксантинооксидазы в продукцию свободных радикалов. Интенсификация процессов ПОЛ тесно связана с уровнем интоксикации в организме. Это доказывают выявленные нами прямые сильные корреляционные связи активности ксантинооксидазы с уровнем СМ254 и СМ280, количеством лейкоцитов и величиной лейкоцитарного индекса интоксикации. При неблагоприятном течении послеоперационного периода обнаружено 2 типа изменений активности фермента: у одних больных активность ксантинооксидазы статистически значимо повышалась, превышая исходный уровень, у других статистически значимо снижалась. **Заключение.** Изменение активности ксантинооксидазы при нарастании клинических признаков интоксикации, повышении лейкоцитарного индекса и уровня лейкоцитов может служить дополнительным прогностическим признаком развития послеоперационных осложнений.

**Ключевые слова:** пуриновый обмен; ксантинооксидаза; перекисное окисление липидов; острая хирургическая патология.

**Для цитирования:** Арсютлов О.В., Арсютлов В.П., Черкесов Л.И., Вазанов А.А., Иванов Л.Н., Волков А.Н. Пуриновый обмен у пациентов с острой хирургической патологией органов брюшной полости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 118-123.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.118-123

**Для корреспонденции:** Арсютлов Владимир Петрович, e-mail: ArsVladP@yandex.ru

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

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

**Поступила** 28.11.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Arsyutov O.V., Arsyutov V.P., Cherkesov L.I., Vazanov A.A., Ivanov L.N., Volkov A.N.

### Purine metabolism in patients with acute surgical pathology of abdominal organs

I.N. Uliyanov Chuvash State University,  
Moskovskiy Prospect 15, Cheboksary 428015, Russia

**Introduction.** Purine metabolism was studied in 238 patients aged 18 to 62 with various acute surgical pathologies of abdominal organs. **The aim** of the work was to study the dynamics of xanthine oxidase (XO), the major enzyme of purine catabolism, in patients with acute surgical pathology of abdominal organs in the postoperative period. **Methods.** The clinical group included 238 patients with various acute surgical pathologies of abdominal organs. Mean age of patients was  $37.5 \pm 1.0$ , from 18 to 62. The group consisted of 166 males (69.7%) and 72 females (30.3%). In parallel blood samples, we measured indexes of lipid peroxi-

dation (LP), uric acid metabolism, concentrations of middle molecules, bilirubin, alanine transaminase and aspartate transaminase, urea, creatinine, potassium, glucose, and crude protein; counted leukocytes and erythrocytes; and determined the hemoglobin value and leukocyte intoxication index (LII). XO activity was determined according to a method of J.H. Marimont and M. London modified at the Medical School of I. N. Uliyanov Chuvash State University. Concentration of malonic dialdehyde (MDA) was measured according to the recommendations of A.L. Tappel and H. Lalkin, and concentrations of middle molecules (MM254 and MM280) were measured according to C. Holloway et al. Normal values for serum concentrations of XO, MDA, MM254, and MM280 were determined using a random sample of Chuvash Republic residents. **Results.** Upon admission of patients, their XO activity significantly exceeded normal values. Starting from postoperative day 1, the enzyme activity increased, reached its maximum at day 3, then decreased, and approached the baseline values by day 7. A direct correlation of XO and MDA, the end product of lipid peroxidation (LP), was established, which confirmed that the increase in purine catabolism associated with acute surgical pathology is coupled with LP activation. The correlation between the increase in purine catabolism and LP activation in acute surgical pathology is consistent with multiple reports of XO involvement in free radical production. **Conclusions.** Intensity of LP processes is closely related to the degree of intoxication as evidences by direct, strong correlations of XO with concentrations of middle molecule 254, middle molecule 280, leukocyte count, and LII. In case of unfavorable postoperative course, two types of changes in the XO activity were identified. In some patients, the postoperative XO activity remained high significantly exceeding the normal values, whereas others had significantly decreased XO activity as compared to normal values. An increase or a sharp decrease in the XO activity with progressive clinical signs of intoxication along with increases in leukocyte count and LII can serve as an additional diagnostic sign of developing postoperative complications.

**Keywords:** purine metabolism; xanthine oxidase; lipid peroxidation; acute surgical pathology.

**For citation:** Arsyutov O.V., Arsyutov V.P., Cherkesov L.I., Vazanov A.A., Ivanov L.N., Volkov A.N. Purine metabolism in patients with acute surgical pathology of abdominal organs. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 118-123. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.118-123

**For correspondence:** **Vladimir P. Arsyutov**, Doctor of Medical Sciences, professor of surgical diseases Department, FSBEI HE «I.N. Uliyanov Chuvash State University», Moskovsky prospect 15, 428015, Cheboksary, Russia, e-mail: ArsVladP@yandex.ru

**Information about authors:**

Arsyutov O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3302-5354>

Arsyutov V. P., <https://orcid.org/0000-0001-9683-9502>

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

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

**Received** 28.11.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

Несмотря на значительные достижения абдоминальной хирургии, многие проблемы послеоперационных осложнений, нередко с высокой летальностью, остаются нерешенными. Частота осложнений по данным литературы достигает 12% [1–3]. Анализ медицинской литературы последних лет свидетельствует о значимой роли пуринового обмена в патогенезе многих заболеваний [1, 4–9]. В образовании мочевой кислоты, конечного продукта обмена пуринов, активное участие принимает сложный фермент ксантиноксидаза (КО) – флавопротеид, катализирующий одновременно окисление гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту. При взаимодействии окислительно-восстановительной цепи фермента (O-форма) с кислородом в ходе реакции параллельно с окислением пуринового субстрата происходит генерация супероксиданион-радикала в смеси с перекисью водорода. В результате потенцирования процессов перекисно-

го окисления липидов (ПОЛ) модифицируются мембранные липиды и липопротеиды, что приводит в отдельных случаях к разрушению клетки. В этом проявляется патогенное действие ксантиноксидазы. В свою очередь высокая интенсивность ПОЛ является фактором активации КО. Таким образом, создается «порочный круг» лавинообразного усиления ПОЛ [1, 5, 9].

**Цель исследования** – изучение в динамике активности ксантиноксидазы (основного фермента пуринового катаболизма) у пациентов с острой хирургической патологией органов брюшной полости в послеоперационном периоде.

### Методика

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

циентов. Работа одобрена «ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова».

В клиническую группу вошло 238 больных (166 мужчин и 72 женщины) с различной острой хирургической патологией органов брюшной полости. Возраст больных варьировал от 18 до 62 лет. Больных с острым аппендицитом было 99 (41,6%), перфоративной язвой желудка и двенадцатиперстной кишки – 76 (31,9%), острой спаечной кишечной непроходимостью – 49 (20,6%), острым холециститом – 14 (5,9%). С осложненным послеоперационным течением было 20 больных (8,7%). Из них у 7 пациентов выявлена ранняя спаечная кишечная непроходимость на 5-е и 7-е сут после операции, и у 13 пациентов – инфильтраты и абсцессы в области послеоперационного рубца.

Кровь для исследования брали из локтевой вены в момент поступления больного и утром натощак через 1, 3, 5 и 7 сут после операции. Активность ксантиноксидазы определяли по J.H. Marimont, M. London [8] в модификации, разработанной на курсе эндокринологии медицинского факультета Чувашского госуниверситета им. И.Н. Ульянова [6]. В параллельных пробах проводили исследование показателей ПОЛ, мочекишлого обмена, определяли уровень молекул средней массы, билирубина, мочевины, креатинина, калия, глюкозы и общего белка и активность АлАТ и АсАТ, а также подсчитывали количество лейкоцитов, эритроцитов, определяли уровень гемоглобина, рассчитывали лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ).

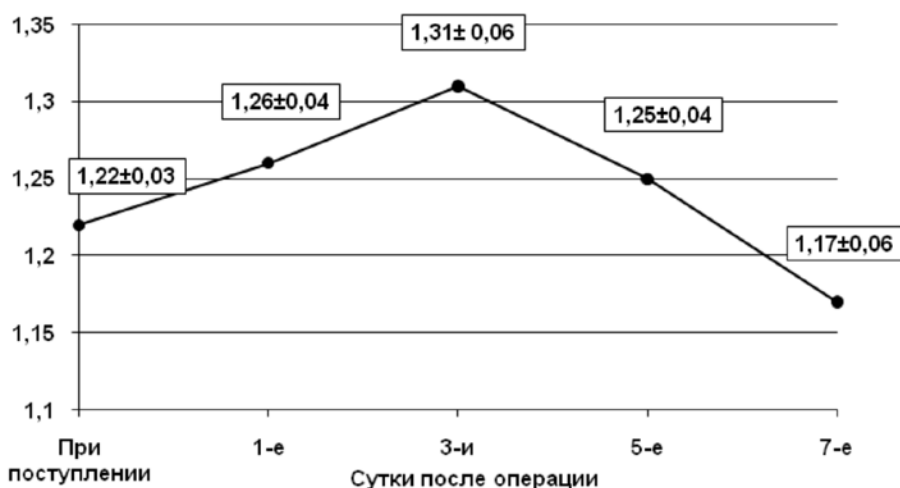
Определение уровня малонового диальдегида (МДА) выполняли согласно рекомендациям A.L. Tappel,

H. Lalkin [10]. Определение уровня молекул средней массы (СМ254 и СМ280) проводили по С. Holloway и соавт. [7]. Концентрация в крови СМ280 характеризует детоксикационную функцию печени, а концентрация СМ254 – функциональное состояние почек. Нормы содержания (контроль) в сыворотке крови МДА, СМ254, СМ280 и активности ксантиноксидазы определены при обследовании случайной выборки жителей Чувашской Республики [6]. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета программ Microsoft Office (Excel). При нормальном распределении признака статистической значимости различий оценивали по параметрическому t-критерию Стьюдента. Значимыми считали различия между выборками при  $p < 0,05$ .

Для определения направленности и силы взаимосвязи между изучаемыми признаками вычисляли коэффициенты линейной корреляции Пирсона с построением корреляционных матриц. При отсутствии статистически значимых различий коэффициентов корреляции Пирсона, использовали критерии непараметрической корреляции Спирмана (rs) и Кендаля (rk). Статистически значимыми считали различия коэффициентов при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Активность ксантиноксидазы у больных в момент поступления была статистически значимо выше нормы, что отображает усиление катаболизма пуринов при острой хирургической патологии. Особенности изменения активности ксантиноксидазы у пациентов в послеоперационном периоде представлены на **рис. 1**.



**Рис. 1.** Активность ксантиноксидазы у пациентов в послеоперационном периоде в динамике. По оси ординат активность ксантиноксидазы в условных единицах (УЕ).



Полученные результаты свидетельствуют о том, что при острой хирургической патологии происходит усиление пуринового катаболизма, который нарастает в первые 3 сут послеоперационного периода. Это согласуется с данными Шапошникова А.В. [цит. по 1], о преобладании в этот период после операции общих катаболических процессов. Снижение активности ксантиноксидазы с 5-х сут послеоперационного периода соответствует периоду установления равновесия между катаболизмом и анаболизмом.

Анализ взаимосвязи активности ксантиноксидазы (показатель пуринового обмена) с другими определяемыми параметрами представлен на рис. 2, 3.

Выявленная прямая корреляционная связь активности ксантиноксидазы с уровнем МДА (конечным продуктом ПОЛ) подтверждает сопряженность усиления пуринового катаболизма при острой хирургической патологии с активацией ПОЛ, что согласуется с мнением ряда авторов о вовлеченности КО в продукцию свободных радикалов [1, 4, 9]. Влияние активности КО на детоксикационную функцию печени и функцию почек по элиминации продуктов обмена подтверждается статистически значимой положительной корреляционной связью активности КО с уровнем СМ254 и СМ280. Прямые сильные корреляционные связи активности КО с содержанием МДА, СМ254, СМ280, уровнем лейкоци-

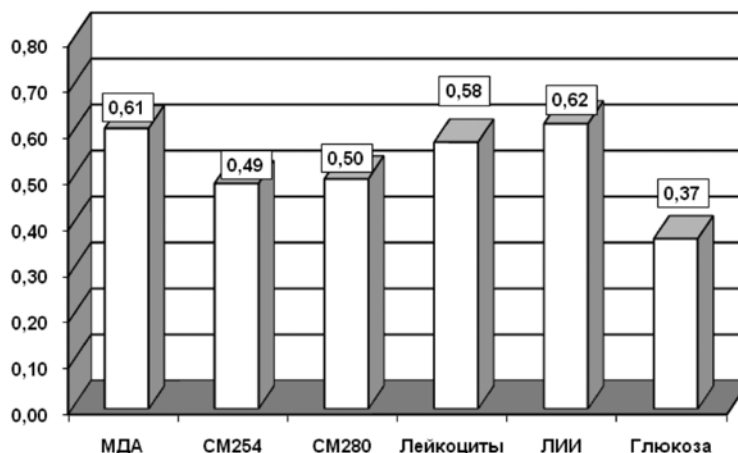


Рис. 2. Статистически значимые положительные коэффициенты корреляции активности ксантиноксидазы с рядом показателей. По оси ординат – коэффициент корреляции, по оси абсцисс – соответствующие показатели.

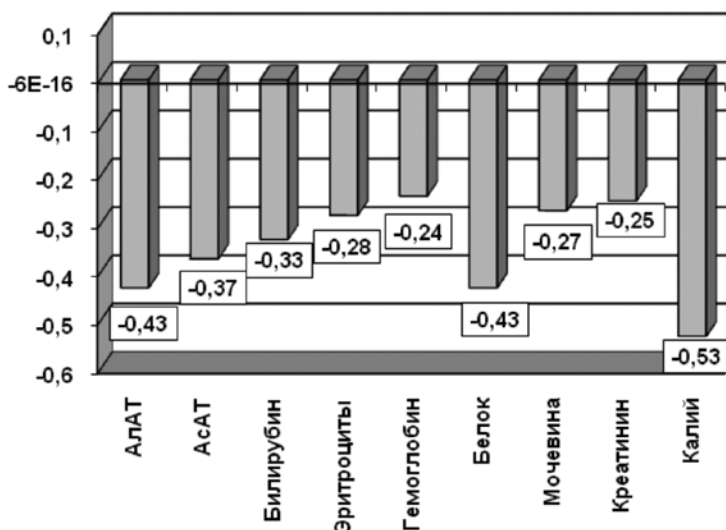


Рис. 3. Статистически значимые отрицательные коэффициенты корреляции активности ксантиноксидазы с рядом показателей. По оси ординат – коэффициент корреляции, по оси абсцисс – соответствующие показатели.

тов, лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ) свидетельствуют о тесной связи процессов ПОЛ с уровнем интоксикации организма.

Отрицательная корреляция активности КО с показателями красной крови — количеством эритроцитов и уровнем гемоглобина указывает на гипоксию, что создает условия для трансформации фермента.

У тяжелых больных с нарастанием гипоксии и снижением активности КО выявляется обратная статистически значимая корреляция с уровнем АлАТ, АсАт и билирубина. Это позволяет сделать вывод, что гипоксия способствует развитию дистрофических изменений гепатоцитов (повышение АлАТ, АсАТ и билирубина) (Г.А. Рябов и соавт., С.Д. Подымовой и соавт.) [цит. по 1]. Нарушение белоксинтезирующей функции печени у данной категории больных подтверждает отрицательная значимая корреляция активности КО с уровнем общего белка при нормо- и гипопроteinемии. У этих больных выявлена значимая отрицательная корреляция активности фермента с уровнем мочевины, креатина и калия сыворотки, что, по-видимому, является результатом нарушения функции почек на фоне усиления катаболических процессов.

Повышенная активность КО положительно коррелирует с уровнем глюкозы (рис. 2), причем при гипергликемии коэффициент корреляции возрастает. Объяснением этому могут служить данные И.В. Мадянова [5] и N. Shehaden с соавт. [цит. по 1], что система КО-ксантин оказывает угнетающее действие на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы. Кроме того известно, что эндотоксикоз ухудшает утилизацию глюкозы (К.М. Дорохина и соавт.) [цит. по 1].

В случае неблагоприятного послеоперационного течения было выявлено 2 типа изменений активности КО. У одних больных активность КО в послеоперационном периоде оставалась высокой, значимо превышая норму, у других, напротив, наблюдалось статистически значимое снижение активности КО. Причем, снижение активности КО наблюдалось у больных с более тяжелым течением и выраженной интоксикацией, на что указывали значимо более высокие уровни МДА, молекул средней массы, количества лейкоцитов и лейкоцитарного индекса интоксикации по сравнению с показателями у больных с более легким течением заболевания.

Таким образом, для острой хирургической патологии органов брюшной полости характерен повышенный пуриновый катаболизм. Активность ксантиноксидазы положительно коррелирует с уровнем интоксикации и сопряжена с активацией перекисного окисления липидов. При неблагоприятном послеоперационном

течении активность КО изменяется с определенной закономерностью. Динамическое повышение, либо резкое снижение активности КО при нарастании клинических признаков интоксикации, повышении уровня лейкоцитов и ЛИИ может служить дополнительным диагностическим признаком развития осложнений.

#### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Арсютов О.В., Арсютов В.П., Иванов Л.Н.

Сбор и обработка материала — Арсютов О.В., Вазанов А.А., Черкесов Л.И.

Статистическая обработка — Арсютов О.В., Вазанов А.А.

Написание текста — Арсютов В.П., Вазанов А.А.

Редактирование — Волков А.Н.

#### Литература

1. Арсютов В.П., Арсютов О.В. *Лазерная и магнитно-лазерная терапия в профилактике релапаротомий*. Чебоксары: изд-во Чувашского университета; 2009.
2. Арсютов В.П., Арсютов О.В. *Спаечная кишечная непроходимость. Этиология. Профилактика: Учебное пособие*. Чебоксары; изд. Чувашского университета; 2017.
3. Арсютов В.П., Арсютов О.В., Волков А.Н. и др. Проблемы острой спаечной кишечной непроходимости. *Здравоохранение Чувашии*. 2018; 2: 5-7.
4. Бакулина Л.С., Плужников Н.Н., Исаев А.В. Алгоритм исследования прооксидантной системы организма с целью выбора патогенетической фармакотерапии. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2018; 18(5): 766-75. doi: 10.17308/sorgchrom.2018.18/605
5. Мадянов И.В. Гиперурикемия и сахарный диабет. *Российский медицинский журнал. Медицинское обозрение*. 2019; 1(1): 20-4.
6. Мадянов И.В., Зайцев А.И., Григорьев А.А., Марков Д.С. *Лабораторный анализ важнейших показателей пуринового обмена: Методические рекомендации*. Чебоксары, 1998.
7. Holloway C., Brunner U., Schmidt E. Hemoperfusion: Kidney and liver support and detoxication. *J of Molecular & Cellular Cardiol.* 1987; 19(3): 32.
8. Marimont J.H., London M. Direct determination of uric acid byultraviolet absorption. *Clin. Chem.* 1964; 10(10): 934-41.
9. Savoliuk S.I., Tomashevsky Ya.V., Melnik T.O. Treatment and prevention of hepatic failure in acuthebiliary pancreatitis in patients with diabetes mellitus. *Mezhdunarodnyy Endokrinologicheskij Zhurnal*. 2017; 13(7): 478-85. doi: 10.22141/2224-0721.13.7.2017.115746
10. Tappel A. L., Zalkin H. Lipid peroxidation in isolated mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 80: 326-32.

#### References

1. Arsyutov V.P., Arsyutov O.V. *Laser and Magnetic Laser Therapy in Relaparotomy Prevention [Lazernaya i magnitno-lazernaya terapiya v profilaktike relaparotomiy]*. Cheboksary; izdatelstvo Chuvashskogo universiteta; 2009. (in Russian)

2. Arsyutov V.P., Arsyutov O.V. *Adhesive Intestinal Obstruction. Etiology. Prevention: A Tutorial [Spaechnaya kishhechnaya neprohodimost'. Etiologiya. Profilaktika: Uchebnoe posobie]*. Cheboksary; izdatelstvo Chuvashskogo universiteta; 2017. (in Russian)
3. Arsyutov V.P., Arsyutov O.V., Volkov A.N. et al. Problems of Acute Adhesive Intestinal Obstruction. *Zdravookhranenie Chuvashii*. 2018; 2: 5-7. (in Russian)
4. Bakulina L.S., Pluzhnikov N.N., Isaev A.V. Algorithm of Studying the Body's Prooxidant System to Choose Pathogenetic Pharmacotherapy. Sorbtion and Chromatographic Processes. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie processy*. 2018; 18(5): 766-75. doi: 10.17308/sorpchrom.2018.18/605 (in Russian)
5. Madyanov I.V. Hyperuricemia and Diabetes. *Rossiyskiy Meditsinskiy Zhurnal. Meditsinskoe obozrenie*. 2019; 1(1): 20-4. (in Russian)
6. Madyanov I.V., Zajcev A.I., Grigor'ev A.A., Markov D.S. *Laboratory Analysis of the Most Important Purine Metabolism Indicators: Methodical Recommendations [Laboratornyy analiz vazhneyshikh pokazateley purinovogo obmena: Metodicheskie rekomendatsii]*. Cheboksary, 1998. (in Russian)
7. Holloway C., Brunner U., Schmidt E. Hemoperfusion: Kidney and liver support and detoxication. *J Mol. Cellular Cardiol*. 1987; 19(3): 32.
8. Marimont J.H., London M. Direct determination of uric acid by ultraviolet absorption. *Clin. Chem*. 1964; 10(10): 934-41.
9. Savoliuk S.I., Tomashevsky Ya.V., Melnik T.O. Treatment and prevention of hepatic failure in acute biliary pancreatitis in patients with diabetes mellitus. *Mezhdunarodnyy Endokrinologicheskiy Zhurnal*. 2017; 13(7): 478-85. doi: 10.22141/2224-0721.13.7.2017.115746 (in Russian)
10. Tappel A. L., Zalkin H. Lipid peroxidation in isolated mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys*. 1959; 80: 326-32.

**Сведения об авторах:**

**Арсютов Олег Владимирович**, канд. мед. наук, доцент каф. хирургических болезней;

**Арсютов Владимир Петрович**, доктор мед. наук, проф. каф. хирургических болезней, e-mail: ArsVladP@yandex.ru;

**Черкесов Леонид Ильич**, канд. мед. наук, проф. каф. хирургических болезней;

**Вазанов Андрей Антикович**, канд. мед. наук, доцент каф. общей хирургии и онкологии;

**Иванов Леонид Николаевич**, доктор мед. наук, проф. каф. нормальной и патологической физиологии;

**Волков Анатолий Никандрович**, доктор мед. наук, проф. каф. хирургических болезней.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 611.611:612.127.2:616.379-008.64-092.4

Филинова С.О., Жариков А.Ю., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Баландович Б.А.

## Показатели прооксидантного и антиоксидантного статусов в почках крыс при экспериментальном сахарном диабете

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

**Цель исследования** – изучение активности процесса свободнорадикального окисления в почках крыс в условиях экспериментального сахарного диабета. **Методика.** Исследование выполнено на 25 самцах крыс Вистар. Животные были разделены на 2 группы: группа интактных крыс (контроль) и группа животных с сахарным диабетом (опыт) по 12 и 13 особей соответственно. Моделирование сахарного диабета осуществляли внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (65 мг/кг). Для селективного моделирования сахарного диабета II типа крысам группы «опыт» предварительно вводили внутрибрюшинно 1 мл раствора цитофлавина (из расчета дозы никотинамида 115 мг/кг). Группе интактных крыс аналогичным способом вводили 1 мл физиологического раствора. На 28-е сут эксперимента животных декапитировали под эфирным наркозом с целью изучения активности процесса свободнорадикального окисления в почках. В тканях почек определяли концентрацию тиобарбитуратреактивных продуктов окисления жирных кислот, оценивали общую прооксидантную активность по интенсивности окраски флуоресцентного комплекса, образующегося при взаимодействии продуктов перекисного окисления ТВИН-80 с тиобарбитуровой кислотой. Определяли активность антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. Активность каталазы определяли по подавлению ферментом окисления молибдата натрия перекисью водорода. Активность супероксиддисмутазы оценивали по содержанию в пробе нитроформазана – окрашенного продукта восстановления нитротетразолия синего супероксидными радикалами. Определяли содержание неокисленного глутатиона (маркера активности глутатионпероксидазы) по цветной реакции с реактивом Элмана. **Результаты.** В ходе исследования было установлено увеличение концентрации тиобарбитуратреактивных продуктов окисления жирных кислот, основным представителем которых является малоновый диальдегид, увеличение общей прооксидантной активности, а также активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы. **Заключение.** В условиях экспериментального сахарного диабета наблюдаются признаки выраженного оксидативного стресса в почечной ткани, о чем свидетельствует увеличение концентрации тиобарбитуратреактивных продуктов окисления жирных кислот и общей прооксидантной активности, а также повышение активности антиоксидантных ферментов.

**Ключевые слова:** сахарный диабет; оксидативный стресс; нефропатия.

**Для цитирования:** Филинова С.О., Жариков А.Ю., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Баландович Б.А. Показатели прооксидантного и антиоксидантного статусов в почках крыс при экспериментальном сахарном диабете. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 124-127.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.

**Для корреспонденции:** Филинова Светлана Олеговна, e-mail: svetulya1511@mail.ru

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

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

**Поступила** 17.09.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Filinova S.O., Zharikov A.Yu., Mazko O.N., Makarova O.G., Balandovich B.A.

### Indexes of pro- and antioxidant status in kidneys of rats with experimental diabetes mellitus

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

**The aim of the study** was to assess indexes of pro- and antioxidant status of the kidneys in experimental diabetes mellitus. **Methods.** The study was performed on 25 Wistar male rats in compliance with requirements of the Rules for Carrying Out Work using Experimental Animals. The animals were divided into two groups, a group of intact rats (control) and a diabetic group (experiment) containing 12 and 13 rats, respectively. Diabetes mellitus was modeled with an injection of streptozotocin (65 mg/kg, i.p.). For more specific modeling of type 2 diabetes, the rats of the experimental group received a solution of cytoflavin at a dose equivalent to nicotinamide 115 mg/kg, i.p. At 28 days of the experiment, rats were decapitated under ether anesthesia, and activity of free radical oxidation (FRO) was studied in the kidneys. The following indexes were determined in the kidney tissue: concentration of thiobarbiturate- reactive fatty acid oxidation products (TPBP); total pro-oxidant activity by color intensity of the fluorescent complex formed by the interaction of TWEEN-80

peroxidation products with thiobarbituric acid; activities of antioxidant enzymes, catalase (CAT), superoxide dismutase), and glutathione peroxidase (GPO). CAT activity was measured by the CAT inhibition of sodium molybdate oxidation with hydrogen peroxide. SOD activity was measured by the content of nitroformazan, a colored product of nitroretazolium reduction with superoxide radicals. The marker of GPO activity, unoxidized glutathione, was measured by the color reaction with Ellman's reagent. **Results.** The study findings included increased TBP represented primarily by malonic dialdehyde, as well as increased TPOA (total pro-oxidant activity), and GPO and SOD activities in diabetic kidneys. **Conclusion.** Experimental diabetes mellitus was associated with pronounced oxidative stress in the kidney tissue, as evidenced by increased TPBP and TPOA, as well as by increased activities of antioxidant enzymes.

**Keywords:** diabetes; oxidative stress; nephropathy.

**For citation:** Filinova S.O., Zharikov A.Yu., Mazko O.N., Makarova O.G., Balandovich B.A. Indicators prooxidant and antioxidant status in kidneys of rats with experimental diabetes. *Patologicheskaya Fiziologiyai Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64 (1): 124-127. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.124-127

**For correspondence:** *Filinova S.O.*, e-mail: svetulya1511@mail.ru

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

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

**Received** 17.09.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

Распространенность сахарного диабета (СД) во всем мире стремительно растет [1]. Наибольшая опасность СД связана с осложнениями, обусловленными развитием так называемых диабетических ангиопатий, в том числе сосудистых диабетических нефропатий (ДН). Нефропатия развивается приблизительно у 20,1% пациентов с СД 1 типа и 6,3% пациентов с СД 2 типа [2]. Поиск эффективных методов коррекции диабетической нефропатии остается актуальной медицинской задачей.

Принято считать, что хроническая гипергликемия при СД способствует продукции реактивных форм кислорода, которые, в свою очередь, обуславливают повреждение мембран и органелл клеток [3, 4]. Ряд исследователей указывает на то, что такие процессы происходят и в почках при СД, инициируя каскад биохимических реакций, приводящих к повреждению сосудистой стенки и развитию нефропатии [5, 6]. В то же время биохимическая картина оксидативного стресса в почечной ткани при СД охарактеризована недостаточно, что ограничивает возможности поиска новых методов медикаментозной коррекции. Выявление особенностей формирования прооксидантного и антиоксидантного статусов в нефроцитах при СД может способствовать определению вектора поиска новых фармакологических подходов к коррекции диабетической нефропатии.

Цель исследования – изучение активности процессов свободнорадикального окисления в почках крыс в условиях экспериментального сахарного диабета.

### Методика

Все процедуры, связанные с содержанием и использованием животных, проводили с соблюдением директив Европарламента и Совета европейского со-

юза (2010/63/EU), регламентирующих использование животных в научных целях. Экспериментальные протоколы рассмотрены и утверждены этическим комитетом ФГБОУ ВО Алтайского государственного медицинского университета.

Эксперименты выполнены на 25 самцах крыс Вистар 2-х–3-х месячного возраста, массой 270-300 г. Крысы на протяжении периода исследований находились в индивидуальных «метаболических» клетках, приспособленных для сбора мочи, в условиях свободного доступа к воде и пище. Животные были разделены на 2 группы: группа интактных крыс (инт.) и группа «опыт» (опыт.) по 12 и 13 особей соответственно. В группе опыт моделировали СД внутрибрюшинным однократным введением 1 мл раствора стрептозотоцина в цитратном буфере из расчета 65 мг/кг. В соответствии с современными представлениями об особенностях моделирования стрептозотоцинового СД для селективного моделирования СД II типа крысам группы «опыт» предварительно вводили внутрибрюшинно раствор цитофлавина из расчета дозы никотинамида 115 мг/кг [7]. Группе интактных крыс аналогичным способом вводили 1 мл физиологического раствора.

На 28-е сут эксперимента животных декапитуировали под эфирным наркозом, извлекали почки и промывали их физиологическим раствором. Активность процессов свободно-радикального окисления (СРО) оценивали по совокупности показателей оксидантного и антиоксидантного статусов [8, 9]. Показатели оксидантного статуса определяли в гомогенате коркового вещества почек. Суммарный показатель концентрации всех прооксидантов и свободно-радикальных метаболитов, общую прооксидантную активность (ОПА) оценивали по интенсивности окраски флуоресцентного комплекса, образующегося

при взаимодействии продуктов перекисного окисления ТВИН-80 с тиобарбитуровой кислотой. Дополнительно определяли концентрацию в ткани малонового диальдегида (МДА) и других тиобарбитуратреактивных продуктов окисления жирных кислот (ТБРП).

В гомогенате коркового вещества почек исследовали активность антиоксидантной системы. Общая антиоксидантная активность (ОАА) оценивалась как интегративный показатель активности всех ферментных и неферментных факторов нейтрализации свободных радикалов (по степени угнетения  $Fe^{2+}$ /аскорбатзависимого окисления ТВИН-80 гомогенатом ткани) [9]. Определяли активность антиоксидантных ферментов: каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Активность КАТ определяли по подавлению ферментом окисления молибдата натрия перекисью водорода (перекись водорода окисляет молибдат натрия с образованием окрашенных продуктов, разложение перекиси водорода под действием каталазы уменьшает интенсивность окрашивания проб). Активность СОД оценивали по содержанию в пробе нитроформазана, окрашенного продукта восстановления нитротетразолия синего супероксидными радикалами. Для выявления маркера активности ГПО определяли активность неокисленного глутатиона по цветной реакции с реактивом Элмана. Расчет активности ферментов проводили относительно контрольной пробы (вода) и выражали в процентах [10].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica 12.0. Результаты представлены медианой (Me) и межквартильным размахом (25%, 75%). Различия показателей между группами определяли с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Результаты проведенных экспериментов показали, что в условиях моделирования стрептозотоцинового СД в почках подопытных крыс развивался выраженный оксидативный стресс, о чем свидетельствовали характерные биохимические признаки. У животных с СД по истечению 4 нед наблюдалось увеличение содержания ТБРП в гомогенате почек в 1,4 раза по сравнению с уровнем у интактных животных: 8,5 [8,5; 8,8] мкмоль и 6,1 [5,4; 6,9] мкмоль соответственно ( $p=0,000001$ ). Параллельно с этим имело место увеличение ОПА с 65,1 [63,4; 68,0] % у интактных крыс до 70,7 [68,6; 71,2] % в группе животных с СД ( $p=0,00087$ ).

На этом фоне фиксировались существенные изменения показателей антиоксидантного статуса в почках

крыс. Активность ГПО при экспериментальном СД статистически значимо увеличивалась (в 1,2 раза) относительно группы интактных животных: 45,3 [42,1; 47,8] % и 38,5 [25,2; 41,6] % соответственно ( $p=0,00568$ ). Отмечался также рост активности СОД с 18,2 [13,0; 18,5] % у интактных крыс до 23,1 [18,4; 26,0] % при СД ( $p=0,0272$ ). Активность КАТ, напротив, снижалась (в 1,4 раза) у животных с СД по сравнению с интактными животными: 10,3 [6,8; 13,0] % и 14,4 (10,2; 15,6) % соответственно ( $p=0,0262$ ). Параллельно, в условиях экспериментального СД наблюдался рост ОАА на 11% по сравнению с группой интактных крыс: 46,3 [43,6; 46,9] % против 41,7 [40,2; 43,3] соответственно ( $p=0,00562$ ).

Обсуждая полученные результаты, отметим, что, как известно, основным представителем ТБРП является малоновый диальдегид, являющийся биохимическим маркером перекисного окисления клеточных мембран [8]. Поэтому существенное увеличение концентрации ТБРП в тканях почек крыс с экспериментальным СД может свидетельствовать о повреждении мембран нефроцитов активными формами кислорода, накапливающимися в почках на фоне гипергликемии. Кроме того, в ходе исследования было зафиксировано статистически значимое увеличение ОПА. Как известно, ОПА – это показатель оксидативного статуса, который соответствует сумме всех прооксидантов и свободно-радикальных метаболитов, рост его указывает на усиление процессов окисления и истощение защитных антиоксидантных механизмов.

Анализ динамики активности ГПО, СОД и КАТ указывает на активацию антиоксидантной защиты в почках, которая, по-видимому, носит компенсаторный характер, направленный на нейтрализацию накапливающихся активных форм кислорода (АФК). В первую очередь об этом свидетельствует значительный рост активности главного антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы. Данный фермент участвует в нейтрализации наиболее агрессивной АФК – гидроксильного радикала ( $^*OH$ ) [11]. Как следствие, логично предположить, что в условиях экспериментального СД в почках происходит образование большого количества именно таких радикалов, что определяет высокую интенсивность и агрессивность свободнорадикального окисления в органе при СД.

Кроме того, наблюдалось увеличение активности СОД – фермента, одновалентно восстанавливающего супероксид до  $H_2O_2$  [12]. Функции ферментов СОД и КАТ тесно взаимосвязаны, поскольку образующаяся в процессе дисмутации супероксида перекись водорода впоследствии инактивируется каталазой [11]. Поэтому логично было ожидать увеличение активности и

каталазы. Однако ее активность относительно интактных крыс при экспериментальном СД, напротив, снижалась. Не исключено, что на 4-й нед развития патологии еще формируются начальные этапы включения антиоксидантной системы, когда клеточный ответ направлен на инактивацию посредством ГПО наиболее агрессивных АФК и трансформацию их в менее активные посредством СОД с последующей нейтрализацией под действием КАТ, что, по-видимому, может происходить в более поздние по времени периоды.

Таким образом в условиях экспериментального сахарного диабета наблюдаются признаки выраженного оксидативного стресса в почечной ткани, о чем свидетельствует рост показателей прооксидантного статуса при сопутствующем компенсаторном увеличении активности основных антиоксидантных ферментов.

### Литература

1. Yao L., Li L., Li X., Li H., Zhang Y., Zhang R. et al. The anti-inflammatory and antifibrotic effects of *Coreopsis tinctoria* Nutt on high-glucose-fat diet and streptozotocin-induced diabetic renal damage in rats. *BMC Complement Altern. Med.* 2015; 15: 314.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным федерального регистра сахарного диабета. *Сахарный диабет.* 2017; 20(1): 13–41.
3. Tan A., Forbes J., Cooper M. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 2007; 27(2): 130–43.
4. Zhang S., Xu H., Yu X., Wang Y., Sun F., Sui D. Simvastatin ameliorates low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetic nephropathy in an experimental rat model. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(4): 6388–96.
5. Шишко О.Н., Мохорт Т.В., Константинова Е.Э. Цапаева Н.Л., Моссе К.А. Роль эндотелиального фактора роста сосудов в патогенезе диабетической нефропатии. *Медицинский журнал.* 2013; 1(43): 132–5.
6. Soliman A.M., Mohamed A.S., Marie M.S. Echinochrome pigment attenuates diabetic nephropathy in the models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes mellitus.* 2016; 19(6): 464–70.
7. Спасов А.А., Воронкова М.П., Снигур Г.Л., Чепляева Н.И., Чепурнова М.В. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2. *Биомедицина.* 2011; (3): 12–8.
8. Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. Жариков А.Ю., Талалаева О.С. и др. *Методы доклинического (экспериментального) исследования влияния лекарственных средств на функцию почек.* Новосибирск; Гео: 2013.
9. Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Талалаева О.С., Лампатов В.В., Жариков А.Ю. и др. О роли процессов свободно-радикального окисления в развитии экспериментального нефролитиаза. *Нефрология.* 2008; 12(1): 58–63.

### Сведения об авторах:

**Филинова Светлана Олеговна**, преподаватель каф. фармакологии, ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: svetulya1511@mail.ru;

**Жариков Александр Юрьевич**, доктор биол. наук, доцент, зав. каф. фармакологии, e-mail: zharikov\_a\_y@mail.ru;

**Мазко Олеся Николаевна**, канд. биол. наук, доцент каф. фармакологии, e-mail: olesia.mazko@yandex.ru;

**Макарова Олеся Геннадьевна**, канд. фарм. наук, доцент каф. фармации, e-mail: olesia552@mail.ru;

**Баландович Борис Анатольевич**, доктор мед. наук, проф. каф. гигиены, основ экологии и безопасности жизнедеятельности, e-mail: dr.balandovich@mail.ru

10. Рытикова О.С., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Госсен И.Е. Роль перекисного окисления липидов в патогенезе непродолжительной ишемии почки в эксперименте. *Нефрология.* 2004; 8(4): 115–6.
11. Луцкий М.А., Куксова Т.В., Смелянец М.А., Лушникова Ю.П. Свободнорадикальное окисление липидов и белков – универсальный процесс жизнедеятельности организма. *Успехи современной естествознания.* 2014; 12(1): 24–48.
12. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release.* 2006; 113(3): 189–207.

### References

1. Yao L., Li L., Li X., Li H., Zhang Y., Zhang R. et al. The anti-inflammatory and antifibrotic effects of *Coreopsis tinctoria* Nutt on high-glucose-fat diet and streptozotocin-induced diabetic renal damage in rats. *BMC Complement Altern. Med.* 2015; 15: 314.
2. Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulova O.K. Epidemiology of diabetes mellitus in Russian Federation: clinical and statistical report according to the federal diabetes registry. *Sakharnyy diabet.* 2017; 20(1): 13–41. (In Russian)
3. Tan A., Forbes J., Cooper M. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 2007; 27(2): 130–43.
4. Zhang S., Xu H., Yu X., Wang Y., Sun F., Sui D. Simvastatin ameliorates low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetic nephropathy in an experimental rat model. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(4): 6388–96
5. Shyshko O.N., Mokhort T.V., Konstantinova E.E., Tsapaeva N.L., Mosse K.A. The role of vascular endothelial growth factor in pathogenesis of diabetic nephropathy. *Meditsinskiy zhurnal.* 2013; 1(43): 132–5. (In Russian)
6. Soliman A.M., Mohamed A.S., Marie M.S. Echinochrome pigment attenuates diabetic nephropathy in the models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes mellitus.* 2016; 19(6): 464–70.
7. Spasov A.A., Voronkova M.P., Snigur G.L., Chelyaeva N.I., Chepurnova M.V. Experimental model of a type 2 diabetes. *Biomedicina.* 2011; (3): 12–18. (In Russian)
8. Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V. Zharikov A.Yu., Talalaeva O.S. et al. *Methods of preclinical (experimental) study of the effect of drugs on renal function [Metody doklinicheskogo (eksperimental'nogo) issledovaniya vliyaniya lekarstvennykh sredstv na funktsiyu pochek].* Novosibirsk; Geo; 2013. (In Russian)
9. Zverev Ya.F., Bryukhanov V.M., Talalaeva O.S., Lampatov V.V., Zharikov A.Yu., et al. On the role of processes of free radical oxidation in the development of experimental nephrolithiasis. *Nefrologiya.* 2008; 12(1): 58–63. (In Russian)
10. Rytikova O.S., Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Gossen I.E. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of kidney ischemia of short duration in experiment. *Nefrologiya.* 2004; 8(4): 115–6. (In Russian)
11. Lutsky M.A., Kuksova T.V., Smelyanets M.A., Lushnikova Y.P. Lipid and protein free-radical oxidation as a universal vital process of the organism. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya.* 2014; 12(1): 24–48.
12. Ratnam D.V., Ankola D.D., Bhardwaj V., Sahana D.K., Kumar M.N. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release.* 2006; 113(3): 189–207.

## Обзоры

© Коллектив авторов, 2020

УДК616-092

**Воронков Н.С., Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н.**

# Роль киназ в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к гипоксии

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, 634012, г. Томск, Россия, Киевская ул., 111а

**Цель обзора** – анализ данных о роли киназ в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии. Установлено, что изоформы  $\delta$  и  $\epsilon$  протеинкиназы С участвуют в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии. Показано, что хроническая гипоксия вызывает усиление экспрессии киназ CaMKII, p-ERK1/2, p-p38, p-Akt, гексокиназы-1, гексокиназы-2. Гипоксия усиливает транслокацию гексокиназы-2 в митохондрии. У животных, адаптированных к гипоксии, не удалось обнаружить увеличения экспрессии киназ PKA, p-GSK3 $\beta$ , AMPK и JNK. Представлены данные, указывающие на то, что киназы ERK1/2, MEK1/2 участвуют в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии. Гипертрофия миокарда, вызванная хронической гипоксией, связана с активацией Rho-киназы. Вопрос о роли PI3K, Akt JNK, PKG, Rho-киназы, mTOR и p38 в защитном эффекте адаптации к гипоксии остается спорным.

**Ключевые слова:** сердце; адаптация; хроническая гипоксия; ишемия/реперфузия; киназы.

**Для цитирования:** Воронков Н.С., Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н. Роль киназ в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к гипоксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 128-134.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.128-134

**Для корреспонденции:** Маслов Леонид Николаевич, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 16-15-10001. Раздел, посвященный PKA и PKG, выполнен в рамках государственного задания АААА-А15-115120910024-0.

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

**Поступила** 21.11.2019

**Принята в печать** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

**Voronkov N.S., Naryzhnaya N.V., Maslov L.N.**

## The role of kinases in the infarct-limiting effect of adaptation to hypoxia

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Kievskaya Str. 111a, Tomsk 634012, Russia

The objective of this review was to analyze reports on the role of kinases in the cardioprotective effect of adaptation to hypoxia. It was established that the  $\delta$  and  $\epsilon$  isoforms of protein kinase C are involved in the cardioprotective effect of adaptation to hypoxia. Chronic hypoxia has been shown to increase expression of CaMKII, p-ERK1/2, p-p38, p-Akt, hexokinase-1, and hexokinase-2 kinases. Hypoxia enhances translocation of hexokinase-2 to mitochondria. In animals adapted to hypoxia, no increase in the expression of PKA, p-GSK3 $\beta$ , AMPK, and JNK kinases was detected. The presented data indicate that ERK1/2 and MEK1/2 kinases are involved in the cardioprotective effect of adaptation to hypoxia. Myocardial hypertrophy induced by chronic hypoxia is associated with activation of Rho kinase. The role of PI3K, Akt JNK, PKG, Rho kinase, mTOR, and p38 kinase in the protective effect of adaptation to hypoxia is controversial.

**Keywords:** heart; adaptation; chronic hypoxia; ischemia/reperfusion; kinases.

**For citation:** Voronkov N.S., Naryzhnaya N.V., Maslov L.N. The role of kinases in the infarct-limiting effect of adaptation to hypoxia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. Pathological physiology and experimental therapy, Russian Journal.* 2020; 64(1): 128-134. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.128-134

**For correspondence:** Leonid N. Maslov, Professor, Head of Laboratory Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Kievskaya st., 111A, 634012, Russia, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru



**Acknowledgement:** The work was supported by the Russian Science Foundation, Grant16-15-10001. Section devoted to PKA and PKG, is carried out within the framework of state task AAAA-A15-115120910024-0.

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

**Information about authors:**

Voronkov N.S. <http://orcid.org/0000-0002-9447-4236>

Naryzhnaya N.V. <http://orcid.org/0000-0003-2264-1928>

Maslov L.N., <http://orcid.org/0000-0002-6020-1598>

**Received** 21.11.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

## Введение

Известно, что адаптация к гипоксии повышает устойчивость сердца к действию ишемии/реперфузии [1-6]. В регуляции толерантности сердца к действию важную роль играют ишемии/реперфузии киназы [7, 8]. Активация одних киназ увеличивает устойчивость сердца к действию ишемии/реперфузии [7, 8], другие киназы, напротив, участвуют в реперфузионном повреждении сердца [9, 10]. В обзоре анализируются данные о роли киназ в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к гипоксии (для облегчения восприятия материала ссылки на конкретные сообщения авторов о роли киназ суммированы в таблице).

*Протеинкиназа С.* Известно, что протеинкиназа С (ПКС) принимает участие в кардиопротекторном эффекте ишемического preconditionирования и посткондиционирования [7, 8], поэтому исследователи обратили внимание на роль этого фермента в инфаркт-лимитирующем эффекте адаптации к гипоксии. У детей с пороком сердца и цианозом, а также в эксперименте у новорожденных кроликов, находившихся в условиях гипоксии, обнаружена транслокация киназы ПКСε в клеточные органеллы [11]. У крыс, находящихся длительное время в условиях гипоксии, наблюдается увеличение уровня киназ ПКСδ, ПКСε, ПКСζ [12]. Установлено, что инфаркт-лимитирующий эффект хронической периодической гипоксии не проявляется после блокады ПКС хелеритрином [13]. Селективный блокатор ПКСδ ротлерин уменьшал, но не устранял инфаркт-лимитирующий эффект хронической периодической гипоксии [13]. Хроническая периодическая гипоксия индуцировала транслокацию ПКСδ в митохондрии и ядра клеток. Нами установлено, что ротлерин устраняет адаптационное повышение толерантности кардиомиоцитов к действию аноксии/реоксигенации [14]. Эти факты указывают на важную роль ПКСδ в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии. Показано также, что хроническая гипоксия способствует повышению в миокарде уровня активатора

ПКС диацилглицерола [15], возможно он индуцирует активацию ПКС. Вместе с тем, есть данные о том, что увеличение активности ПКСδ может быть результатом окислительного стресса, который наблюдается в условиях хронической периодической гипоксии [16]. Так, было установлено, что ежедневное введение крысам антиоксиданта N-ацетилцистеина устраняет инфаркт-лимитирующий эффект хронической периодической гипоксии и предотвращает транслокацию ПКСδ в клеточные органеллы [16]. Действительно, образование нитротирозина, маркера окислительного стресса, было повышено в миокарде, особенно в митохондриях, при хронической гипоксии [17]. Способность активных форм кислорода активировать ПКС является известным фактом [18], который хорошо согласуется с данными исследований, выполненных на адаптированных к хронической периодической гипоксии крысах [16]. Следует отметить, что ПКСδ принимает участие в кардиопротекторном эффекте хронической непрерывной гипоксии [14]. Так установлено, что уровень ПКСδ отрицательно коррелирует с размером инфаркта после адаптации к гипоксии [17]. Хроническая периодическая гипоксия повышает устойчивость кардиомиоцитов к действию аноксии/реоксигенации и снижает Ca<sup>2+</sup>-перегрузку кардиомиоцитов [19]. Хелеритрин, ингибитор ПКС, устраняет защитные эффекты [19]. Представленные данные убедительно свидетельствуют об участии ПКСδ в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии.

Вместе с тем, есть данные, что ПКСε также участвует в повышении толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии после адаптации к непрерывной гипоксии [20]. Адаптация крыс к гипоксии приводила к повышению толерантности кардиомиоцитов к 25-минутному ингибированию, которое достигалось с помощью NaCN и 2-дезоксиглюкозы. Было обнаружено, что хроническая гипоксия приводит к усилению экспрессии ПКСε. Селективный ингибитор ПКСε КР-

1633 устраняет цитопротекторный эффект хронической гипоксии [20]. Возможно, что в кардиопротекторном эффекте ХГ участвуют и другие изоформы ПКС. Так, было обнаружено, что хроническая периодическая гипоксия приводит к усилению экспрессии в миокарде киназы ПКСа, в том числе ее фосфорилированной формы. [21]. Хроническая непрерывная ги-

поксия приводила к усилению транслокации РКСβII и РКСγ в мембраны кардиомиоцитов [22].

Таким образом, по меньшей мере, 2 изоформы ПКС (ПКСе и ПКСδ) участвуют в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии (табл.).

**Киназа AMPK.** АТФ-активируемая протеинкиназа AMPK (AMP-activated protein kinase) играет важную роль в реализации феномена пре- и посткондиционирования [7]. По всей видимости, AMPK не играет существенной роли в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии, поскольку у крыс, подвергнутых хронической периодической гипоксии, отмечается снижение уровня активированной AMPK в миокарде [23]

**Киназа CaMKII.** Известно, что активация киназы CaMKII (Ca<sup>2+</sup>-calmodulin kinase II) усугубляет повреждение сердца, вызванное ишемией/перфузией [10], что дало основание предполагать, что её активность в миокарде снижается при адаптации к гипоксии. Однако было обнаружено, что экспрессия мРНК, кодирующей кальмодулин, CaMKIIγ, CaMKIIδ в миокарде крыс после воздействия хронической гипоксии усиливается [24]. Усиление экспрессии CaMKII после воздействия хронической гипоксии отмечали другие исследователи [25]. Получены данные, что повышенная экспрессия CaMKII может препятствовать повреждению кардиомиоцитов при Ca<sup>2+</sup>-парадоксе [26], но может ли CaMKII обеспечивать инфаркт-лимитирующий эффект хронической гипоксии – неизвестно (табл.).

**Киназы ERK и MEK.** Киназы ERK (extracellular signal-regulated kinase) и MEK (mitogen-activated protein kinase) играют важную роль в пре- и посткондиционировании сердца [7], поэтому были основания полагать, что они могут участвовать в инфаркт-лимитирующем эффекте хронической гипоксии. Установлено, что хроническая периодическая гипоксия приводит к увеличению экспрессии ERK2 в миокарде крыс [27] и вызывает увеличение в миокарде уровня фосфорилированной ERK1/2 (p-ERK1/2) [28]. Ингибиторы MEK1/2 U0126 и PD-98059 устраняли инфаркт-лимитирующий эффект хронической периодической гипоксии [28]. Увеличение количества p-ERK1/2 в миокарде крыс после хронической периодической гипоксии отмечают и другие исследователи [21, 29]. Представленные данные указывают на то, что ERK1/2 и MEK1/2 участвуют в кардиопротекторном эффекте периодической гипоксии (табл.).

**Киназы PI3K и Akt.** Киназы PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) и Akt принимают участие в пре- и посткондиционировании сердца [7], поэтому можно было предположить, что они участвуют в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии. Показано, что храни-

Таблица

**Влияние хронической гипоксии на экспрессию протеинкиназ в миокарде**

Название киназ	Авторы
ПКСδ ↑, ПКСе ↑, ПКСζ ↑	Morel O.E. et al., 2003 [12]
ПКСδ ↑	Hlavackova M. et al., 2007 [17]
ПКСе ↑	Holzerova K. et al., 2015 [20]
ПКСа ↑	Micova P. et al., 2016 [21]
p-AMPK ↓	Xie S. et al., 2016 [23]
CaMKIIγ ↑, CaMKIIδ ↑	Zhao P.J. et al., 2008 [24]
ERK2 ↑	Strnisková M. et al., 2006 [27]
p-ERK1/2 ↑	Milano G. et al., 2010 [28]
p-ERK1/2 ↑	Micova P. et al., 2016 [21]
p-ERK1/2 ↑	Zhang K. et al., 2018 [29]
p-Akt ↑	Strnisková M. et al., 2006 [27]
p-Akt ↑	Kolar D. et al., 2017 [32]
PI3K ↓, p-Akt ↓	Zhang K. et al., 2018 [29]
ПКА нет эффекта	Larsen K.O. et al., 2008 [33]
p38 ↓, p-p38 ↓	Morel S. et al., 2006 [34]
p-p38 в ПЖ ↓, p-p38 в ЛЖ ↑	Strnisková M. et al., 2006 [27]
p-p38 в ЛЖ ↑	Micova P. et al., 2016 [21]
p-p38 ↑	Quing M. et al., 2007 [35]
p-JNK в ЛЖ нет эффекта	Morel S. et al., 2006 [34]
JNK и p-JNK в ЛЖ нет эффекта	Strnisková M. et al., 2006 [27]
JNK и p-JNK в ПЖ нет эффекта	Strnisková M. et al., 2006 [27]
p-JNK ↑	He S. et al., 2016 [37]
p-JNK/JNK ↑	Zhao Y.S. et al., 2019 [38]
p-GSK3β нет эффекта	McCarthy J. et al., 2011 [41]
HK-1 ↑, HK-2 ↑	Waskova-Arnostova P. et al., 2015 [42]
HK-1 ↑, HK-2 ↑	Kolar D. et al., 2017 [32]
HK-1 ↑, HK-2 ↑	Nedvedova I. et al., 2018 [2]

**Примечание.** ПКС – протеинкиназа С, AMPK – AMP-activated protein kinase, CaMKII – Ca<sup>2+</sup>-calmodulin kinase II, ERK – extracellular signal-regulated kinase, Akt – Akt-киназа, PI3K – phosphatidylinositol-3-kinase, ПКА – протеинкиназа А, p38 – p38-киназа, JNK – c-Jun N-terminal kinase, PKG – протеинкиназа G, GSK3β – glycogen synthase kinase 3 β, HK – hexokinase, ПЖ – правый желудочек, ЛЖ – левый желудочек.

ческая периодическая гипоксия вызывает увеличение экспрессии p-Akt в левом желудочке сердца крыс [27]. Установлено, что ингибитор PI3K LY294002 устраняет инфаркт-лимитирующий эффект периодической гипоксии [30]. Хроническая умеренная гипоксия вызывает увеличение уровня p-Akt в кардиомиоцитах H9c2 [31]. В исследовании, выполненном на изолированных перфузируемых сердцах крыс, подвергнутых ишемии/реперфузии, было показано, что инфаркт-лимитирующий эффект хронической периодической гипоксии связан с активацией PI3K [28]. Кроме того, показано, что хроническая непрерывная гипоксия вызывает увеличение уровня p-Akt в миокарде крыс [32]. Вместе с тем, по данным некоторых авторов [29], хроническая периодическая гипоксия вызывает снижение в миокарде крыс уровня PI3K и p-Akt. Нам также не удалось подтвердить участие PI3K в инфаркт-лимитирующем эффекте хронической непрерывной гипоксии [1]. Нами было установлено, что блокада PI3K вортманнином не влияет на повышение толерантности изолированных кардиомиоцитов к действию аноксии/реоксигенации у адаптированных к хронической непрерывной гипоксии крыс [14]. Таким образом, вопрос о роли PI3K и Akt в кардиопротекторном эффекте хронической непрерывной гипоксии является спорным (табл.)

**Киназа ПКА.** Протеинкиназа А (ПКА) является цАМФ-зависимой киназой, которая по мнению некоторых авторов [7], принимает участие в кардиопротекторном эффекте пре- и посткондиционирования. У мышей, подвергнутых воздействию хронической непрерывной гипоксии не удалось обнаружить изменения количества изоформ ПКА [33]. Однако это пока единственная работа, в которой оценивали влияние длительной гипоксии на уровень ПКА, поэтому делать вывод роли ПКА в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии пока рано.

**Киназа p38.** Киназа 38 также участвует в пре- и посткондиционировании [7]. Установлено, что хроническая периодическая гипоксия вызывает снижение уровня киназы p38 и p-p38 в миокарде [34]. Хроническая непрерывная гипоксия не оказывала подобного эффекта [34]. В то же время, согласно данным M Strnisková и др. [27], при хронической периодической гипоксии уровень p-p38 в правом желудочке снижается, а в левом желудочке сердца повышается, уровень общей p38 не изменяется. Повышение уровня p-p38 в миокарде левого желудочка после хронической периодической гипоксии было отмечено в более поздней работе того же коллектива исследователей [21]. Показано, что уровень p-p38 увеличен в миокарде у детей с пороками сердца и цианозом, но не у больных с поро-

ками сердца без цианоза [35]. Установлено, что блокирование p38 ингибитором SB203580 устраняет кардиопротекторный эффект хронической непрерывной гипоксии [11]. Представленные данные говорят о повышении уровня p-p38 в миокарде левого желудочка при хронической периодической гипоксии, что способствует повышению толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии. Вместе с тем, следует отметить, что позитивная роль p38 в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии показана только в одной статье [11] (табл.).

**Киназа JNK.** Принято считать, что JNK (c-Jun N-terminal kinase) играет негативную роль в регуляции толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии [9]. Вместе с тем, есть данные о том, что этот фермент участвует в кардиопротекторном эффекте дистантного прекондиционирования [36]. Установлено, что куркумин, ингибитор JNK, устраняет кардиопротекторный эффект хронической непрерывной гипоксии у кроликов [11]. При хронической периодической гипоксии не удалось обнаружить увеличение уровня p-JNK в левом желудочке сердца крыс [34]. В то же время, другим исследователям не удалось обнаружить изменения уровня общей JNK и p-JNK в правом и левом желудочках сердца адаптированных к хронической периодической гипоксии крыс [27]. Пребывание кардиомиоцитов H9c2 в среде, содержащей 1% O<sub>2</sub>, в течение 72 ч способствовало увеличению уровня p-JNK [37]. Установлено, что хроническая периодическая гипоксия приводит к увеличению соотношения p-JNK/JNK в миокарде [38]. Представленные данные свидетельствуют о том, что хроническая гипоксия может приводить к увеличению уровня активной p-JNK в миокарде. Вместе с тем, данные об участии этой киназы в кардиопротекторном эффекте адаптации ограничены пока одной статьёй [11], поэтому вопрос о роли JNK в защитном эффекте хронической периодической гипоксии остаётся открытым (табл.).

**Киназа mTOR.** Есть данные о том, что рапамицин, ингибитор mTOR (mammalian target of rapamycin), устраняет кардиопротекторный эффект ишемического прекондиционирования [39]. Следовательно, были основания предполагать, что mTOR может принимать участие в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии. Установлено, что рапамицин устраняет гипертрофию сердца, вызванную хронической периодической гипоксией [23]. Эти данные указывают на то, что mTOR при хронической периодической гипоксии активируется. Вместе с тем, они не дают ответа на вопрос о роли mTOR в инфаркт-лимитирующем эффекте хронической гипоксии.

**Киназа PKG.** Известно, что PKG (сGMP-dependent protein kinase G) участвует в кардиопротекторном эффекте пре- и посткондиционирования [7], поэтому были основания предполагать, что эта киназа участвует в инфаркт-лимитирующем эффекте хронической гипоксии. Было установлено, что хроническая гипобарическая гипоксия вызывает увеличение в миокарде уровня цГМФ, активатора PKG [25]. Пока остаётся неизвестным, ведёт ли увеличение содержания цГМФ в миокарде к повышению активности PKG. Неизвестно, какова роль этой киназы в инфаркт-лимитирующем эффекте хронической гипоксии.

**Киназа GSK3β.** Известно, что фосфорилирование GSK3β (glycogen synthase kinase 3 β) способствует инаktivации этой киназы и повышению устойчивости сердца к действию ишемии/реперфузии [40]. Установлено, что хроническая гипоксия не влияет на уровень p-GSK3β в миокарде мышей [41]. Следовательно, GSK3β не играет существенной роли в инфаркт-лимитирующем эффекте хронической гипоксии. Вместе с тем, это пока единственное исследование, в котором оценивали роль GSK3β в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии [41] (табл.).

**Гексокиназа 2 (HK-2, hexokinase 2).** Полагают, что связывание HK-2 с митохондриями предупреждает апоптоз кардиомиоцитов [7]. Установлено, что хроническая периодическая гипоксия вызывает транслокацию гексокиназы в митохондрии [42]. Кроме того, было установлено, что хроническая периодическая гипоксия вызывает увеличение экспрессии HK-1 и HK-2 в миокарде [42]. Хроническая непрерывная гипоксия также повышала экспрессию HK-1 и HK-2 в миокарде, усиливала ассоциацию HK-2 с митохондриями [32]. Аналогичные эффекты хронической непрерывной гипоксии обнаружены у крыс линии SHR [2] (табл.).

**Rho-киназа (ROCK, Rho-associated protein kinase).** Известно, что Rho-киназа участвует в апоптозе кардиомиоцитов [43], а её ингибирование способствует уменьшению размера инфаркта при ишемии/реперфузии сердца [44]. Можно было ожидать, что экспрессия Rho-киназы будет снижаться в миокарде крыс при адаптации. Однако оказалось, что гипертрофия правого желудочка сердца при хронической гипоксии связана с активацией Rho-киназы [45]. Показано, что при хронической периодической гипоксии гипертрофия миокарда левого желудочка также связана активацией Rho-киназы [46]. Имеет ли указанная киназа отношение к кардиопротекторному эффекту хронической гипоксии пока неясно.

Таким образом, анализ данных о роли киназ в реализации кардиопротекторного эффекта адаптации к

гипоксии показал, что хроническая гипоксия приводит к усилению экспрессии в миокарде следующих киназ: PKCδ, PKCε, PKCζ, PKCα, CaMKII, p-ERK1/2, p-p38, p-Akt, HK-1, HK-2. Адаптация к гипоксии усиливает ассоциацию HK-2 с митохондриями и вызывает транслокацию PKCδ, PKCβII и PKCη в мембраны кардиомиоцитов. В исследовании, выполненном на адаптированных к гипоксии животных, не удалось обнаружить усиления экспрессии киназ: PKA, p-GSK3β, AMPK и JNK. Доказано, что PKCδ, PKCε, ERK1/2, MEK1/2 участвуют в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии. Роль киназ JNK, PKG, Rho-киназы, mTOR и p38 в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии требует дальнейшего изучения.

### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Н.С. Воронков, Н.В. Нарыжная, Л.Н. Маслов

Написание текста, редактирование – Н.С. Воронков, Н.В. Нарыжная, Л.Н. Маслов

### Литература

#### (п.п. 1-13; 15-46 см. References)

14. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Халиулин И.Г., Пей Ж.-М., Жанг И., Цепкина А.В. и др. Адаптация с помощью хронической непрерывной нормобарической гипоксии увеличивает толерантность кардиомиоцитов крыс к аноксии-реоксигенации: роль протеинкиназ. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102(12): 1462-71.

### References

1. Tsubulnikov S.Y., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Ma H., Lishmanov Y.B., Oeltgen P.R., Garlid K. Role of protein kinase C, PI3 kinase, tyrosine kinases, NO-synthase, KATP channels and MPT pore in the signaling pathway of the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia. *General Physiology Biophysics*. 2018; 37(5): 537–47.
2. Nedvedova I., Kolar D., Elsnicova B., Hornikova D., Novotny J., Kalous M., et al. Mitochondrial genome modulates myocardial Akt/Glut/HK salvage pathway in spontaneously hypertensive rats adapted to chronic hypoxia. *Physiological Genomics*. 2018; 50(7): 532–41.
3. Kolar F., Ostádal B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiological Research*. 2004; 53(1): S3–S13.
4. Gu S., Hua H., Guo X., Jia Z., Zhang Y., Maslov L.N., et al. PGC-1α Participates in the protective effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia on cardiomyocytes. *Cell Physiology and Biochemistry*. 2018; 50(5): 1891–902.
5. Meerson F.Z., Ustinova E.E., Manukhina E.B. Prevention of cardiac arrhythmias by adaptation to hypoxia: regulatory mechanisms and cardiotropic effect. *Biomedica Biochimica Acta*. 1989; 48(2-3): S83–S8.
6. Estrada J.A., Williams A.G., Sun J., Gonzalez L., Downey H.F., Caffrey J.L., Mallet R.T. δ-Opioid receptor (DOR) signaling and reactive oxygen species (ROS) mediate intermittent hypoxia induced protection of canine myocardium. *Basic Research in Cardiology*. 2016; 111(2): 17.

7. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circulation Research*. 2015; 116(4): 674–99.
8. Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiological Reviews*. 2003; 83(4): 1113–51.
9. Milano G., Morel S., Bonny C., Samaja M., von Segesser L.K., Nicod P., Vassalli G. A peptide inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase reduces myocardial ischemia-reperfusion injury and infarct size in vivo. *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*. 2007; 292(4): H1828–H35.
10. Ling H., Gray C.B., Zambon A.C., Grimm M., Gu Y., Dalton N., et al. CaMKII $\delta$  mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through nuclear factor- $\kappa$ B. *Circulation Research*. 2013; 112(6): 935–44.
11. Rafiee P., Shi Y., Kong X., Pritchard K.A., Tweddell J.S., Litwin S.B., et al. Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. *Circulation*. 2002; 106(2): 239–45.
12. Morel O.E., Buvry A., Le Corvoisier P., Tual L., Favret F., León-Velarde F., et al. Effects of nifedipine-induced pulmonary vasodilatation on cardiac receptors and protein kinase C isoforms in the chronically hypoxic rat. *Pflügers Archiv*. 2003; 446(3): 356–64.
13. Neckar J., Marková I., Novák F., Nováková O., Szárszoi O., Ost'adal B., Kolár F. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC- $\delta$  in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*. 2005; 288(4): H1566–H72.
14. Naryzhnaya N.V., Maslov L.N., Khaliulin I.G., Pei J.M., Zhang Y., Tsepokina A.V., et al. Chronic continuous normobaric hypoxia augments cell tolerance to anoxia/reoxygenation: the role of protein kinases. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova*. 2016; 102(12): 1462–71. (in Russian)
15. El Alwani M., Usta J., Nemer G., El Sabban M., Nasser M., Bitar H., et al. Regulation of the sphingolipid signaling pathways in the growing and hypoxic rat heart. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2005; 78(1-4): 249–63.
16. Kolar F., Jezková J., Balková P., Breh J., Neckár J., Novák F., et al. Role of oxidative stress in PKC- $\delta$  upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*. 2007; 292(1): H224–H30.
17. Hlaváčková M., Neckár J., Jezková J., Balková P., Stanková B., Nováková O., et al. Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 2007; 232(6): 823–32.
18. Krylatov A.V., Maslov L.N., Voronkov N.S., Boshchenko A.A., Popov S.V., Gomez L., et al. Reactive oxygen species as intracellular signaling molecules in the cardiovascular system. *Current Cardiology Reviews*. 2018; 14(4): 290–300.
19. Ma H.J., Li Q., Ma H.J., Guan Y., Shi M., Yang J., Li D.P., Zhang Y. Chronic intermittent hypobaric hypoxia ameliorates ischemia/reperfusion-induced calcium overload in heart via Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in developing rats. *Cell Physiology and Biochemistry*. 2014; 34(2): 313–24.
20. Holzerova K., Hlaváčková M., Žurmanová J., Borchert G., Neckář J., Kolár F., et al. Involvement of PKC $\epsilon$  in cardioprotection induced by adaptation to chronic continuous hypoxia. *Physiological Research*. 2015; 64(2): 191–201.
21. Micova P., Hahnova K., Hlavackova M., Elsnicova B., Chytilova A., Holzerova K., et al. Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A2 $\alpha$ /cyclooxygenase 2 pathway via  $\beta$ 2-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2016; 423(1-2): 151–63.
22. Zeng C., Liang B., Jiang R., Shi Y., Du Y. Protein kinase C isozyme expression in right ventricular hypertrophy induced by pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Molecular Medicine Reports*. 2017; 16(4): 3833–40.
23. Xie S., Deng Y., Pan Y.Y., Ren J., Jin M., Wang Y., et al. Chronic intermittent hypoxia induces cardiac hypertrophy by impairing autophagy through the adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016; 606: 41–52.
24. Zhao P.J., Pan J., Li F., Sun K. Effects of chronic hypoxia on the expression of calmodulin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and the calcium activity in myocardial cells in young rats. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2008; 10(3): 381–5.
25. Nehra S., Bhardwaj V., Kar S., Saraswat D. Chronic hypobaric hypoxia induces right ventricular hypertrophy and apoptosis in rats: therapeutic potential of nanocurcumin in improving adaptation. *High Altitude Medicine & Biology*. 2016; 17(4): 342–52.
26. Xie Y., Zhu W.Z., Zhu Y., Chen L., Zhou Z.N., Yang H.T. Intermittent high altitude hypoxia protects the heart against lethal Ca<sup>2+</sup> overload injury. *Life Sciences*. 2004; 76(5): 559–772.
27. Strnisková M., Ravingerová T., Neckár J., Kolár F., Pastoreková S., Barancik M. Changes in the expression and/or activation of regulatory proteins in rat hearts adapted to chronic hypoxia. *General Physiology and Biophysics*. 2006; 25(1): 25–41.
28. Milano G., von Segesser L.K., Morel S., Joncic A., Bianciardi P., Vassalli G., Samaja M. Phosphorylation of phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B and extracellular signal-regulated kinases 1/2 mediate reoxygenation-induced cardioprotection during hypoxia. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 2010; 235(3): 401–10.
29. Zhang K., Ma Z., Wang W., Liu R., Zhang Y., Yuan M., Li G. Beneficial effects of tolvaptan on atrial remodeling induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *Cardiovascular Therapeutics*. 2018; 36(6): e12466.
30. Ravingerová T., Matejíková J., Neckár J., Anđelová E., Kolár F. Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2007; 297(1-2): 111–20.
31. Jia W., Jian Z., Li J., Luo L., Zhao L., Zhou Y., et al. Upregulated ATF6 contributes to chronic intermittent hypoxia-afforded protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016; 37(5): 1199–208.
32. Kolar D., Gresikova M., Waskova-Arnostova P., Elsnicova B., Kohutova J., Hornikova D., et al. Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017; 432(1-2): 99–108.
33. Larsen K.O., Lygren B., Sjaastad I., Krobret K.A., Arnkvaern K., Florholmen G., et al. Diastolic dysfunction in alveolar hypoxia: a role for interleukin-18-mediated increase in protein phosphatase 2A. *Cardiovascular Research*. 2008; 80(1): 47–54.
34. Morel S., Milano G., Ludunge K.M., Corno A.F., Samaja M., Fleury S., et al. Brief reoxygenation episodes during chronic hypoxia enhance posthypoxic recovery of LV function: role of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Basic Research in Cardiology*. 2006; 101(4): 336–45.
35. Quing M., Görlach A., Schumacher K., Wöltje M., Vazquez-Jimenez J.F., Hess J., Seghaye M.C. The hypoxia-inducible factor

- HIF-1 promotes intramyocardial expression of VEGF in infants with congenital cardiac defects. *Basic Research in Cardiology*. 2007; 102(3): 224–32.
36. Heidbreder M., Naumann A., Tempel K., Dominiak P., Dendorfer A. Remote vs. ischemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cardiovascular Research*. 2008; 78(1): 108–15.
37. He S., Liu S., Wu X., Xin M., Ding S., Xin D., et al. Protective role of downregulated MLK3 in myocardial adaptation to chronic hypoxia. *Journal of physiology and biochemistry*. 2016; 73(3): 371–80.
38. Zhao Y.S., An J.R., Yang S., Guan P., Yu F.Y., Li W., et al. Hydrogen and oxygen mixture to improve cardiac dysfunction and myocardial pathological changes induced by intermittent hypoxia in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; 2019: 7415212.
39. Wagner C., Tillack D., Simonis G., Strasser R.H., Weinbrenner C. Ischemic post-conditioning reduces infarct size of the in vivo rat heart: role of PI3-K, mTOR, GSK-3beta, and apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2010; 339(1-2): 135–47.
40. Miura T., Miki T. GSK-3 $\beta$ , a therapeutic target for cardiomyocyte protection. *Circ. J*. 2009; 73(7): 1184–92.
41. McCarthy J., Lochner A., Opie L.H., Sack M.N., Essop M.F. PKC $\epsilon$  promotes cardiac mitochondrial and metabolic adaptation to chronic hypobaric hypoxia by GSK3 $\beta$  inhibition. *Journal of Cellular Physiology*. 2011; 226(9): 2457–68.
42. Waskova-Arnostova P., Elsnicova B., Kasparova D., Hornikova D., Kolar F., Novotny J., Zurmanova J. Cardioprotective adaptation of rats to intermittent hypobaric hypoxia is accompanied by the increased association of hexokinase with mitochondria. *Journal of Applied Physiology*. 2015; 119(12): 1487–93.
43. Zhang J., Li X.X., Bian H.J., Liu X.B., Ji X.P., Zhang Y. Inhibition of the activity of Rho-kinase reduces cardiomyocyte apoptosis in heart ischemia/reperfusion via suppressing JNK-mediated AIF translocation. *Clinica Chimica Acta*. 2009; 401(1-2): 76–80.
44. Bao W., Hu E., Tao L., Boyce R., Mirabile R., Thudium D.T., et al. Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 2004; 61(3): 548–58.
45. Gosal K., Dunlop K., Dhaliwal R., Ivanovska J., Kantores C., Desjardins J.F., et al. Rho kinase mediates right ventricular systolic dysfunction in rats with chronic neonatal pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2015; 52(6):717–27.
46. Wang Z.H., Zhu D., Xie S., Deng Y., Pan Y., Ren J., Liu H.G. Inhibition of Rho-kinase attenuates left ventricular remodeling caused by chronic intermittent hypoxia in rats via suppressing myocardial inflammation and apoptosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2017; 70(2): 102–09.

**Сведения об авторах:**

**Воронков Никита Сергеевич**, лаборант-исследователь лаб. экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии Томского НИМЦ, e-mail: niks.voronkov@gmail.com;

**Нарыжная Наталья Владимировна**, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии, Томского НИМЦ, e-mail: natalynar@yandex.ru;

**Маслов Леонид Николаевич**, доктор мед.н., проф. руководитель лаб. экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии Томского НИМЦ; e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

© Пальцын А.А., 2020

УДК 616-092

**Пальцын А.А.**

## Миокины

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»  
125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;  
ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования»,  
123995, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1

Миокины – небольшие по массе пептиды, которые образуются, экспрессируются на поверхности и выделяются в кровотоки мышечными волокнами. Оказывают аутокринное, паракринное и эндокринное действие, прежде всего на мышцы. Значение миокинов для медицины определяется тем, что мышцы – самая крупная часть тела по массе и объему, что обеспечивает первую и главную для жизни функцию – движение. Все патологические процессы протекают с нарушением образования, распределения и взаимодействия миокинов с клетками – мишенями. Детализация этих процессов – тема большая и сложная. Тем не менее, уже на современном уровне знаний ориентированные на миокины медицинские практики могут быть вполне эффективны, поскольку основа их – модифицированная под конкретную задачу разумная физическая активность.

**Ключевые слова:** движение; миокины; мышцы; физические нагрузки.

**Для цитирования:** Пальцын А.А. Миокины. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 135-141.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.135-141

**Для корреспонденции:** Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

**Финансирование.** Работа не имеет финансовой поддержки.

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

**Поступила** 07.09.2019

**Принята к печати** 16.01.2019

**Опубликована** 25.02.2020

**Paltsyn A.A.**

## Myokines

Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia;  
Russian Medical Academy of Postgraduate Education,  
Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 125315, Russia

Myokines are low-molecular-weight peptides that are formed, expressed on the surface, and secreted into the bloodstream by muscle fibers. They have autocrine, paracrine and endocrine effects, especially on muscles. Significance of myokines for medicine is determined by the fact that muscles are the largest part of the body by their mass and volume and provide the first and the most vitally important function, the movement. All pathological processes are associated with violations of myokine formation, distribution, and interaction with target cells. Providing a deep insight into these processes is a big and complex topic. Nevertheless, at the current level of knowledge, myokine-oriented medical practices can be quite effective since these practices are based on reasonable physical activity adjusted to a specific task.

**Keywords:** movement; myokines; muscle; physical exercise.

**For citation:** Paltsyn A.A. Myokines. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2020; 64(1): 135-141. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.135-141

**For correspondence:** Paltsyn A.A., e-mail: lrrp@mail.ru

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

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

**Received** 07.09.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

Миокины – небольшие по массе пептиды, которые образуются, экспрессируются на поверхности и выделяются в кровоток мышечными волокнами. Они не способны проникать через липидный бислой клеточной поверхности и могут влиять на клетку-мишень, только через соответствующий рецептор. Оказывают аутокринное, паракринное и эндокринное действие в малых концентрациях, примерно в тысячу раз меньших, чем гормоны.

Миокины занимают особое положение среди цитокинов и это положение должно учитываться и использоваться медициной. Мышцы составляют около 30% массы тела у женщин и около 40% у мужчин. У человека, выполняющего интенсивную силовую нагрузку, масса мышц может превышать половину массы тела. Функцию этой огромной «железы внутренней секреции» легче регулировать медицинскими приемами и образом жизни индивида, сравнительно с другими железами.

Организм приспосабливается к физическим нагрузкам увеличением массы мышц. Этот процесс усиливается при высоком содержании белка в пище. Уменьшение мышечной массы происходит при недостаточном питании, раке, диабете, сердечной недостаточности, ВИЧ-инфекции, хронической обструктивной болезни легких, старости [1]. Мышцы – главный резервуар белка в организме. За счет уменьшения их массы поддерживается концентрация аминокислот в кровотоке при стрессе, голодании, болезни. Предельные случаи такого поддержания гомеостаза приводят к кахексии и смерти. Аэробные – продолжительные, субмаксимальные по усилиям нагрузки (распил дров, ходьба, бег, велосипед, плавание) увеличивают выносливость и способствуют формированию медленной, красной, богатой миоглобином, мышечной ткани I типа с большим числом сосудов и митохондрий в волокнах. Анаэробные – кратковременные, максимальные по силе нагрузки (все виды поднятия тяжестей в труде и спорте) создают мышцы II типа: быстрые, обеспечивающие большие по силе, но кратковременные, с быстрым утомлением, как следствие анаэробности, «взрывные» усилия.

Одним из механизмов многообразной и неразрывной связи жизни с движением является образование в мышцах при любом виде нагрузки миокинов. Число уже известных миокинов измеряется многими сотнями и, несомненно, будет с каждым годом возрастать. Расскажу только о некоторых, наиболее интересных, на мой, конечно, не бесспорный взгляд.

Исследование, проведенное на добровольцах, показало, что физические нагрузки активируют транс-

крипцию PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ) – важного регулятора биогенеза и функции митохондрий [2, 3]. Посредством мышечного PGC-1 $\alpha$  осуществляются и возвращаются к норме при отклонении от неё, такие жизненно-важные процессы, как газообмен, оксидативный стресс, воспаление, экспрессия TNF- $\alpha$ , апоптоз, аутофагия, активация протеосом, гомеостаз Ca<sup>+2</sup>, функция эндотелия и ангиогенез.

Следующий миокин – IL6. Интересна история вхождения этого вещества, некогда называвшегося интерлейкином, в сообщество миокинов. Ранее этот пептид прочно занял в науке позицию белка острой фазы воспаления, стимулятора лихорадки, нейтрофильного лейкоцитоза, В-клеточного лимфоцитоза. У дефицитных по IL6 мышей снижаются концентрации IgG и IgA. IL6 считается виновником воспалительного компонента детского энцефалита, ревматоидного артрита, метаболического синдрома [4].

Главным разработчиком миокиновой роли IL6 оказался коллектив датских ученых, возглавляемый В.К. Pedersen. Они обнаружили в 1997 г. [5], что увеличение велосипедной нагрузки у здоровых молодых мужчин сопровождается повышением в плазме содержания лимфоцитов, концентрации аспартат аминотрансферазы, аланин аминотрансферазы и IL-6. После умеренной нагрузки таких изменений не было. В тот момент авторы объяснили экспрессию IL-6 в воспалительном ключе – повреждением мышц интенсивной нагрузкой, участием в этом процессе иммунных клеток [6] и посвятили много последующих лет изучению этого маленького белка, создав, по сути, миокиновую часть современных знаний об этом веществе. Группа В.К. Pedersen опубликовала и продолжает публиковать по этой теме десятки работ. В частности, уже в 2000 г. появилась статья [7] о том, что белок острой фазы воспаления IL-6 оказался миокином с выраженным *противовоспалительным* действием. Он стимулирует продукцию противовоспалительных цитокинов, подавляет синтез TNF $\alpha$  [8]. Концентрация IL-6 в плазме повышается пропорционально аэробной нагрузке - скорости бега марафонцев. А предполагаемая ранее связь концентрации IL-6 в плазме с повреждением мышц не подтвердилась [7]. Концентрация IL-6 в плазме определяется массой, участвующей в движении мускулатуры, спецификой, интенсивностью и продолжительностью нагрузки. Максимум регистрируется в конце периода работы или вскоре после него и может 100-кратно превышать уровень покоя [9]. Авторы выполнили необходимый контроль на возможность не мышечного, а «моноцитарного» происхождения подь-



ема концентрации ИЛ-6 и нашли, что нагрузки не меняют содержание ИЛ-6 в моноцитах и даже могут его снижать [10]. Еще одним доказательством того, что ИЛ-6 – миокин оказалось определение содержания в мышцах человека ИЛ-6 mRNA. Крайне низкое в покое, оно увеличивалось через 30 мин после включения нагрузки и могло стократно возрасти, как и содержание самого ИЛ-6.

Эндокринная роль мышечного ИЛ-6 была доказана группой В.К. Pedersen путем измерения в крови концентрации ИЛ-6 в бедренных артериях и вене работающей ноги. Нагрузка повышала общую концентрацию миокина, но в крови, оттекающей от работающих мышц (в вене) концентрация ИЛ-6 была в 17 раз выше, чем в артерии [11].

Вскоре после надежного доказательства права ИЛ-6 называться миокином датские ученые обнаружили, что у этого многоликого пептида не меньше прав и на титул – нейротрофин. Измеряя его концентрацию в лучевой артерии и яремной вене при длительной нагрузке в велоэргометре у молодых мужчин ( $27 \pm 2$  года) регистрировали повышение концентрации в вене, т.е. образование ИЛ-6 мозгом [12]. Это наблюдение подтверждается и развивается анализом содержания ИЛ-6 mRNA в гиппокампе мышей, которое увеличилось в 2-3 раза после физической нагрузки [13].

Мышцы не только создают ИЛ-6, но и являются его мишенью (аутокринный эффект). Он вызывает гипертрофию мышц и миогенез, стимулируя пролиферацию миогенных стволовых клеток, их дифференцировку и слияние в мышечные трубочки с последующим образованием мышечных волокон [14]. Мышечный ИЛ-6 оказывает противовоспалительный эффект, а синтезируемый макрофагами ИЛ-6 становится классическим провоспалительным цитокином с острым или хроническим эффектом. Различия функции определяются микроокружением [15].

Педантизма ради, отмечаю, что ИЛ-6 не уникальное вещество, а представитель семейства сходных по структуре и функции белков. Эта черта характерна для большинства заполняющих научную литературу «факторов». Описание каждого из группы однотипных цитокинов невозможно. В этом случае уже сегодня тяготящая мозг избыточность сведений полностью бы «затромбировала» каналы информации и обернулась её стазом. Перегруженность памяти затрудняет комбинирование элементами памяти. Поэтому я упоминаю здесь лишь общую для всего семейства черту – передачу сигнала в клетку через трансмембранный белок CD130.

В 1997 г. в журнале Nature появилась статья McPherron и соавт. [16] об открытии у мышей ещё

одного представителя семейства трансформирующих факторов роста бета (TGF- $\beta$ ), названного авторами growth/differentiation factor-8 (GDF-8), а позже ставшего под названием миостатин популярным в медицине а, еще больше, в спорте и культуризме. Мышцы с выключенным геном GDF-8 оказались значительно крупнее животных дикого типа и отличались меньшим содержанием жира. Мышцы мутантных животных были в 2-3 раза больше за счет гиперплазии и гипертрофии волокон. Так авторы установили, что GDF-8 (ныне миостатин) – негативный регулятор роста скелетных мышц. Неудивительно, что эти результаты пробуждают мечту избавляться от вредоносного, не эстетичного жира и приобретать здоровье, силу и красоту тела снижением экспрессии миостатина. Принципиальная осуществимость такой мечты была доказана в работе с гончими собаками породы уиппет [17]. Стандартный фенотип этих собак, гомозиготных по содержанию миостатина представляется стройными, худощавыми, даже астеничными животными, бегающими очень быстро. Гетерозиготы, с мутацией лишь в одном аллеле миостатина и сохранении в другом, не утрачивают стройность, но приобретают более развитую мускулатуру, гармоничное, атлетическое телосложение. Бегают ещё быстрее, чем гомозиготы по миостатину. Гомозиготы по отсутствию миостатина – массивные, сильные животные с переразвитой мускулатурой. Выглядят не гончими, а бойцовыми. Бегают медленно, часто имеют уродства.

Описан пример генетической мутации с потерей функции миостатина у человека [18]. Подтверждено генетическим анализом. У профессиональной спортсменки (спринтер) родился мальчик с неестественно рельефной для новорожденного мускулатурой (особенно ног), но абсолютно нормального во всех прочих отношениях. В 4,5 года этот мальчик был здоров и держал в вытянутых руках 3-х-килограммовые гантели. Похоже, что мутация была наследственной. Дед матери – дорожный рабочий поднимал бордюрные камни, весом 330 фунтов. Есть и другие примеры благотворного влияния на мускулатуру мутаций в гене миостатина. Многочисленны попытки (здесь не обсуждаемые) использования этого эффекта в спорте и фитнесе.

Кроме всех достоинств сильного тела снижение концентрации миостатина уменьшает накопление жира и улучшает метаболизм глюкозы [19], что открывает перспективу лечения ожирения и диабета. Однако путь от полученного в эксперименте факта до его использования в практической медицине оказался длинным, изобилующем неожиданностями и до сих пор не пройденным. История продвижения в практику знаний о

миостатине повторила историю многих привлекательных в первом появлении научных данных, оказывающихся при дальнейшем изучении трудными или недоступными для современных техник их реализации. Данные о возрастной динамике содержания миостатина не укладываются в схему обратной пропорциональности с развитием мышц. На эффект миостатина не меньше, чем его концентрация влияет чувствительность его рецепторов. В фитнесе большую популярность приобрел антагонист миостатина (блокатор его рецепторов) фоллистатин. Но это препарат с выраженными побочными действиями его широкое применение ради эффектной фотографии и сиюминутного силового рекорда не представляет интереса для медицины. Не обнаружилось и прямой связи между содержанием и активностью миостатина. Выявились сложности в определении концентрации и регуляции посттрансляционной активности [20].

Ситуация с миостатином типичный случай взаимодействия человека с природой. Наши медицинские действия, как и любые другие вмешательства в окружающую среду: хозяйственные, технические происходят, и всегда будут происходить, в условиях недостаточного знания объекта, на который мы пытаемся воздействовать. Мы узнали одну закономерность: меньше миостатина – больше мышц. И конечно достигли бы успеха, если бы эта закономерность была не частным эффектом, а полным, исчерпывающим отражением роли миостатина в организме. Однако, участие миостатина не только в регуляции объема и силы мышц, но и в других процессах обуславливает то, что он сегодня не аптечный препарат, а лишь объект дальнейшего изучения. На пути такого изучения был найден связывающий миостатин протеогликан с высоким содержанием лейцина – декорин. Его секреция работающей мышцей выдает его миокиновую сущность и возможность миокин – опосредованного влияния на обширный список возрастных и обменных патологий [21]. Обнаружена способность декорина ингибировать рост нескольких линий гепатомы [22]. Присутствие декорина в глазных каплях существенно увеличивало скорость реэпителизации в модели органной культуры [23].

Содержание декорина оказалось важным прогностическим биомаркером для пациентов с саркомой периферических нервных оболочек. При экспрессии декорина 5-летний срок выживания был у 78,57% больных, а у декорин-негативных больных только 18,75% ( $p=0,0014$ ) [24].

Наиболее популярный миокин – нейротрофический фактор мозга – BDNF. Он, хотя и фактор мозга,

всё же истинный миокин, поскольку его можно обнаружить после электрической стимуляции изолированной мышцы [25]. Выяснили, что у местного, «мышечно-созданного» BDNF, есть и местная, мышечная задача: регенерация и дифференцировка миобластов [26].

Гораздо длиннее известный сегодня список функций, выполняемых BDNF, который синтезируется при физических нагрузках в мозге. Роль и значение BDNF обусловлены его связью с серотонин-эргической системой мозга и, следовательно, участием в регуляции многих состояний и форм поведения – гомеостаза глюкозы и липидного метаболизма, сна и бодрствования, настроения, способности к физическим нагрузкам, агрессивности, сексуальности, стресс устойчивости, нейроэндокринной регуляции, склонности к депрессии и суициду. BDNF оказывает выраженное стимулирующее влияние на нейропластичность и нейрогенез. Наибольшие концентрации BDNF находят в неокортексе, гиппокампе, мозжечке, миндалине [27].

Интересны результаты шведско-американского коллектива ученых, сравнившего содержание BDNF в сыворотке здоровых 70-летних людей (58% женщин) после 35 минутной физической или когнитивной нагрузки. Все занятия повышали содержание BDNF, но двигательная нагрузка значительно больше [28].

Задачи, созданного мышечной работой BDNF, в мозге многочисленны. Например, он играет ключевую роль в обучении и памяти. В рандомизированном исследовании [29] пожилых людей (средний возраст 67,6 года) было обнаружено, что аэробные нагрузки в течение года увеличивали объем гиппокампа на 2%, тогда как без нагрузок он уменьшается за это время на 1-2%. У тренирующихся повышалось содержание BDNF в сыворотке, улучшалась память.

Результаты этой работы приобрели большую популярность (785 цитирований к 11.08.2019) и развитие, в котором мне кажется интересной статья из Магдебурга [30]. Авторы сравнили нейропластические эффекты двух видов физической активности (спорт или танцы) одинаковых по продолжительности сеанса у людей в возрасте 63-80 лет. Срок воздействия – 18 мес. В обеих группах отмечено улучшение внимания и вербальной памяти. Однако, у танцоров было выше содержание BDNF в плазме, объем прецентральной извилины и парагиппокампальной извилины (МПИ). В спортивной группе изменения этих объемов были или отрицательны или не достоверны. Авторы объясняют результат тем, что у танцоров физическая нагрузка совмещалась с когнитивной. На мой взгляд, эмоциональная составляющая танца могла иметь, по крайней

мере, не меньшее значение, чем когнитивная. В недавно опубликованном исследовании греческих авторов [31] 130 человек старше 60 лет (средний возраст 67) танцевали в течение 32 нед 2 раза в неделю по 75 мин. Перед началом и после окончания исследования участники прошли испытания во многих двигательных тестах и показали существенное улучшение силы, гибкости, ловкости, баланса. И, что очень важно, у стариков улучшалось самочувствие и самостоятельность, и повышалась самооценка.

Связь BDNF с серотонином трудно не заметить. Наибольшее внимание в литературе обращается на положительное влияние того и другого на настроение и, как следствие, на ментальное и физическое здоровье, на повышение содержания серотонина и BDNF физическими нагрузками. На непростой для науки вопрос: серотонин влияет на настроение или настроение на серотонин томские студенты ответили по первому варианту и иногда употребляют серотонин с целью испытать удовольствие [32]. Возможно, что в этом случае студенты наслаждаются не серотонином, а BDNF — то же вещество с ярким положительным эмоциональным эффектом. На модели острого психологического стресса у крыс представлены данные, указывающие на регуляцию серотонином экспрессии BDNF [33].

Число известных сегодня миокинов таково, что даже их перечисление многократно превысит разрешаемые журналами объемы статей. Поэтому ограничившись представленным выше скудным списком конкретных миокинов, попытаюсь изложить современное понимание значения этих веществ в медицине. Прибегну к традиционному приему — помощи классика. В учении о миокинах это сделать легко — здесь приоритет и авторитет В.К. Pedersen общеизвестны и неоспоримы. В конце 2015 г. он в соавторстве с В. Saltin опубликовал большую (72 страницы) статью: «Упражнения как лекарства — основания рекомендовать физические нагрузки для лечения 26 различных хронических болезней» [34]. В числе болезней названы практически все современные незаразные пандемии: депрессия, тревожность, стресс, шизофрения, деменция, болезнь Паркинсона, множественный склероз, ожирение, гиперлипидемия, метаболический синдром, синдром поликистозных яичников, диабет 1 и 2 типа, гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность, инсульт, хроническая обструктивная болезнь легких, астма, муковисцидоз, остеоартрит, остеопороз, ревматоидный артрит, рак. Авторы приводят данные по патогенезу болезней, имеющие сведения о терапевтическом действии нагрузок, обсуждают доказанные и предполагаемые меха-

низмы такого действия, показания и противопоказания назначения нагрузок, сопоставляются данные о количественных и качественных характеристиках нагрузок и полученных результатах лечения и дают конкретные рекомендации по программе упражнений соответственно состоянию пациента. Приведенным выше списком заболеваний, включающим, почти всю неинфекционную патологию человека, облегчаемую и устраняемую движением, убедительно выражено медицинское значение миокинов.

Впечатление от названия и первой страницы этой статьи (с вышеприведенным списком болезней), ещё до прочтения всего текста, озадачивает читателя, привыкшего к интерьеру современных аптек — арсенала медицины. Как можно тысячи этих красивых и дорогих коробочек заменить парой ржавых гантелей? Но напоминая себе, что Вселенная это «всего лишь» материя и движение, заставляет принимать статью вполне серьёзно.

### Литература

1. Furrer R., Handschin C. Muscle wasting diseases: novel targets and treatments. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2018; 59 315–39.
2. Pilegaard H., Saltin B., Neufer P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 $\alpha$  gene in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 2003; 546: 851–8.
3. 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.
4. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$ , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem.* 2003; 278: 45777–84.
5. Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen T L, MacLean DA, and Pedersen BK. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol.* 1997 Mar 15; 499(Pt 3): 833–41.
6. Nehlsen-Canarella SL, Fagoaga OR, Nieman DC. Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol* 1997, 82: 1662–7.
7. Ostrowski K., Schjerling P., Pedersen B.K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans—effect of intensity of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2000; 83 512–5.
8. Pedersen BK. IL-6 signalling in exercise and disease. *Biochem Soc Trans.* 2007; 035: 1295–7.
9. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008; Oct; 88(4): 1379–406.
10. Starkie RL, Rolland J, Angus DJ, Anderson MJ, Febbraio MA. Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF- $\alpha$  levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280: C769–C774.
11. Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Pedersen B.K. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal

- muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol.* 2000 Nov 15; 529(Pt 1): 237–42.
12. Nybo L, Nielsen B, Pedersen BK, Møller K, Secher NH. Interleukin-6 release from the human brain during prolonged exercise. *J Physiol.* 2002 Aug 1; 542(Pt 3): 991–5.
  13. Rasmussen P, Vedel JC, Olesen J, Adser H, Pedersen MV, Hart E et al. In humans IL-6 is released from the brain during and after exercise and paralleled by enhanced IL-6 mRNA expression in the hippocampus of mice. *Acta Physiol (Oxf).* 2011 Apr; 201(4): 475–82.
  14. Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J.* 2013 Sep; 280(17): 4131–48.
  15. Pedersen, B.K. and Febbraio, M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* 2008; 88: 1379–406.
  16. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature.* 1997; 387: 83–90.
  17. Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.* 2007 May 25; 3(5): e79.
  18. Schuelke M, Wagner K, Stolz L, Hübner C, Riebel T, Kömen W et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med.* 2004 Jun 24; 350(26): 2682–8.
  19. Lee S.J., Lee Y.S., Zimmers T.A., Soleimani A., Matzuk M.M., Tsuchida K. et al. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol Endocrinol.* 2010; Oct; 24(10): 1998–2008.
  20. White T.A., LeBrasseur N.K. Myostatin and sarcopenia: opportunities and challenges - a mini-review. *Gerontology.* 2014; 60(4): 289–93.
  21. Kanzleiter T, Rath M, Görgens SW, Jensen J, Tangen DS, Kolnes AJ et al. The myokine decorin is regulated by contraction and involved in muscle hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Jul 25; 450(2): 1089–94.
  22. Horváth Z, Reszegi A, Szilák L, Dankó T, Kovalszky I, Baghy K. Tumor-specific inhibitory action of decorin on different hepatoma cell lines. *Cell Signal.* 2019 Oct; 62: 109354.
  23. Chouhan G, Moakes RJA, Esmaili M3, Hill LJ, deCogan F, Hardwicke J et al. A self-healing hydrogel eye drop for the sustained delivery of decorin to prevent corneal scarring. *Biomaterials.* 2019 Jul; 210: 41–50. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.04.013. Epub 2019 Apr 20.
  24. Jia X, Chen C, Chen L, Yu C, Kondo T Decorin as a prognostic biomarker in patients with malignant peripheral nerve sheath tumors. *Oncol Lett.* 2019 Mar; 17(3): 3517–22.
  25. Matthews V B., Astrom M.B., Chan M.H., Bruce C.R., Krabbe K.S., Prelovsek O., et al. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 2009; 52 1409–14183522.
  26. Clow C., Jasmin B. J. Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration. *Mol. Biol. Cell* 2010; 21 2182–2190.
  27. Benarroch, E.E. Brain derived neurotrophic factor: Regulation, effects, and potential clinical relevance. *Neurology,* 2015; 84: 1693–704.
  28. Håkansson K, Ledreux A, Daffner K, Terjestam Y, Bergman P, Carlsson R et al. BDNF Responses in Healthy Older Persons to 35 Minutes of Physical Exercise, Cognitive Training, and Mindfulness: Associations with Working Memory Function. *J Alzheimers Dis.* 2017; 55(2): 645–65.
  29. Erickson K.I., Voss M.W., Prakash R.S., Basak C., Szabo A., Chaddock L., et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108: 3017–30227.
  30. Müller P, Rehfeld K, Schmicker M, Hökelmann A, Dordevic M, Lessmann V et al. Evolution of Neuroplasticity in Response to Physical Activity in Old Age: The Case for Dancing. *Front Aging Neurosci.* 2017; Mar 14; 9: 56.
  31. Douka S, Zilidou VI, Lilou O, Manou V Traditional Dance Improves the Physical Fitness and Well-Being of the Elderly. *Front Aging Neurosci.* 2019; Apr 5; 11:75.
  32. Давыдова Т.В., Ветрилэ Л.А., Невидимова Т.И., Ветлугина Т.П., Фомина В.Г., Батухтина Е.И. и др. Антитела к нейромедиаторам – возможные биомаркеры предрасположенности к аддиктивному поведению. *Патогенез.* 2014; (3): 16–9.
  33. De-guo Jiang, Shi-li Jin, Gong-ying Li, Qing-qing Li, Zhi-ruo Li, Hong-xia Ma et al. Serotonin regulates brain-derived neurotrophic factor expression in select brain regions during acute psychological stress. *Neural Regen Res.* 2016; Sep; 11(9): 1471–9.
  34. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports.* 2015 Dec; 25 Suppl 3: 1–72.

## References

1. Furrer R., Handschin C. Muscle wasting diseases: novel targets and treatments. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2018; 59: 315–39.
2. Pilegaard H., Saltin B., Neuffer P.D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 $\alpha$  gene in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 2003; 546: 851–8.
3. Lukyanova L.D. Current issues of adaptation to hypoxia. Signal mechanisms and their role in system regulation. *Patologicheskaya Fiziolgiya i Eksperimental'naya terapiya [Pathological physiology and experimental therapy].* 2011; 1: 3–19. (in Russian)
4. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$ , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem.* 2003; 278: 45777–84.
5. Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, MacLean DA, and Pedersen BK. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol.* 1997 Mar 15; 499(Pt 3): 833–41.
6. Nehlsen-Canarella SL, Fagoaga OR, Nieman DC. Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol.* 1997; 82: 1662–7.
7. Ostrowski K., Schjerling P., Pedersen B. K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans—effect of intensity of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2000; 83: 512–5.
8. Pedersen BK. IL-6 signalling in exercise and disease. *Biochem Soc Trans.* 2007; 035: 1295–7.
9. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008; Oct; 88(4): 1379–406.
10. Starkie RL, Rolland J, Angus DJ, Anderson MJ, Febbraio MA. Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF- $\alpha$  levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280: 769–74.

11. Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Pedersen B. K. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol*. 2000 Nov 15; 529(Pt 1): 237–42.
12. Nybo L, Nielsen B, Pedersen BK, Møller K, Secher NH. Interleukin-6 release from the human brain during prolonged exercise. *J Physiol*. 2002 Aug 1; 542(Pt 3): 991–5.
13. Rasmussen P, Vedel JC, Olesen J, Adser H, Pedersen MV, Hart E et al. In humans IL-6 is released from the brain during and after exercise and paralleled by enhanced IL-6 mRNA expression in the hippocampus of mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011 Apr; 201(4): 475–82.
14. Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J*. 2013 Sep; 280(17): 4131–48.
15. Pedersen, B.K. and Febbraio, M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev*. 2008; 88, 1379–406.
16. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature*. 1997; 387: 83–90.
17. Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellers CS, Parker HG et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet*. 2007 May 25; 3(5): e79.
18. Schuelke MI, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*. 2004 Jun 24; 350(26): 2682–8.
19. Lee S.J., Lee Y.S., Zimmers T.A., Soleimani A., Matzuk M.M., Tsuchida K. et al. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol Endocrinol*. 2010; Oct; 24(10): 1998–2008.
20. White T.A., LeBrasseur N.K. Myostatin and sarcopenia: opportunities and challenges - a mini-review. *Gerontology*. 2014; 60(4): 289–93.
21. Kanzleiter T, Rath M, Görgens SW, Jensen J, Tangen DS, Kolnes AJ et al. The myokine decorin is regulated by contraction and involved in muscle hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jul 25; 450(2): 1089–94.
22. Horváth Z, Reszegi A, Szilák L, Dankó T, Kovalszky I, Baghy K. Tumor-specific inhibitory action of decorin on different hepatoma cell lines. *Cell Signal*. 2019 Oct; 62: 109354.
23. Chouhan G, Moakes RJA, Esmaeili M3, Hill LJ, deCogan F, Hardwicke J et al. A self-healing hydrogel eye drop for the sustained delivery of decorin to prevent corneal scarring. *Biomaterials*. 2019 Jul; 210: 41–50. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.04.013. Epub 2019 Apr 20.
24. Jia X, Chen C, Chen L, Yu C, Kondo T Decorin as a prognostic biomarker in patients with malignant peripheral nerve sheath tumors. *Oncol Lett*. 2019 Mar; 17(3): 3517–22.
25. Matthews V. B., Astrom M. B., Chan M. H., Bruce C. R., Krabbe K. S., Prelovsek O., et al. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*. 2009; 52 1409–14183522.
26. Clow C., Jasmin B.J. Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration. *Mol. Biol. Cell*. 2010; 21: 2182–90.
27. Benarroch, E.E. Brain derived neurotrophic factor: Regulation, effects, and potential clinical relevance. *Neurology*. 2015; 84: 1693–704.
28. Håkansson K, Ledreux A, Daffner K, Terjestam Y, Bergman P, Carlsson R et al. BDNF Responses in Healthy Older Persons to 35 Minutes of Physical Exercise, Cognitive Training, and Mindfulness: Associations with Working Memory Function. *J Alzheimers Dis*. 2017; 55(2): 645–65.
29. Erickson K.I., Voss M.W., Prakash R.S., Basak C., Szabo A., Chaddock L., et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108; 3017–30227.
30. Müller P, Rehfeld K, Schmicker M, Hökelmann A, Dordevic M, Lessmann V et al. Evolution of Neuroplasticity in Response to Physical Activity in Old Age: The Case for Dancing. *Front Aging Neurosci*. 2017; Mar 14; 9: 56.
31. Douka S, Zilidou VI, Lilou O, Manou V Traditional Dance Improves the Physical Fitness and Well-Being of the Elderly. *Front Aging Neurosci*. 2019; Apr 5; 11: 75.
32. Davydova T.V., Vetrile L.A., Nevidimova T.I., Vetlugina T.P., Fomina V.G., Batukhtina E.I. et al. Antibodies to neuromediators – possible biomarkers to addictive behavior. *Patogenes [Pathogenesis]*. 2014; 12(3): 16–9. (In Russian)
33. De-guo Jiang, Shi-li Jin, Gong-ying Li, Qing-qing Li, Zhi-ruo Li, Hong-xia Ma et al. Serotonin regulates brain-derived neurotrophic factor expression in select brain regions during acute psychological stress. *Neural Regen Res*. 2016; Sep; 11(9): 1471–9.
34. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports*. 2015 Dec; 25 Suppl 3: 1–72.

**Сведения об авторах:**

**Пальцин Александр Александрович**, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. НИИОПП; проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО, лауреат Государственной премии СССР.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Цибульников С.Ю.<sup>1</sup>, Горбунов А.С.<sup>1</sup>, Прокудина Е.С.<sup>1</sup>, Семенцов А.С.<sup>1</sup>, Нестеров Е.А.<sup>2</sup>, Маслов Л.Н.<sup>1</sup>

## Мелатонин и его роль в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,

634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

**Цель** обзора – анализ публикаций, посвященных кардиопротекторным эффектам мелатонина в условиях ишемии/реперфузии сердца в эксперименте и клинике. Эксперименты в анализируемых статьях проводились на крысах с коронароокклюзией и реперфузией. Некоторые исследования выполнялись на изолированном перфузируемом сердце крысы, которое подвергали ишемии/реперфузии. Для блокады рецепторов мелатонина использовался Лузиндол. Клинические исследования проводились на пациентах с острым инфарктом миокарда с подъёмом сегмента ST и чрескожным коронарным вмешательством. Мелатонин вводился внутривенно. Размер инфаркта оценивался по уровню креатинкиназы-МВ, тропонина Т и с помощью магнитно-резонансной томографии. Кроме того, клинические исследования выполнялись на пациентах с коронарным шунтированием. В экспериментальных работах доказывается, что мелатонин повышает толерантность сердца к ишемии/реперфузии: способствует уменьшению соотношения зона инфаркта/область риска, оказывает антиапоптотический эффект, улучшает насосную функцию сердца во время реперфузии, обеспечивает антиаритмический эффект, снижает интенсивность окислительного стресса. Многие из этих эффектов связаны с активацией  $M_1$ - и  $M_2$ -рецепторов. В клинических исследованиях обосновывается, кардиопротекторное действие мелатонина у пациентов с коронарным шунтированием. Данные об эффективности мелатонина у пациентов с острым инфарктом миокарда противоречивы. **Заключение.** Вопрос о клинической эффективности мелатонина требует дальнейшего изучения.

**Ключевые слова:** мелатонин; сердце; ишемия; реперфузия.

**Для цитирования:** Цибульников С.Ю., Горбунов А.С., Прокудина Е.С., Семенцов А.С., Нестеров Е.А., Маслов Л.Н. Мелатонин и его роль в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 142-146.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.142-146

**Для корреспонденции:** Маслов Леонид Николаевич, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант 18-75-00001. Раздел, посвященный клиническим наблюдениям, выполнен в рамках государственного задания АААА-А15-115120910024-0.

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

**Поступила** 17.01.2019

**Принята к печати** 16.01.2019

**Опубликована** 25.02.2020

Tsibulnikov S.Yu.<sup>1</sup>, Gorbunov A.S.<sup>1</sup>, Prokudina E.S.<sup>1</sup>, Sementsov A.S.<sup>1</sup>, Nesterov E.A.<sup>2</sup>, Maslov L.N.<sup>1</sup>

## MELATONIN AND ITS ROLE IN REGULATION OF HEART RESISTANCE TO ISCHEMIA AND REPERFUSION

<sup>1</sup>Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Kievskaya Str. 111A, Tomsk 634012, Russia;<sup>2</sup>Tomsk Polytechnic University;

Prospekt Lenina 30, Tomsk 634050, Russia

**The aim** was to analyze publications addressing the cardioprotective effects of melatonin in ischemia/reperfusion of the heart. Experiments in the analyzed reports were performed on rats with coronary artery occlusion and reperfusion. Some studies were performed on isolated, perfused rat hearts subjected to ischemia/reperfusion. Luzindole was used to antagonize melatonin receptors. Clinical studies were conducted on patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction who underwent a percutaneous coronary intervention. Melatonin was administered intravenously. Infarct size was estimated by concentrations of creatine kinase-MB and troponin T and also using magnetic resonance imaging. In addition, clinical studies were performed on patients with coronary artery bypass surgery. Melatonin increased the heart tolerance to ischemia/reperfusion by providing a decrease in the infarct size/area at risk ratio; exerting an antiapoptotic effect; improving the heart pumping function during reperfusion;

exerting an antiarrhythmic effect; and reducing the intensity of oxidative stress. Many of these effects were associated with activation of  $M_1$  and  $M_2$  receptors. Melatonin proved cardioprotective in patients with coronary artery bypass grafting. Data on the effectiveness of melatonin in patients with acute myocardial infarction are inconsistent. **Conclusion** The question of the clinical efficacy of melatonin requires further study.

**Keywords:** melatonin; heart; ischemia; reperfusion.

**For citation:** Tsibulnikov S.Yu., Gorbunov A.S., Prokudina E.S. Sementsov A.S., Nesterov E.A., Maslov L.N. Melatonin and its role in regulating heart resistance to ischemia and reperfusion. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 142-146. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.142-146

**Acknowledgements.** The study was supported by the Russian Scientific Foundation grant 18-75-00001. The section of clinical studies was a part of the government-supported project AAAA-A15-115120910024-0.

**For correspondence:** **Leonid N. Maslov**, Professor, Head of Laboratory Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; ul. Kievskaya, 111A, 634012, Russia, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

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

**Acknowledgement.** The work was supported by the Russian Science Foundation, Grant 18-75-00001. Section devoted to clinical observations, is carried out within the framework of state task AAAA-A15-115120910024-0.

#### Information about authors:

Tsibulnikov S.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-1534-2516>

Gorbunov A.S., <http://orcid.org/0000-0002-5890-071X>

Prokudina E.S. <http://orcid.org/0000-0002-1991-6516>

Sementsov A.S., <http://orcid.org/0000-0002-6991-4930>

Nesterov E.A., <http://orcid.org/0000-0001-9138-6700>

Maslov L.N., <http://orcid.org/0000-0002-6020-1598>

**Received** 17.01.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 02.2020

## Введение

Мелатонин (5-метокси-N-ацетилтриптамин) — основной гормон эпифиза, секреция которого подчиняется циркадным ритмам [1]. Главным источником циркулирующего в крови мелатонина является эпифиз (пинеальная железа) [1, 2]. Мелатонин был впервые экстрагирован из эпифиза в 1958 г. А.В. Lerner и соавт. [3]. Мелатонин секретируется преимущественно в ночное время, его концентрация в сыворотке крови ночью в 30 раз больше, чем днём [4]. Секреция мелатонина регулируется эндогенными осцилляциями в *n. suprachiasmatic*, которые зависят от дневных и сезонных изменений продолжительности освещения [5].

Установлено, что мелатонин взаимодействует с G-белок-сопряженными рецепторами:  $M_1$  и  $M_2$  [6, 7]. Кроме того, он может взаимодействовать с ретиноидными рецепторами RZR/ROR (retinoid-related orphan nuclear hormone receptor family) [6, 8].  $M_1$ -рецептор сопряжен с  $G_q$ -белком, его активация приводит к повышению активности фосфолипазы C, протеинкиназы C, PI3-киназы [9]. Указанные киназы обеспечивают повышение устойчивости сердца к действию ишемии-реперфузии [10, 11].  $M_2$ -рецептор сопряжен с  $G_i$ -белком, его стимуляция приводит к повышению активности протеинкиназы C [9]. Активация обоих рецепторов приводит к снижению активности аденилатциклазы

и уменьшению уровня цАМФ в клетке [9]. G-белок-сопряженные рецепторы мелатонина обнаружены в миокарде [12]. Показано, что  $M_2$ -рецептор мРНК присутствует в коронарных артериях и в миокарде [13]. Транскрипты, кодирующие  $M_1$ -рецептор, обнаружены в коронарных артериях человека [14].

Кардиоваскулярные эффекты мелатонина могут быть не связаны с активацией рецепторов. Установлено, что мелатонин является «ловушкой» гидроксильных радикалов [15], поэтому его влияние на сердце и сосуды может быть следствием его антиоксидантных свойств.

*Кардиопротекторный эффект мелатонина в экспериментальных исследованиях.* Установлено, что удаление эпифиза за 2 мес до коронароокклюзии способствует увеличению соотношения зона инфаркта/область риска (ЗИ/ОР) на 44% по сравнению с группой контроля [16], где зона риска — зона ишемии/реперфузии. Введение животным с удалённым эпифизом мелатонина (4 мг/кг) способствовало восстановлению толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии. Мелатонин в дозе 4 мг/кг не влиял на чувствительность сердца к ишемии/реперфузии у крыс с интактным эпифизом [16]. В исследовании, выполненном на крысах с коронароокклюзией (30 мин) и реперфузией

(120 мин) было показано, что внутривенное введение мелатонина (10 мг/кг) за 10 мин до ишемии способствует уменьшению на 30% соотношения ЗИ/ОР [17]. После ишемии/реперфузии уровень малонового диальдегида (МДА) увеличивался почти в 3 раза. После инъекции мелатонина ишемия/реперфузия не влияла на уровень МДА в миокарде. Авторы заключили, что инфаркт-лимитирующий эффект мелатонина связан с его антиоксидантными свойствами [17]. Кардиопротекторный эффект мелатонина подтверждают исследования, выполненные на изолированном сердце. Мелатонин (10 мг/кг) вводили крысам внутрибрюшинно за 30 мин до изоляции сердца [18]. Сердце приобретало устойчивость к действию региональной ишемии: (1) снижалась длительность желудочковой тахикардии и фибрилляции; (2) размер инфаркта уменьшался в 2 раза. Однако улучшения насосной функции сердца во время реперфузии обнаружить не удалось [18]. Способность мелатонина оказывать инфаркт-лимитирующий эффект у крыс, мышей и свиней подтверждают и другие исследования [19-21]. Изолированные перфузируемые по Лангендорфу сердца подвергали глобальной ишемии (45 мин) и реперфузии (60 мин). Мелатонин (5  $\mu$ М) добавляли в перфузионный раствор перед воспроизведением ишемии [22]. Мелатонин улучшал восстановление насосной функции сердца в реперфузионном периоде: по сравнению с контролем увеличивалось давление, развиваемое левым желудочком; повышалась скорость сокращения левого желудочка. Однако мелатонин не влиял на размер инфаркта [22]. Ингибитор киназы JAK AG490 полностью устранял инотропный эффект мелатонина, что позволило авторам утверждать, что защитный эффект мелатонина связан с активацией JAK. В 2014 г. была опубликована статья, авторы которой попытались оценить роль  $M_1$ - и  $M_2$ -рецепторов в инфаркт-лимитирующем эффекте мелатонина [23]. Мелатонин (10 мг/кг) вводили ежедневно внутрибрюшинно в течение 7 сут, последнюю инъекцию (15 мг/кг) осуществляли за 15 мин до реперфузии. Неселективный антагонист  $M_1$ - и  $M_2$ -рецепторов лузиндол вводили ежедневно в течение 7 сут, последнюю инъекцию (2 мг/кг) делали за 20 мин до реперфузии. Оказалось, что мелатонин способствовал уменьшению соотношения ЗИ/ОР примерно на 30%, фракция выброса левого желудочка во время реперфузии увеличивалась приблизительно на 30%, апоптотический индекс снижался по сравнению с группой контроля (ишемия/реперфузия). В сердце, подвергнутом ишемии/реперфузии, наблюдалось увеличение в 4 раза продукции супероксидных радикалов, уровень МДА повышался в 4 раза, активность супероксиддис-

мутазы снижалась в 2 раза. Мелатонин в значительной мере уменьшал эти негативные проявления коронароокклюзии и реперфузии [23]. Лузиндол устранял инотропный, инфаркт-лимитирующий и антиапоптотический эффект мелатонина. Эти данные указывают на то, что кардиопротекторный эффект мелатонина был связан с активацией  $M_1$ - и  $M_2$ -рецепторов. В 2018 г. было показано, что мелатонин и агонист рецепторов мелатонина рамелтеон оказывают инфаркт-лимитирующий эффект [24]. Лузиндол устранял инфаркт-лимитирующий эффект как мелатонина, так и рамелтеона.

Следует отметить, что не всем исследователям удалось подтвердить инфаркт-лимитирующий эффект мелатонина. В исследовании, выполненном на кроликах с коронароокклюзией (30 мин) и реперфузией (3 ч), мелатонин (10 мг/кг) вводили внутривенно за 15 мин до реперфузии [25]. В этом случае мелатонин не влиял на соотношение ЗИ/ОР. Возможно, что мелатонин действует преимущественно на ишемические повреждения сердца. Следует отметить, что в исследовании, выполненном на изолированном сердце крысы, также не удалось обнаружить влияние мелатонина на размер инфаркта [22].

Большинство представленных данных свидетельствуют о том, что мелатонин повышает толерантность сердца к ишемии/реперфузии: способствует уменьшению соотношения ЗИ/ОР, оказывает антиапоптотический эффект, улучшает насосную функцию сердца во время реперфузии, оказывает антиаритмический эффект, снижает интенсивность окислительного стресса. Многие из этих эффектов связаны с активацией  $M_1$ - и  $M_2$ -рецепторов.

*Кардиопротекторный эффект мелатонина в клинических исследованиях.* В 2015 г. были опубликованы результаты клинического исследования, которое включало 40 пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) с подъёмом сегмента ST и чрескожным коронарным вмешательством (ЧКВ), двадцать из них получали мелатонин (3 мг *per os*) перед ЧКВ [26]. Мелатонин способствовал снижению (на 40%) уровня кардиоспецифического маркера некроза креатинкиназы-МВ, достоверных изменений уровня другого маркера - тропонина T обнаружить не удалось [26]. Авторы заключили, что мелатонин оказывает кардиопротекторный эффект. Недостатком исследования является то, что оно не было слепым и плацебо-контролируемым. Не может не смущать слишком малая дозировка мелатонина (3 мг). В вышеупомянутых экспериментальных исследованиях использовали дозу 10 мг/кг и вводили препарат внутривенно или внутрибрюшинно. В исследование, выполненное в 2017 г., было включено 146



пациентов с ОИМ и подъёмом сегмента ST, которым проводилось ЧКВ [27]. Мелатонин вводили внутривенно (12 мг) и интракоронарно (2 мг) болюсом. Исследование было слепым, плацебо-контролируемым. Размер инфаркта оценивали через неделю после ЧКВ с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ). Оказалось, что мелатонин способствует уменьшению на 42% размера инфаркта [27]. Авторы заключили, что введение мелатонина пациентам с ОИМ ассоциирует с статистически значимым уменьшением размера инфаркта. Стоит отметить, что в более ранней публикации те же авторы сообщали, что мелатонин не оказывает инфаркт-лимитирующего эффекта у пациентов с ОИМ [28]. В том же году были опубликованы результаты клинического исследования, в которое были включены пациенты с ОИМ и подъёмом сегмента ST, которым проводилось ЧКВ [29]. Мелатонин вводили внутривенно и интракоронарно (суммарно 50 мг). Размер инфаркта оценивали с помощью МРТ и косвенно по уровню креатинкиназы МВ и тропонина Т. Мелатонин не оказывал эффекта ни на один из указанных показателей. Авторы заключили, что мелатонин не оказывает кардиопротекторного эффекта у пациентов с ОИМ. Клиническое исследование, выполненное на пациентах с коронарным шунтированием, показало, что приём мелатонина (10 мг или 20 мг) перед операцией способствует увеличению фракции выброса левого желудочка и снижению уровня тропонина I в плазме крови после операции [30].

Представленные данные о клинической эффективности мелатонина носят противоречивый характер. Подобные противоречия позволяют многим исследователям сомневаться в эффективности мелатонина в терапии ОИМ [31]. На наш взгляд, для окончательного решения вопроса об эффективности мелатонина при ОИМ необходимо многоцентровое исследование, которое разрешит все противоречия.

### Заключение

Таким образом, данные экспериментальных исследований свидетельствуют об инфаркт-лимитирующих свойствах мелатонина при введении перед коронароокклюзией. Вопрос о том, может ли мелатонин избирательно предупреждать реперфузионное повреждение сердца, остаётся открытым. Перспективными представляются исследования с использованием ингибиторов киназ, NO-синтазы, АТФ-чувствительных  $K^+$ -каналов. Они могли бы помочь составить целостную картину о молекулярном механизме кардиопротекторного действия мелатонина. Исследования на изолированных кардиомиоцитах также могли бы по-

мочь в поисках молекулярной мишени мелатонина. Клинические исследования свидетельствуют о том, что мелатонин оказывает кардиопротекторный эффект у пациентов с коронарным шунтированием. Вопрос об эффективности применения мелатонина у пациентов с ОИМ требует дальнейшего изучения, поскольку требуются многоцентровые исследования для окончательной оценки клинической эффективности мелатонина.

### Литература

#### (п.п. 1; 3-31 см. References)

2. Арушанян Э.Б. Щетинин Е.В. Мелатонин как универсальный модулятор любых патологических процессов. *Пат. физиол. экстр. тер.* 2016; 60(1): 79-88.

### References

1. Minneman K.P., Wurtman R.J. The pharmacology of the pineal gland. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1976; 16: 33-51.
2. Arushanyan E.B., Shchetinin E.V. Melatonin as a universal modulator of any pathological processes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2016; 60(1): 79-88.
3. Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H., Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 1958; 80: 2587.
4. Zisapel N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *Br. J. Pharmacol.* 2018; 175(16): 3190-9.
5. Liu J., Clough S.J., Hutchinson A.J., Adamah-Biassi E.B., Popovska-Gorevski M., Dubocovich M.L. MT1 and MT2 melatonin receptors: a therapeutic perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2016; 56: 361-83.
6. Hardeland R., Cardinali D.P., Srinivasan V., Spence D.W., Brown G.M., Pandi-Perumal S.R. Melatonin – a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol.* 2011; 93(3): 350-84.
7. Jockers R., Delagrange P., Dubocovich M.L., Markov R.P., Renault N., Tosini G. et al. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *Br. J. Pharmacol.* 2016; 173(18): 2702-25.
8. Pandi-Perumal S.R., BaHammam A.S., Ojike N.I., Akinseye O.A., Kendzerska T., Buttoo K. et al. Melatonin and human cardiovascular disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2016; 22(2): 122-32.
9. Cecon E., Oishi A., Jockers R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. *Br. J. Pharmacol.* 2017; 175: 3263-80.
10. Cohen M.V., Downey J.M. Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: historical perspective and lessons for the future. *Br. J. Pharmacol.* 2015; 172(8): 1913-3192.
11. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ. Res.* 2015; 116(4): 674-99.
12. Pang C.S., Tang P.L., Song Y., Brown G.M., Pang S.F. 2-[<sup>125</sup>I] Iodomelatonin binding sites in quail heart: characteristics, distribution and modulation by guanine nucleotides and cations. *Life Sci.* 1996; 58(13): 1047-57.
13. Ekmekcioglu C., Thalhammer T., Humpeler S., Mehrabi M.R., Glogar H.D., Hölzenbein T. et al. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *J. Pineal. Res.* 2003; 35(1): 0-44.

14. Ekmekcioglu C., Haslmayer P., Philipp C., Mehrabi M. R., Glogar H. D., Grimm M. et al. Expression of the MT1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 2001; 21(1): 85-91.
15. Bandyopadhyay D., Biswas K., Bandyopadhyay U., Reiter R.J., Banerjee R.K. Melatonin protects against stress-induced gastric lesions by scavenging the hydroxyl radical. *J. Pineal. Res.* 2000; 29(3): 143-51.
16. Sahna E., Acet A., Ozer M.K., Olmez E. Myocardial ischemia-reperfusion in rats: reduction of infarct size by either supplemental physiological or pharmacological doses of melatonin. *J. Pineal. Res.* 2002; 33(4): 234-8.
17. Sahna E., Parlakpınar H., Turkoz Y., Acet A. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion induced infarct size and oxidative changes. *Physiol. Res.* 2005; 54(5): 491-5.
18. Lagneux C., Joyeux M., Demenge P., Ribuot C., Godin-Ribuot D. Protective effects of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Life Sci.* 2000; 66(6): 503-9.
19. Deniz E., Sahna E., Aksulu H. E. Nitric oxide synthase inhibition in rats: melatonin reduces blood pressure and ischemia/reperfusion-induced infarct size. *Scand. Cardiovasc. J.* 2006; 40(4): 248-52.
20. Chen Z., Chua C.C., Gao J., Hamdy R.C., Chua B.H. Protective effect of melatonin on myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 284(5): H1618-H1624.
21. Ekeløf S.V., Halladin N.L., Jensen S.E., Zaremba T., Aarøe J., Kjærgaard B. et al. Effects of intracoronary melatonin on ischemia-reperfusion injury in ST-elevation myocardial infarction. *Heart Vessels.* 2016; 31(1): 88-95.
22. Yang Y., Duan W., Jin Z., Yi W., Yan J., Zhang S. et al. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Pineal. Res.* 2013; 55: 275-86.
23. Yu L., Sun Y., Cheng L., Jin Z., Yang Y., Zhai M. et al. Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of SIRT1. *J. Pineal. Res.* 2014; 57(2): 228-38.
24. Stroethoff M., Behmenburg F., Spittler K., Raupach A., Heinen A., Hollmann M. W. et al. Activation of melatonin receptors by ramelteon induces cardioprotection by postconditioning in the rat heart. *Anesth. Analg.* 2018; 126(6): 2112-5.
25. Dave R.H., Hale S.L., Kloner R.A. The Effect of melatonin on hemodynamics, blood flow, and myocardial infarct size in a rabbit model of ischemia-reperfusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 1998; 3(2): 153-60.
26. Ghaeli P., Vejdani S., Ariamanesh A., Hajhossein Talasaz A. Effect of melatonin on cardiac injury after primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *Iran J. Pharm. Res.* 2015; 14(3): 851-5.
27. Dominguez-Rodriguez A., Abreu-Gonzalez P., de la Torre-Hernandez J.M., Consuegra-Sanchez L., Piccolo R., Gonzalez-Gonzalez J. et al. Usefulness of early treatment with melatonin to reduce infarct size in patients with ST-segment elevation myocardial infarction receiving percutaneous coronary intervention (from the Melatonin Adjunct in the Acute Myocardial Infarction Treated With Angioplasty Trial). *Am. J. Cardiol.* 2017; 120(4): 522-6.
28. Dominguez-Rodriguez A., Abreu-Gonzalez P., de la Torre-Hernandez J.M., Gonzalez-Gonzalez J., Garcia-Camarero T., Consuegra-Sanchez L. et al. Effect of intravenous and intracoronary melatonin as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction: Results of the Melatonin Adjunct in the acute myocardial infarction treated with Angioplasty trial. *J. Pineal. Res.* 2017; 62(1).
29. Ekeløf S., Halladin N., Fonnes S., Jensen S. E., Zaremba T., Rosenberg J. et al. Effect of intracoronary and intravenous melatonin on myocardial salvage index in patients with ST-elevation myocardial infarction: a randomized placebo controlled trial. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2017; 10(5-6): 470-9.
30. Dwaich K.H., Al-Amran F.G., Al-Sheibani B.I., Al-Aubaidy H.A. Melatonin effects on myocardial ischemia-reperfusion injury: Impact on the outcome in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery. *Int. J. Cardiol.* 2016; 221: 977-86.
31. Hausenloy D.J., Garcia-Dorado D., Erik Bøtker H., Davidson S.M., Downey J., Engel F.B. et al. Melatonin as a cardioprotective therapy following ST-segment elevation myocardial infarction: is it really promising? *Reply. Cardiovasc. Res.* 2017; 113(11): 1418-9.

**Сведения об авторах:**

**Цибульников Сергей Юрьевич**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, e-mail: tsibulnikov1986@mail.ru;

**Горбунов Александр Сергеевич**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, e-mail: barabator@sibmail.com;

**Прокудина Екатерина Сергеевна**, канд. мед. наук, мл. науч. сотр., НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, e-mail: goddess27@mail.ru;

**Семенцов Андрей Сергеевич**, канд. мед. наук, мл. науч. сотр., НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, e-mail: hamkot@sibmail.com;

**Нестеров Евгений Александрович**, канд. тех. наук, науч. сотр., Физико-технический институт, Национальный исследовательский Томский политехнический университет, e-mail: nea@tpu.ru;

**Маслов Леонид Николаевич**, доктор мед. наук, проф., зав. лаб., НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 613.11:612.017.2

Ульяновская С.А., Баженов Д.В., Шестакова В.Г., Калинин М.Н.

## Влияние климатогеографических факторов Севера на адаптивные реакции организма человека

ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, 170100, г. Тверь, Россия, ул. Советская, д. 4

В обзоре анализируется влияние климатогеографических факторов Севера на адаптивные реакции организма человека с позиций патологической физиологии. Основа адаптационных перестроек организма на Севере заключается в расширении физиологической нормы реакций и референсных пределов отдельных эндокринных и метаболических показателей. При выходе за пределы видовой нормы происходит снижение резервных возможностей организма, что приводит к патологии. Важную роль при этом играют внутригодовые колебания уровня гормонов, связанные с фотопериодикой. Ритмическая организация физиологических процессов имеет приспособительный характер, так как способствует подготовке и адаптации организма к условиям внешней среды в целях сохранения гомеостаза. Сезонные ритмы влияют на структуру и функцию всех систем организма человека. Многие патологические процессы в организме сопровождаются развитием десинхронозов. Рассогласование ритмов функционирования организма сопровождается нарушением исходной хроноструктурной организации физиологических реакций, что приводит не только к изменениям показателей функции эндокринной системы, но и к структурным изменениям в органах. Вопросы, рассмотренные в обзоре, отражают важность учета особенностей климатогеографических факторов Севера, приводящих к возникновению выраженных сдвигов в функционировании и структуре органов. Подтверждением вышесказанному является выявленный нами дисбаланс, в виде парциальной гипоплазии внешнесекреторного аппарата поджелудочной железы на фоне выраженного развития эндокринного компонента железы и стромы, это рассматривается как предпосылка для развития патологии. Анализ литературы показал также, что длительно действующий стрессовый фактор приводит к морфологической перестройке органов с адаптивными модификациями структуры.

**Ключевые слова:** десинхроноз; световой стресс; адаптивные модификации; полярные области; фотопериодизм.

**Для цитирования:** Ульяновская С.А., Баженов Д.В., Шестакова В.Г., Калинин М.Н. Влияние климатогеографических факторов Севера на адаптивные реакции организма человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 147-154.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.147-154

**Для корреспонденции:** Ульяновская Светлана Александровна, e-mail: uyanovskayas@mail.ru

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

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

**Поступила** 01.07.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Ulyanovskaya S.A., Bazhenov D.V., Shestakova V.G., Kalinkin M.N.

### Effect of the climatic and geographic factors of the North on adaptive reactions of the human body

Tver State Medical University,  
Sovetskaya Str. 4, Tver 170100, Russia

Summary. The review analyzes effects of climatic and geographic factors of the North on adaptive reactions of the human body in terms of pathological physiology and morphology. **The aim** was to study adaptive reactions of the human body in the north to external factors, which include severe light and cold conditions. **Methods.** Analysis of current literature on the issue under study. **Results.** The adaptive rearrangement of the body in the North involves expanding physiological boundaries of individual endocrine and metabolic parameters. Beyond the normal limits of a species, the capacity of body reserve decreases, which may lead to a pathology. Of a great importance are intra-annual fluctuations of hormones associated with the photoperiodism. The rhythmic organization of physiological processes has an adaptive nature as it helps preparing and adapting the body to environmental conditions to maintain its homeostasis. Adaptive changes are known to occur not only at the level of physiological systems but also at the ultrastructural level. Seasonal rhythms affect the structure and function of all systems in the human body. Many pathological processes are associated with development of desynchronosis. Mismatching biorhythms under the action of exog-

enous or endogenous factors is accompanied by disorders in the original chronostructural organization of physiological functions, which may lead not only to endocrine shifts but also to structural changes in organs. The review addresses the importance of taking into account the features of climatic and geographical factors of the North, which may induce pronounced changes in the structure and function of organs. The above-said is supported by the established imbalance evident as partial hypoplasia of the pancreatic exocrine apparatus associated with a pronounced endocrine component of the gland and stroma. These disorders are considered a prerequisite for development of abnormalities and may underlie congenital pancreatic pathology, such as fibrosis and diabetes. **Conclusion.** Long-acting stress factors lead to morphological rearrangements of organs and adaptive modifications of their structure.

**Keywords:** desynchronization; light stress; adaptive modifications; polar regions; photoperiodism.

**For citation:** Ulyanovskaya S.A., Bazhenov D.V., Shestakova V.G., Kalinkin M.N. Effect of the climatic and geographic factors of the North on adaptive reactions of the human body. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 147-154. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.147-154

**For correspondence:** Svetlana A. Ulyanovskaya, Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Anatomy, 170100, Tver, ul. Sovetskaya, 4, Russia, e-mail: ulyanovskayas@mail.ru

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

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

**Information about authors:**

Ulyanovskaya S. A., <https://orcid.org/0000-0001-6600-4248>

Bazhenov D. V., <https://orcid.org/0000-0001-5160-7652>

Shestakova V. G., <https://orcid.org/0000-0003-1136-7396>

Kalinkin M. N., <https://orcid.org/0000-0001-5799-4147>

**Received** 01.07.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

Механизмы адаптации к условиям высоких широт представляют интерес для фундаментальной науки и практической медицины. Адаптивные реакции организма и их морфологический субстрат изучались в работах как отечественных, так и зарубежных морфологов, и физиологов [1-4].

*Влияние факторов Севера как предпосылка физиологических изменений организа.* По данным А.Б. Гудкова, О.Н. Поповой (2008) северные территории характеризуются суровыми климатогеографическими условиями, дискомфортными для проживания и трудовой деятельности. Выделяют специфические и неспецифические климатические факторы Севера. Специфическими для северных широт факторами считаются фотопериодизм, колебание атмосферного давления и электромагнитные факторы. Неспецифическими – холод, высокая влажность, тяжелый аэродинамический режим. Продолжительность светового дня на Севере значительно варьирует в течение года (полярная ночь и полярный день). Комплекс неблагоприятных факторов Севера оказывает непосредственное воздействие на организм через изменения его регуляторных систем [5].

Для регионов Севера характерно наличие перепадов влажности и температуры, частые колебания атмосферного давления, воздействие ветра. Согласно данным Н.П. Неверовой (1998), наиболее специфичными по физической природе и биологическим эффектам явля-

ются космические и геомагнитные возмущения [6]. Как указывает Ю.Г. Мизун (1995), на Севере наблюдаются очень интенсивные электромагнитные поля, напряженность которых растет с увеличением географической широты, вследствие большой проницаемости для рентгеновских и гамма-лучей, радиоволн высокой и низкой частоты, электронов, протонов, нейтронов, ионов. При повышении солнечной активности происходит усиленное излучение электромагнитных волн и выброс заряженных частиц, которые воздействуют на белки системы тканевого дыхания и цепи электронного транспорта (цитохромы, цитохромоксидазу, железосернистые белки и др.) [7]. По мнению А.П. Жуковского с соавторами (1995), это приводит к изменению скорости переноса электронов по дыхательной цепи, в результате чего изменяется синтез АТФ, вслед за чем развивается каскад физиологических реакций [8].

Территории Севера отличаются недостатком ультрафиолета, особенно выраженным в период биологических сумерек, при преобладании рассеянной ультрафиолетовой радиации. В 1958 году В.Н. Кричагин указывал на то, что период «биологической тьмы» наступает при снижении суммарной ультрафиолетовой радиации даже в околополуденные часы. Ультрафиолетовое голодание влияет на энергообеспеченность клеток организма человека. В зимний период активируются свободно-радикальные процессы, снижается

активность антиоксидантов, к которым относятся витамины С, Е, D [9].

Таким образом, понятно, что комплексное воздействие неблагоприятных факторов Севера вызывает выраженные изменения в функционировании анатомо-физиологических систем, что требует детального рассмотрения данного вопроса.

*Ритмическая организация физиологических процессов.* В современной литературе имеются публикации о том, что функционирование живого организма подчиняется «закону ритма» [10,11]. В последние десятилетия повышенное внимание уделяется изучению ритмической организации физиологических процессов организма в норме и патологии.

Отчетливо выражены ритмы с периодом 24 ч, названные Ф. Халбергом циркадианными. Суточный (24-часовой) ритм связан с вращением Земли вокруг оси. По аналогии с видимым светом ритмы с периодом более коротким, чем у циркадианных, названы ультрадианными, с более длинным — инфрадианными.

Циркадианную периодичность можно обнаружить в интегральных показателях жизнедеятельности: это и изменения работоспособности, церебральной и кардиальной гемодинамики, ортостатической устойчивости, сердечного цикла и дыхания, легочной вентиляции и потребления кислорода, а также функций системы пищеварения, концентрации макро- и микроэлементов, содержания аминокислот, медиаторов, половых гормонов, гормонов нейроэндокринной системы и др. [12]. Эти изменения обусловлены влиянием естественного освещения - фотопериодики. Циркадианная организация отражает генетически закрепленное приспособление организма к условиям жизни на Земле. Адаптация организма к условиям внешней среды необходима для поддержания его гомеостаза, чему способствует ритмическая организация физиологических процессов. Известно, что приспособительные перестройки происходят не только на уровне физиологических систем, но и на уровне ультраструктур клеток и тканей. По словам известного хронобиолога Г. фон Майерсбаха, микроскопическая структура клетки в течение суток изменяется до неузнаваемости [13].

Днем, в период активности, в организме увеличивается активность процессов потребления энергии, затрачиваемой на выполнение физической и умственной работы, при этом клетки, ткани, органы — «изнашиваются».

Ночью, во время отдыха, активно происходят процессы восстановления структур, деление клеток и организм восстанавливается. Параллельно с ритмическими изменениями функциональной активности систем ор-

ганов, изменяется их чувствительность к воздействию внешних факторов. Следовательно, циркадианные ритмы функций организма имеют эндогенную природу.

Другая точка зрения свидетельствует о наличии синхронизаторов биоритмов, то есть о подверженности циркадианных ритмов внешним периодическим влияниям. Таким синхронизатором является супрахиазматическое ядро гипоталамуса, деятельность которого зависит от смены света и темноты. В ряде исследований имеются указания на связь циркадианных ритмов организма с суточной периодичностью средовых факторов, что подтверждает мнение о внешней экзогенной природе этих ритмов.

Таким образом, можно прийти к заключению, что ритмичность первоначально возникает как результат периодических воздействий среды, а в дальнейшем закрепляется генетически, и в настоящее время ритмы генерируются внутренним механизмом, но период их синхронизируется с частотой внешних стимулов.

Фотопериодика Севера и изменения физиологических показателей.

Хронобиологические закономерности регуляции функций организма основаны на определенных фазовых взаимоотношениях между биоритмами синтеза и продукции регуляторных факторов и биоритмами рецепторного аппарата. Ситуации, приводящие к изменению ритмов жизнедеятельности (широтные перелеты, миграции в контрастные поясно-временные и климатические регионы и пр.), являются факторами риска для развития изменений, вызывающих нарушения в деятельности основных регуляторных систем организма (нервной и эндокринной). Большое значение в адаптивных реакциях играют внутригодовые колебания уровней гормонов, связанных с фотопериодикой [3].

Анализ современной литературы по проблеме показал наличие при адаптации сдвига физиологических границ ряда эндокринных и иммунологических показателей. По мнению ряда авторов, успешная адаптация к внешним факторам обусловлена адекватной реакцией центральной нервной и гипоталамо-гипофизарно-адренортикаральной систем [14-16]. При срыве адаптации снижаются резервные возможности организма, что приводит к развитию патологии [17].

Работа эндокринной системы наиболее сбалансирована в периоды увеличения продолжительности дня и максимальном световом дне. В период уменьшения длительности светового дня и во время полярной ночи развиваются дисрегуляторные эндокринно-метаболические расстройства. В каждом периоде года определяется специфический метаболический профиль, и наблюдаются особенности гуморальной регуляции. В

период с октября по декабрь у северян происходит активация системы гипофиз – кора надпочечников и гипофиз – щитовидная железа. Одновременно снижается активность эндокринного аппарата поджелудочной железы, что приводит к повышению в крови содержания сывороточных триглицеридов, атерогенных фракций липидов и снижению уровня жирных кислот.

А. Holubová и соавт. (2016) на экспериментальном материале определили, что активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы важна для поддержания гомеостаза во время стресса как у взрослых крыс, так и у их потомства, что важно для адаптации новорожденных крысят. Данные свидетельствуют о том, что долгосрочные неонатальные стрессоры приводят к снижению чувствительности рецепторов АКТГ в коре надпочечников, что может быть предпосылкой для адаптации к стрессу во взрослой жизни [18].

В период с марта по июнь наблюдается высокая активность системы гипофиз – кора надпочечников и некоторое снижение функции щитовидной и поджелудочной желез, что сопровождается активизацией процессов этерификации холестерина, нарастанием в крови уровней глюкозы и свободных жирных кислот.

Для жителей Севера характерно сокращение срочных компенсаторно-приспособительных резервов инсулярного аппарата, проявляющееся повышением в крови уровня инсулина и снижением содержания кортизола. В контрастные периоды года (декабрь и июнь) пониженная толерантность к глюкозе компенсируется за счёт повышения содержания в сыворотке крови уровня тиреотропного и тиреоидных гормонов [19].

По данным В.В. Лупачева (2009), среднее количество андрогенов в крови русских мужчин – постоянных жителей Севера статистически значимо ниже значений, характерных для мужчин, проживающих в умеренном поясе. Все сезоны года, за исключением осени, сопровождаются снижением уровня андрогенов в крови. Среднегодовое содержание липотропина у северян значимо выше такового у жителей средних широт. Усредненные значения фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) значительно ниже общепринятой нормы и составляют около 32 %. Таким образом, наблюдается общая тенденция к изменению гормонального профиля системы «гипофиз – гонады». Минимизация функции звена «фоллитропин – тестостерон» сочетается с отчетливыми признаками дисфункции гормоногенеза ЛГ. Наиболее высокие уровни тестостерона наблюдаются в периоды убывания и нарастания светового дня. Для периода полярного дня характерны минимальные показатели тестостерона [20].

Д.Г. Губин и соавт. (2006) указывают на то, что системная интеграция физиологических процессов у многоклеточных организмов осуществляется посредством двух «дирижеров». Ведущими признаны парные супрахиазматические ядра гипоталамуса (СХЯ). СХЯ функционально и морфологически тесно связаны с центром гуморальной регуляции – эпифизом, который осуществляет координацию циркадианной системы посредством мелатонина. Эпифиз – это не единственное место продукции мелатонина, но именно мелатонин эпифизарного происхождения является основным источником, определяющим концентрацию мелатонина в плазме, и регулируется фотопериодикой. Одним из косвенных механизмов влияния мелатонина на суточный ритм биологических процессов является его способность оказывать гипотермическое действие [21].

Д.Б. Демин (2005) утверждает, что препубертатный и начало пубертатного периода у мальчиков, проживающих в условиях Севера, характеризуется напряжением гипофизарно – надпочечниковой системы. Для пубертата свойственно усиление обменных процессов, с активацией центрального звена эндокринной регуляции. Проявляются анаболические эффекты тиреоидных гормонов, соматотропина, пролактина и инсулина, что приводит к увеличению роста-весовых показателей. Уровни значений пролактина и инсулина у мальчиков-подростков, выше, чем у мальчиков-подростков, проживающих в умеренных широтах [15, 16].

Зимне-весенний период – это своеобразный подготовительный этап в обеспечении организма запасами пластического материала, необходимого для активных метаболических процессов в летний период. Поддержание гомеостаза в это время обеспечивается за счет усиления продукции инсулина. В контрастные периоды года (декабрь, июнь) наблюдается максимальная активность мощного регулятора углеводного и белкового обменов, гормона адаптации кортизола. Наибольшим стимулятором адаптационных возможностей растущего детского организма к климатическим условиям Севера на юге Архангельской области является инсулин, на Севере – кортизол.

В ряде работ морфологов и клиницистов Северных регионов [22-26] отмечается влияние сезонности и фотопериодизма на становление и функционирование структур эндокринной и фето-плацентарной систем. Клиницистами были выявлены пики фертильности в течение календарного года у женщин Архангельской области, во время которых зачатие приводит к наиболее благоприятным исходам беременности. При протекании второй половины беременности в наиболее неблагоприятные для Заполярья месяцы года, совпа-

дающие с полярной ночью, у женщин, роды которых происходили в марте – апреле, чаще наблюдалась угроза прерывания беременности и развитие анемии. Снижение частоты осложнений беременности отмечено в июле–сентябре (в период полярного дня и смежного с ним периода белых ночей).

По мнению Р.В. Кубасова (2008), у жителей приполярных районов Северо-запада России имеются особенности сезонной динамики эндокринных функций. В период полярной ночи у местных жителей и коренных народностей содержание Т3 и Т4 выше, чем в период полярного дня. Имеются особенности годичных изменений уровней ТТГ и гормонов щитовидной железы у людей, живущих в сверхширотных зонах и на субарктических территориях. У мужчин, постоянно проживающих на территории Северной Финляндии в заполярье, минимальная концентрация свободного Т3 отмечена в феврале, а максимальная – в августе. Уровень ТТГ достигает максимума в декабре, а уровни общего и свободного Т4, а также общего Т3 не имеют выраженной сезонной ритмики. Определены сильные корреляционные связи уровня свободного Т3 и температуры воздуха, ТТГ и продолжительности светового дня, продолжительности светового дня и уровней гормонов щитовидной железы. Наблюдается окологодная динамика уровней гонадотропных гормонов (лютеотропный, фолликулостимулирующий гормоны), пролактина, половых стероидов (тестостерон, прогестерон, эстрадиол). По характеру изменений авторами выделены две группы гормонов с сопоставимой динамикой: в первую входят гонадотропные гормоны, пролактин и прогестерон. Их наибольшие концентрации определяются в период минимальной продолжительности светового дня (декабрь) и ее увеличения (март). Ко второй группе относятся тестостерон и эстрадиол, максимальное содержание которых определяется в период наибольшей продолжительности светового дня (июнь), а минимальное – в период наименьшей ее длительности (декабрь) [27].

Все вышеуказанное свидетельствует о том, на Севере формируется особый гормонально-метаболический профиль, характеризующий изменения, происходящие в системе гипофиз - периферические железы при воздействии факторов Севера.

*Морфологические проявления адаптации и десинхронозы.* По мнению Академика РАН Н.А. Агаджаняна (2013), здоровье человека представляет собой оптимальное соотношение взаимосвязанных эндогенных ритмов физиологических процессов и их соответствие внешним циклическим изменениям. Рассогласование циркадианных ритмов организма в результате действия экзогенных или эндогенных раздражителей сопровож-

дается десинхронозом – нарушением исходной хроноструктурной организации физиологических функций. Десинхроноз проявляется различными по характеру и степени выраженности вегетативными, иммунными, эндокринными нарушениями, расстройством деятельности сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной и других функциональных систем [17].

Практически все патологические процессы в организме проявляются нарушением временной организации физиологических функций, и в то же время рассогласование биоритмов может быть фоном для развития выраженных изменений деятельности организма. Если десинхронозы единичны, то организм через определенное время полностью восстанавливает свои функции.

По состоянию суточных ритмов физиологических функций можно судить об активности патологического процесса, поскольку степень проявления десинхроноза соответствует тяжести течения заболевания. По мнению Ф.И. Комарова (1989) многие патологические процессы в организме сопровождаются развитием десинхронозов. Десинхронозы наибольшее воздействие оказывают на эндокринные железы и поскольку эти железы принимают участие в росте и развитии организма, то морфологически это может проявляться либо ускорением, либо запаздыванием формирования органов и систем плода. Под действием факторов Севера изменяется функционирование всей системы гипофиз – периферические железы, в частности щитовидной железы, надпочечников, поджелудочной железы. Это является морфологической предпосылкой к развитию адаптивных реакций в северном варианте [11].

Морфологические изменения у лиц, проживающих в условиях Севера, являются областью интереса как отечественных, так и зарубежных ученых, данные вопросы изучаются как в эксперименте, так и в клинике. Длительное воздействие стрессирующих факторов Севера приводит к формированию адаптивных перестроек и северного адаптивного морфотипа. Влияние Севера на строение тела человека отражается сначала в функциональных перестройках, которые затем приводят к изменениям фенотипа популяции. Например, Ruff (1994) утверждал, что направленный отбор способствовал дифференциации большеберцовой кости, головки бедренной кости и ширины таза среди групп людей из разных географических регионов. Степень выраженности морфологических проявлений зависит от длительности проживания на севере [28-31].

В условиях Севера половое созревание (наиболее важный этап формирования функциональной активности женской половой системы), беременность и развитие плода происходит с значительными отличительны-

ми особенностями по сравнению с жителями других климатических поясов [32-34]. В связи с этим, актуальной является концепция пренатального стресса, подробно изложенная К.Н. Ковровым (1997), в которой особый интерес представляют фетопатии, проявляющиеся в различных анатомо-физиологических системах плода дисплазиями и нарушениями хронологии становления органов и тканей. Такие сдвиги, по мнению ряда авторов, являются результатом катаболической стадии стрессорной реакции, первоначально начинавшейся вышеуказанными адаптивными модификациями [35].

Выявленный в исследованиях морфологов дисбаланс проявляется парциальной гипоплазией внешне-секреторного аппарата поджелудочной железы на фоне достаточного развития эндокринного компонента железы и выраженного развития стромы. На ранних этапах онтогенеза человека процесс развития поджелудочной железы в Северном регионе характеризуется четко выраженной возрастной динамикой и отсутствием гендерных отличий [36].

Таким образом, указанные изменения в поджелудочной железе при патологически протекающей беременности являются предпосылкой для развития патологии в будущем и могут лечь в основу врожденных нарушений поджелудочной железы, таких как фиброз и сахарный диабет.

По данным V. Vukicevic и соавт. (2015) и С. Steenblock и соавт. (2017) надпочечник представляет собой высокопластичный орган, способный адаптировать гомеостаз тела к различным физиологическим потребностям [37]. С. Drelon и соавт. (2015) утверждают, что надпочечники играют важную роль в контроле гомеостаза натрия и воды, реакции стресса, воспаления и обмена веществ, путем секреции глюкокортикоидов и минералокортикоидов [38].

В исследованиях Kristen R. R. Savell, Benjamin M. Auerbach, Charles C. Roseman (2016) показано влияние климатических условий на формирование адаптивных признаков, что подтверждается взаимосвязью между климатом и морфологическими различиями среди населения. Ассоциации между признаками и географической широтой явились результатом отбора по каждому индивидуальному признаку. Хотя многие параметры демонстрируют характер ответов на направленный выбор, соответствующий экогеографическим гипотезам [39].

Модели изменения формы структур человеческого тела, по-видимому, соответствуют экогеографическим ожиданиям, изложенным Бергманом и Алленом (1847) [40, 41].

**Заключение.** Обобщение результатов исследований морфологов и клиницистов позволяет сделать заключе-

ние о том, что климатогеографические факторы Севера, основными среди которых являются холодовой фактор и световой стресс вызывают выраженные сдвиги в функционировании всех эндокринных желез, поджелудочной железы и надпочечников в частности. У людей, живущих на Севере, формируется особый гормонально-метаболический профиль, характеризующий изменения, происходящие в системе гипофиз – периферические железы. Ритмическая организация физиологических процессов способствует адаптации организма к условиям внешней среды. Приспособительные перестройки происходят не только на уровне физиологических систем, но и на уровне ультраструктур, клеток и тканей. Сезонные ритмы влияют на структуру и функцию всех систем организма человека. Многие патологические процессы в организме сопровождаются развитием десинхронозов. Подтверждением вышесказанному является выявленный нами дисбаланс, в виде парциальной гипоплазии внешне-секреторного аппарата поджелудочной железы на фоне выраженного развития эндокринного компонента железы и стромы, это рассматривается как предпосылка к развитию патологии в будущем и явиться основой врожденных нарушений поджелудочной железы. Длительно воздействующий стрессовый фактор приводит к морфологическим перестройкам органов и возникновению адаптивных модификаций структур органов.

#### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Ульяновская С.А., Баженов Д.В., Шестакова В.Г., Калинин М.Н.  
Сбор и обработка материала – Ульяновская С.А.  
Написание текста – Ульяновская С.А.  
Редактирование – Ульяновская С.А., Баженов Д.В., Шестакова В.Г., Калинин М.Н.

#### Литература

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Марачев А.Г., Милованов А.П. *Патология человека на Севере*. М.; Медицина, 1985.
2. Суханов С.Г. *Влияние факторов крайнего Севера на женскую репродуктивную систему*. 2013.
3. Ткачев А.В. Сезонная динамика эндокринных функций у человека на Севере. *Физиология человека*. 1987; 13(2): 328–30.
4. Ульяновская С.А., Суханов С.Г. Гипоплазия поджелудочной железы плодов и новорожденных Архангельской области как региональная особенность морфогенеза. В сб.: *Актуальные проблемы морфологии*. 2007; 137-40.
5. Гудков А.Б., Попова О.Н. Пульмонотропные факторы европейского Севера. *Физиология*. 2008; 2: 15-20.
6. Неверова Н.П. Активность электромагнитного поля Земли и здоровья человека в условиях Европейского Севера. *Экология человека*. 1998; 3: 21–4.



7. Мизун Ю.Г. Влияние гелиофизических факторов на организм человека в условиях Крайнего Севера. *Экология человека*. 1995; 1: 42–9.
8. Жуковский А.П., Петров Л.Н., Ровнов Н.В. Биофизический механизм воздействия магнитного поля на живые организмы. В сб.: *Проблемы охраны здоровья и социальные аспекты освоения газовых и нефтяных месторождений в Арктических регионах*. Навым; 1995.
9. Кричагин В.Н. *Нормирование УФ-лучей, применяемых в профилактических целях. УФ-излучения*. М.; 1958; 12–5.
10. Ежов С.Н. Основные концепции биоритмологии. *Вестник ТГУ*. 2008; 2: 104–21.
11. Комаров Ф.И., Романов Ю.А., Моисеева Н.И. Хрономедицина – новое направление в медико-биологической науке и практике. В кн.: *Хронобиология и хрономедицина*. М.: Медицина, 1989; 5–17.
12. Катинас Г.С. Уровни организации живых систем и биологические ритмы. В кн.: *Фактор времени в функциональной организации живых систем*. Л.; 1980; 82–5.
13. Алякринский Б.С., Степанова С.И. *По закону ритма*. М.; Наука, 1985.
14. Губарева Л.И. *Экологический стресс*. СПб; Лань, Ставрополь; Ставропольсервисшкола, 2001.
15. Демин Д.Б. Особенности становления гормонального статуса у мальчиков пубертатного периода, проживающих в южных районах Архангельской области. *Экология человека*. 2005; 5: 17–20.
16. Демин Д.Б., Поскотинова Л.В. Годичная ритмика секреции инсулина и кортизола у детей, проживающих на различных географических широтах Европейского Севера. *Экология человека*. 2007; 3: 20–3.
17. Агаджанян Н.А., Радыш И.В. *Биоритмы. Среда обитания. Здоровье*. М.; РУДН, 2013.
18. Holubová A., Štofňková A., Jurčovičová J., Šlamberová R. The effect of neonatal maternal stress on plasma levels of adrenocorticotrophic hormone, corticosterone, leptin, and ghrelin in adult male rats exposed to acute heterotypic stressor. *Physiol Res*. 2016; Dec. 22; 65.
19. Бичаева Ф.А., Ткачев А.В., Бойко Е.Р., Третьякова Т.В., Кулакова И.В. Эколого-физиологические особенности обменных процессов в условиях Севера. В сб.: *Медико-биологические и экологические проблемы здоровья человека на Севере*. Сургут. 2002; Т.3: 5–7.
20. Лупачев В.В. Проблема репродуктивной функции особенности системы «гипофиз-гонады» у мужчин европейского Севера. *Экология человека*. 2009; 7: 20–3.
21. Губин Д.Г. Влияние фотопериодизма на циркадианные ритмы некоторых физиологических процессов. Роль мелатонина. В сб.: *Здоровье и образование в 21 веке*. 2006; Т. 8.
22. Коновалова С.Г., Конкиева Н.А. Экологическая морфология фетоплацентарной системы. *Экология человека*. 2005; 2: 17–24.
23. Милованов А.П. Системный подход в акушерстве с позиций. *Вестник АМН*. 1996; 2: 98–101.
24. Рогозин И.А., Лисица Г.П., Трещева Н.Д. Состояние репродуктивного здоровья женщин Севера европейской территории России. *Экология человека*. 1994; 1: 121–4.
25. Серов В.И., Сивочалова О.В., Кожин А.А. Методические аспекты исследований влияния экологических факторов на репродуктивную систему женщин. *Акушерство и гинекология*. 1990; 3: 6–9.
26. Ульяновская С.А., Баженов Д.В. Закономерности развития поджелудочной железы на Северо-западе России. *Морфологические ведомости*. 2013; 4: 87–92.
27. Кубасов Р.В. Цирканнуальная биоритмика гормональных показателей щитовидной и половых желез. *Экология человека*. 2008; 2: 26–9.
28. Ткаченко Б.И. *Физиологические основы здоровья человека*. Учебник для мед. вузов. Архангельск: Изд. центр Север. гос. мед. унта, 2001.
29. Зенина О.Ю. Хронофизиология и хронопатология сердечно-сосудистой системы. *Экология человека*. 2017; 1: 25–33.
30. Kotelnikova S.V., Kargina M.V., Kotelnikov A.V. Morphofunctional state of the adrenal glands in albino rats under conditions of toxic stress caused by cadmium salt in winter and summer periods. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011; Jun; 151(2): 250–2.
31. Ruff C.B. Morphological adaptation to climate in modern and fossil hominids. *Yearb Phys Anthropol.* 1994; 37(S19): 65–107.
32. Айламазян Э. К., Беляева Т. В., Виноградова Е. Г. Новые принципы оценки экологической безопасности на основе комплекса показателей репродуктивной функции женщины. В сб.: *Критерии экологической безопасности*. СПб.; 1994; 106–7.
33. Губкина З.Д. Адаптивные реакции эндокринной системы у жителей Крайнего Севера. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2004; 8: 272.
34. Малявская С.И., Дворяшина И.В., Терновская В.А. *Метаболический инсулинрезистентный синдром: диагностика, клиническое значение, педиатрические аспекты*. Архангельск; СГМУ, 2004.
35. Ковров К.Н., Суханов С.Г. *Морфологические особенности постнатальной перестройки эндокринно-иммунного комплекса новорожденных с высоким риском перинатальной патологии*. В сб.: *Труды I съезда Российского общества патологоанатомов*. 1996; 109–10.
36. Ульяновская С.А. Возрастная динамика органомерических показателей поджелудочной железы плодов. *Морфология*. 2014; 145; 3: 200.
37. Vukicevic V., Rubin de Celis M.F., Pellegata N.S. Adrenomedullary progenitor cells: Isolation and characterization of a multi-potent progenitor cell population. *Mol Cell Endocrinol.* 2015; Jun 15; 408: 178–84.
38. Drelon C., Berthon A., Mathieu M., Martinez A., Val P. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: A WNT perspective. *Bull Exp Biol Med.* 2015 Nov; 160(1): 20–3.
39. Kristen R R Savell, Benjamin M Auerbach, Charles C Roseman. Constraint, natural selection, and the evolution of human body form. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 081; 113(34): 9492–7.
40. Allen J.A. The influence of physical conditions on the genesis of species. *Radical Rev.* 1877; 1: 108–40.
41. Bergmann C. *Über die Verhältnisse der wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Größe*. *Göttinger Studien*. 1847; 3: 595–708.

## References

1. Avtsyn A.P., Zhavoronkov A.A., Marachev A.G., Mylovanov A.P. *The pathology of man in the North [Patologiya cheloveka na Severe]*. Moscow, Meditsina Publ., 1985. (in Russian)
2. Sukhanov S.G. *Influence of factors of the Far North on the female reproductive system [Vliyaniye faktorov Krainego Severa na zhenskuyu reproduktivnyuyu sistem]*. М.; 2013. (in Russian)
3. Tkachev A.V. Seasonal dynamics of endocrine functions in humans in the North. *Fiziologiya cheloveka*. 1987, 13(2): 328–30. (in Russian)
4. Ulyanovskaya S.A., Sukhanov S.G. *Pancreas hypoplasia of fetuses and newborns of the Arkhangelsk region as a regional feature of morphogenesis. Actual problems of morphology Collection of scientific papers*. Ed. by N.S. Gorbunova. [V sbornike: Aktual'nye problemy morfologii. Sbornik nauchnykh trudov]. Pod red. N.S. Gorbunova. 2007: 137–40. (in Russian)
5. Gudkov A.B., Popova O.N. Pulmonotropic factors of the European North. *Fiziologiya*. 2008; (2): 15–20. (in Russian)
6. Neverova N.P. Activity of the Earth's electromagnetic field and human health in the conditions of the European North. *Ekologiya cheloveka*. 1998; 3: 21–4. (in Russian)
7. Mizun Y.G. The influence of heliophysical factors on the human body in the conditions of the Far North. *Ekologiya cheloveka*. 1995; 1: 42–9. (in Russian)

8. Zhukovskiy A.P., Petrov L.N., Rovnov N.V. *Biophysical mechanism of the magnetic field effect on living organisms. Problems of health protection and social aspects of development of gas and oil deposits in the Arctic regions [Problemy okhrany zdorovya i sotsial'nye aspekty osvoeniya neftyanykh mestorozhdeniy v arkticheskikh regionakh]*. Nadym, 1995. (in Russian)
9. Krichagin V.N. *Rationing of UV rays used for preventive purposes. UV radiation. [Normirovaniye UF-luchey, primenyaemykh v profilakticheskikh tselyakh. UF-izlucheniya]*. Moscow, 1958; 12-5. (in Russian)
10. Yezhov S.N. Basic concepts of biorhythmology. *Vestnik TGEU*. 2008, 2: 104–21. (in Russian)
11. Komarov F. I. Chronomedicine as a new trend in biomedical science and practice. In: *Chronobiology and chronomedicine. [Hronobiologiya i khronomeditsina]*. Moscow, Meditsina Publ., 1989: 5-17. (in Russian)
12. Katinas G.S. Levels of organization of living systems and biological rhythms. In: *The time factor in the functional organization of living systems. [Faktor vremeni v funktsional'noy organizatsii zhivykh sistem]*. Leningrad, 1980: 82-5. (in Russian)
13. Alyakrinsky B.S. *According to the law of rhythm [Po zakonu ritma]*. Moscow; Nauka Publ., 1985. (in Russian)
14. Gubareva L.I. *Ehkologicheskij stress. [Ecological stress]*. St. Petersburg; Lan, Stavropol: Stavropolservis School; 2001. (in Russian)
15. Demin, D. B. Features of the formation of hormonal status in puberty period boys living in the southern areas of the Arkhangelsk region. *Ekologiya cheloveka*. 2005, no. 5, pp. 17-20. (in Russian)
16. Demin D.B., Poskotinova L.V. The annual rhythm of the secretion of insulin and cortisol in children living in different geographical latitudes of the European North. *Ekologiya cheloveka*. 2007, no. 3, pp. 20-3. (in Russian)
17. Agadzhanian N.A., Radish I.V. *Biorythms. Habitat. Health. [Bioritmy. Sreda obitaniya. Zdorovye]*. Moscow; PFUR Publ., 2013. (in Russian)
18. Holubová A., Štofková A., Jurčovičová J., Šlamberová R. The effect of neonatal maternal stress on plasma levels of adrenocorticotrophic hormone, corticosterone, leptin, and ghrelin in adult male rats exposed to the heterotypic stressor. *Physiol Res*. 2016. Dec. 22; 65.
19. Bichkayeva F.A., Tkachev A.V., Boyko E.R., Tret'yakova T.V., Kulakova I.V. *Ecological and physiological features of metabolic processes in the North. Medical, biological and environmental problems of human health in the North. [Ehkologo-fiziologicheskie osobennosti obmennykh processov v usloviyakh Severa. Mediko-biologicheskie i ehkologicheskie problemy zdorov'ya cheloveka na Severe: materialy mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii]*. Vol. 3. Surgut, 2002: 5–7. (in Russian)
20. Lupachev V.V. The problem of reproductive function of the "pituitary-gonadal" system in men of the European North. *Ekologiya cheloveka*. 2009; 7: 20-3. (in Russian)
21. Gubin D.G. et al. Influence of photoperiodism on the circadian rhythms of certain physiological processes. *Health and education in the XXI century. [Role of melatonin. Zdorovye i obrazovaniye v XXI veke]*. 2006, vol. 8. pp. 210-1. (in Russian)
22. Konovalova S.G., Konkiya N.A. Ecological morphology of the fetoplacental system. *Ekologiya cheloveka*. 2005; 2: 17-24. (in Russian)
23. Milovanov A.P. System approach in obstetrics from the pathologist's position. *Vestnik AMN*. 1996; 2: 98-101. (in Russian)
24. Rogozin I.A. et al. The state of reproductive health of women of the North of the European territory of Russia. *Ekologiya cheloveka*. 1994; 1: 121-4. (in Russian)
25. Serov V.I. Methodological aspects of studies of the influence of environmental factors on the reproductive system of women. *Akusherstvo i ginekologiya*. 1990; 3: 6-9. (in Russian)
26. Ulyanovskaya S.A., Bazhenov D.V. Patterns of pancreas development in the North-West of Russia. *Morfologicheskije vedomosti*. 2013; 4: 87-92. (in Russian)
27. Kubasov R.V. Circannual biorhythmics of hormonal parameters of the thyroid and sex glands. *Ekologiya cheloveka*. 2008; 2: 26-9. (in Russian)
28. Tkachenko B.I. *Physiological basis of human health. [Fiziologicheskiye osnovy zdorovya cheloveka]*. St. Petersburg-Arkhangelsk, SGMU Publ., 2001. (in Russian)
29. Zenina O.Y. et al. Chronophysiology and chronopathology of the cardiovascular system. *Ekologiya cheloveka*. 2017; 1: 25-33. (in Russian)
30. Kotelnikova S.V., Kargina M.V., Kotelnikov A.V. Morphofunctional state of the adrenal glands in albino rats under conditions of toxic stress by cadmium salt in winter and summer. *Bull Exp Biol Med*. 2011. Jun; 151 (2): 250-2.
31. Ruff CB. Morphological adaptation to climate in modern and fossil hominids. *Yearb Phys Anthropol*. 1994; 37 (S19): 65-107.
32. Ailamazyan E.K. *New principles of environmental safety assessment on the basis of a complex of indicators of the reproductive function of a woman. Proceedings of the scientific-practical conference "Criteria of ecological safety" [Kriterii ekologicheskoy bezopasnosti: Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii]*. St. Petersburg; 1994, pp. 106-7. (in Russian)
33. Gubkina Z.D. Adaptive reactions of the endocrine system in women of the Far North. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2004; 8: 272. (in Russian)
34. Malyavskaya S.I., Dvoryashina I.V., Ternovskaya V.A. *Metabolic insulin-resistant syndrome: diagnosis, clinical significance, pediatric aspects [Metabolicheskiy insulinresistentnyy sindrom: diagnostika, klinicheskoye znachenie, pediatricheskiye aspekty]*. Arkhangelsk, SGMU Publ., 2004. (in Russian)
35. Kovrov K.N., Sukhanov S.G. *Morphological features of postnatal adjustment of the endocrine-immune complex of newborns with a high risk of perinatal pathology. In the collection: Proceedings of the 1st congress of the Russian Society of Pathologists. [V sbornike: Trudy 1 s'ezda Rossiyskogo obshchestva patologoanatomov]*. 1996; P. 109-10. (in Russian)
36. Ulyanovskaya S. A. Age dynamics of the organometric parameters of the fetal pancreas. *Morfologiya*. 2014; 145(3): 200-1. (in Russian)
37. Vukicevic V., Rubin de Celis M.F., Pellegata N.S. et al. Adrenomedullary progenitor cells: Isolation and characterization of a multi-potent progenitor cell population. *Mol Cell Endocrinol*. 2015, Jun 15; 408: 178-84.
38. Drelon C., Berthon A., Mathieu M., Martinez A., Val P. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: A WNT perspective. *Bull Exp Biol Med*. 2015 Nov; 160(1): 20-3.
39. Kristen R R Savell, Benjamin M Auerbach, Charles C Roseman. Constraint, natural selection, and the evolution of the human body form. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016. 08; 1; 113 (34): 9492-7.
40. Allen J.A. The influence of physical conditions on the genesis of species. *Radical Rev*. 1877; 1: 108–40.
41. Bergmann C. *Über die Verhältnisse der wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Größe*. Göttinger Studien. 1847; 3: 595-708.

**Сведения об авторах:**

**Ульяновская С.А.**, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. анатомии ФГБОУ ВО «Тверской ГМУ» Минздрава России;

**Баженов Д.В.**, доктор мед. наук, чл.-корр. РАН, проф. каф. анатомии ФГБОУ ВО «Тверской ГМУ» Минздрава России;

**Шестакова В.Г.**, канд. биол. наук, доцент, зав. каф. гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Тверской ГМУ»

Минздрава России;

**Калинкин М.Н.**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тверской ГМУ» Минздрава России.

## Методика

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.63.02, 616-092.4

Яковлева А.А.<sup>1</sup>, Павлова Н.Г.<sup>2</sup>

# Экспериментальные модели сократительной активности миометрия

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8, корпус 1;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8, корпус 4

Сократительная деятельность матки до настоящего времени остается актуальным вопросом фундаментальных исследований, поскольку отсутствуют единые представления о биомеханике маточного сокращения, необходимые для профилактики родового и акушерского травматизма. Цель работы – оценка ограничений и возможностей экспериментальных моделей, предназначенных для изучения сократительной активности миометрия. **Методика.** Основными экспериментальными подходами к изучению сократительной активности матки являлись исследования *in vitro*, *in situ*, *in vivo*, *in silico*, а также их сочетание. **Результаты.** В статье рассмотрены исследования, в которых использованы различные сочетания экспериментальных подходов, обсуждаются результаты, полученные при моделировании в экспериментах, обсуждаются результаты изучения синхронизации сокращения отделов матки на различных моделях, а также результаты исследования пейсмекерной активности миометрия и возможность экстраполяции полученных данных на человека. В связи с активным развитием компьютерных технологий в статье поднимается вопрос об их использовании в моделировании сократительной активности матки человека. **Заключение.** Делается заключение, что комплексный подход, включающий электромиографические, биохимические и морфологические исследования в хроническом эксперименте, является наиболее адекватным для изучения сократительной активности миометрия и функционального состояния нормально развитых и отстающих в развитии плодов, что позволит разработать комплексные методы профилактики родового и акушерского травматизма.

**Ключевые слова:** электромиография; сократительная активность миометрия; экспериментальные модели; функциональное состояние плода.

**Для цитирования:** Яковлева А.А., Павлова Н.Г. Экспериментальные модели сократительной активности миометрия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 155-161.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.155-161

**Для корреспонденции:** Яковлева Анастасия Александровна, e-mail: barabulka875@gmail.com

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

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

**Поступила** 04.02.2019

**Принята к печати** 16.01.2020

**Опубликована** 25.02.2020

Yakovleva A.A.<sup>1</sup>, Pavlova N.G.<sup>2</sup>

## Experimental models of myometrium contractile activity

<sup>1</sup> Pathophysiology Laboratory of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Russia, St. Petersburg, Lev Tolstoy street 6-8;

<sup>2</sup>Obstetrics, gynecology and reproductology department of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Russia, St. Petersburg, Lev Tolstoy street 6-8

Uterine contractile activity remains an important issue of fundamental research as there is no single view of the biomechanics of uterine contraction necessary for the prevention of parturition and obstetric trauma until now. The aim of the review was to assess advantages and limitations of experimental models described in the literature for study uterine contractile activity. At the present time main experimental approaches for study myometrium contractile activity are research *in vitro*, *in situ*, *in vivo*, *in silico* and the their combinations. The literature presents experimental approaches, different models of uterine contractions synchronization and study of myometrium pacemaker activity. Due to active development of computer technologies there is a

need to model human uterine contractile activity with a simplified anatomy. The authors propose that combination of electromyographic, biochemical and morphological methods in chronic experiment is the most correct and appropriate direction for the assessment of the myometrium contractile activity and functional state of normally developed and growth restricted fetuses.

**Keywords:** electromyography; uterine contractile activity; experimental model; functional fetal state.

**For citation:** Yakovleva A.A., Pavlova N.G. Experimental models of myometrium contractile activity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 155-161. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.01.155-161

**For correspondence:** Yakovleva A.A., email: barabulka875@gmail.com

**Information about authors:**

Yakovleva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-1889-5928>

Pavlova N.G., <https://orcid.org/0000-0002-2886-4578>

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

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

**Received** 04.02.2019

**Accepted** 16.01.2020

**Published** 25.02.2020

Сократительная деятельность матки до настоящего времени остается актуальным вопросом фундаментальных исследований, поскольку отсутствуют единые представления о биомеханике маточного сокращения. Понимание механизмов сокращения матки и обусловленного им функционального состояния плода с позиций функциональной системы мать-плацента-плод позволит разработать комплексные методы профилактики родового и акушерского травматизма [1, 2].

Известно, что при физиологическом течении родового акта на высоте схватки  $\text{PaO}_2$  в крови плода снижается всего на 4 мм рт. ст. Следовательно, в таких условиях плод не испытывает гипоксии, поскольку его организм перфузируется запасом оксигенированной крови из венозного синуса [1, 2]. Однако при гипертонической дисфункции или дискоординированной родовой деятельности может наблюдаться гипоксия плода, обусловленная увеличением амплитуды, продолжительности сокращения (систола) и/или укорочения периода расслабления (диастола) маточных сокращений [2-4].

В настоящее время основными экспериментальными подходами к изучению сократительной активности матки являются исследования *in vitro*, *in situ*, *in vivo*, *in silico* и их сочетания.

*Modeli in vitro.* Большинство исследований *in vitro* авторы проводят на полосках миометрия, полученных у женщин во время операции кесарева сечения или у экспериментальных животных в конце срока беременности. В литературе приводятся экспериментальные модели *in vitro* сходного дизайна. Исследование проводят на полосках миометрия, содержащих достаточное количество функциональных сократительных модулей, имеющих прямую механическую связь между

собой, при отсутствии в них участков некробиоза. Исследователи погружают полоски миометрия в различные модификации раствора Рингера, а регистрацию миографической активности осуществляют с помощью изометрических и/или изотонических датчиков [5]. В условиях подобной модели авторы изучают экспрессию рецепторов, а также влияние таргетных препаратов на сократительную активность миометрия.

Так в исследовании M. Balki [6] и соавторов удалось проследить восстановление сократительной активности миометрия у женщин после длительной десенсибилизации окситоциновых рецепторов. Авторы показали, что применение больших доз окситоцина (10-15 МЕ) приводит к пролонгированной рефрактерности окситоциновых рецепторов миометрия, что обуславливает длительный более чем 1,5 часовой период восстановления его сократительной активности [6].

На аналогичной модели изучался механизм синхронизации сокращения миометрия в родах [5]. Авторы доказали функциональную и морфологическую однородность миометрия от дна матки до нижнего сегмента. С этой целью иссекался миометрий из разных отделов матки, его равнозначно растягивали, анализируя спонтанную фазовую сократительную активность, реакции на импульсы растяжения и дорастяжения, а также на электрические и химические стимулы. На основании анализа сокращений неодинаково растянутых горизонтальной и вертикальной частей полоски миометрия авторами было установлено, что синхронизация сокращений миометрия зависит не только от его электрической проводимости. Было показано также, что полоски миометрия имеют неодинаковую сократительную активность при их механическом раздражении. Синхронизацию маточных сокращений обеспе-

чивает механорецепторный механизм обратной связи, что было установлено в оригинальном опыте с коромыслом, к концам которого прикреплялись полоски миометрия. Центр коромысла крепился к дну камеры. Коромысло, как диэлектрик, не проводило электрический сигнал, исключало морфологическую связь между полосками миометрия, создавая лишь жесткую прямую механическую связь. В ответ на механические стимулы полоски миометрия синхронизировали свои сокращения. Авторы пришли к заключению, что в основе механизма синхронизации сократительной деятельности утеромиоцитов лежит миогенный фактор: активация фазной синхронной активности утеромиоцитов, механорецепторный механизм обратной связи по растяжению миоцитов, наличие прямой механической связи между оптимально растянутыми утеромиоцитами [5,7].

Таким образом, экспериментальный подход *in vitro* позволяет изучать молекулярные и клеточные механизмы маточного сокращения на тканевом уровне. Однако, подобный подход имеет существенные недостатки, поскольку не учитывает регуляторное влияние систем целостного организма на активность рецепторов и их лигандов. Этот факт объясняет противоречивые результаты, полученные в ряде исследований одного и того же явления *in vivo* и *in vitro*, поэтому большинство авторов рекомендует не ограничиваться экспериментами *in vitro*, а проводить исследования в условиях целостного организма.

Подход, объединяющий наблюдения *in vivo* и *in vitro* в одном исследовании был предпринят с целью выявления пролонгированных эффектов лекарственных средств на сократительную активность миометрия. В исследовании J. Hajagos-Tóth [8] было установлено, что уровень эстрогенов в крови матери влияет на сократительную активность матки на протяжении беременности и во время родов. С этой целью самкам крысам в течение беременности вводили  $17\beta$ -эстрадиол. Исследование полосок миометрия этих животных показало снижение сократительного ответа на раздражение их норадреналином. В исследовании удалось установить, что этот эффект осуществляется за счет влияния эстрогенов на  $\alpha_2$ -адренорецепторы. Авторы делают вывод, что агонисты и антагонисты обоих подтипов  $\alpha_2$ -адренорецепторов могут регулировать аномальную сократительную деятельность матки. Однако эффект может оказаться видоспецифичным [8].

*Модели in situ.* Для изучения локализации пейсмейкера, механизмов распространения, стимуляции, торможения маточного сокращения и процессов его ауторегуляции в литературе описан экспериментальный

подход *in situ*. Этот подход позволяет исследовать реакции и ауторегуляцию органа в искусственной среде, имитирующей среду организма. K. Geisler и соавторы [9], а также J. Künzel и соавторы [10] использовали подобную перфузионную модель матки свиньи для изучения индукции и торможения маточной активности и выявления оптимального «окна зачатия» при выполнении вспомогательных репродуктивных технологий. Авторы изучали влияние различных доз прогестерона на индуцированные простагландинами (PG1, PGE2, PGF2 $\alpha$ ) сокращения матки. С этой целью регистрировали в полости матки синхронно *on line* динамику температуры и центрального венозного давления. Было показано, что индуцированные простагландинами сокращения матки после введения прогестерона дозозависимо снижались. То есть прогестерон оказывает тормозное влияние на индуцированную простагландинами сократительную активность. Авторами было выявлено также, что с целью индукции маточных сокращений следует применять простогландины E2 и F2 $\alpha$  (PGE2, PGF2 $\alpha$ ). Авторы подчеркнули преимущество открытой системы перфузии – скорость и легкость настраивания, управления системой перфузии одним человеком, возможность работы системы без мембранного оксигенатора и инкубатора [9–11]. Однако в процессе использования открытой перфузионной модели может наблюдаться гипотермия матки, на фоне которой нарушается работа трансмембранных ионных насосов [12].

Для решения аналогичных задач W. J. Lammers и соавторы [13] предложили другой вариант перфузионной модели. Подобное исследование авторы проводили на изолированном роге беременной матки морской свинки и крысы, заполняя полость матки после её опорожнения от плодов эквивалентным объемом раствора Рингера-Тироде. Регистрацию маточной активности перфузируемой матки осуществляли с помощью цифровой видеокамеры (морские свинки) или проводили её синхронную униполярную регистрацию (у крыс). На этой модели удалось установить, что единая специфическая область пейсмейкера в матке морской свинки и крысы отсутствует, а подавляющее большинство спонтанных сокращений имеет локальный характер [13].

Известно что, пейсмейкер или водитель ритма это – самопроизвольно активирующаяся клетка, генерирующая медленные волны или потенциалы действия без внешней стимуляции. До сих пор нет данных о точной локализации пейсмейкера в матке, и этот вопрос остается дискуссионным. Современные данные указывают на то, что каждое сокращение матки инициирует

ся в разных точках области повышенной электрической активности, т.н. «маточно-плацентарной зоне пейсмейкерной активности» [14, 15]. На базе модели W.J. Lammers и соавторов было выполнено исследование [14], в котором проводилась многоканальная регистрация электрической активности миометрия крысы, как правило, возникающей либо в зонах плацентации в проекции края брыжейки, либо яичника [14]. В недавних исследованиях тех же авторов [16] было отмечено, что похожие пейсмейкерные зоны существуют в миометрии человека на глубине прорастания трофобласта в *stratum supra vasculare* [16]. В отличие от водителя ритма синоатриальном узла сердца, имеющего точную локализацию и единую структуру с постоянной периодичностью потенциалов действия, или клеток Кахаля кишечника, создающих локальные сокращения, не имеющие четкой периодичности, водитель ритма матки квазипериодичен, не имеет четкой локализации и вызывает сокращение целого органа механотрансдукционным путем [14, 15].

Таким образом, экспериментальная модель *in situ* позволила изучить характер и пути распространения сокращения миометрия, индукцию или торможение маточной активности на органном уровне, однако она не позволяет учесть комплексного влияния материнских и плодовых факторов на сократительную активность матки.

*Модели in vivo.* Для устранения недостатков экспериментальных моделей *in vitro* и *in situ*, с целью изучения комбинированного влияния материнских и плодовых факторов на сократительную активность матки были использованы экспериментальные модели *in vivo*. Эти исследования позволяют в условиях монотерапии изучать влияние различных веществ на маточно-плацентарный кровоток и сократительную активность матки в остром и хроническом опыте в условиях живого организма. В условиях острого опыта [17] было изучено влияние терапевтических доз транквилизаторов на индуцированную сократительную деятельность у крыс в конце беременности. С этой целью авторы наркотизировали крыс в конце беременности и выполняли лапаротомию. Для регистрации электромиографической активности в дистальный отдел матки авторы вживляли электроды. Регистрацию осуществляли с помощью восьмиканального электроэнцефалографа «Galileo». Препараты вводили в брюшную полость. Было показано, что транквилизаторы (реланиум, феназепам, грандаксин), введенные на фоне индуцированной окситоцином (0,5 МЕ) сократительной деятельности, снижают амплитуду и частоту сокращений миометрия [17]. Анализируя условия проведения острых опытов *in vivo*,

следует отметить, что при исследовании наркотизированное животное находится в неестественном положении, вследствие чего происходит нарушение маточно-плацентарной гемодинамики. Подобные недостатки делают эту модель неприемлемой при планировании дизайна исследования у беременных животных, особенно при исследовании функционального состояния плода. Изучение сократительной активности матки, неразрывно связанной с функциональным состоянием плода, предпочтительнее проводить в условиях, максимально приближенных к физиологическим: естественное положение животного и отсутствие наркоза. Хронический опыт дает возможность длительной сопряженной регистрации маточной активности и сердечного ритма самки и плодов на различных этапах беременности и во время родов.

В исследованиях на беременных крысах проводилось сопоставление эффективности регистрации маточных сокращений с передней брюшной стенки животного и непосредственно с поверхности матки [18, 19]. С этой целью на 18-й день беременности самкам интраоперационно вводили электроды в дистальный отдел матки для регистрации электромиографической активности и внутриполостной датчик для регистрации внутриматочного давления. В дальнейшем до конца беременности у ежедневно наркотизированных животных проводили синхронную регистрацию электрической активности матки с передней брюшной стенки и непосредственно с поверхности матки, а также определяли внутриматочное давление. Было установлено, что электрическая активность с поверхности брюшной стенки регистрировалась только непосредственно перед родами. Наибольшей чувствительностью в отношении паттернов маточных сокращений обладала регистрация с поверхности матки. Значимые изменения внутриматочного давления вместе с высокоамплитудными маточными сокращениями были зарегистрированы с передней брюшной стенки во время срочных и преждевременных родов, вызванных прогестинном. По мнению авторов, комбинированная оценка электромиографической активности может быть использована для изучения патогенеза физиологических и преждевременных родов, а также влияния утеротонических и утеролитических средств [18, 19]. Однако результаты, в этом исследовании были получены у наркотизированных животных, находящихся в неестественном положении, при отсутствии мониторинга функционального состояния плодов. Последний чрезвычайно важен при планировании дизайна исследования, поскольку его назначение должно улучшать или, по крайней мере, не ухудшать функционального состояния плодов из-за наркоза и длительного неестественного положения животного.

Длительная синхронная регистрация сердечного ритма и сократительной активности матки у беременных самок и плодов кролика проводилась в хроническом опыте на различных этапах беременности и родах [20]. На 28-ой день беременности авторы вживляли электроды в дистальный отдел матки для регистрации электрической и механической активности миометрии, в бурый жир — для регистрации сердечного ритма плодов и в холку самки — для регистрации её ЭКГ. Через два дня у денаркотизированного животного, находящегося в естественном положении, проводили регистрацию электромиографической активности, ЭКГ самки и плодов, а также определяли внутриматочное давление на электроэнцефалографе «Биоскрипт». Было показано, что инфузия фосфокреатина при родах индуцированных окситоцином регулирует маточную активность, а двукратное увеличение дозы препарата приводит к гипертонусу матки. О характере родовой деятельности авторы судили также по изменению сердечного ритма плодов [20]. Однако, результаты полученные в хроническом опыте, могут иметь видоспецифичные особенности. Авторы считают, что запуск процесса родов у человека и животных могут различаться и эти особенности надо учитывать в экстраполяции результатов исследований на человека [21]. Например, известно, что роды у овец и коров инициируются фетальными гипоталамо-гипофизарными механизмами, обуславливающими прогрессивное уменьшение соотношения прогестерона и эстрогена. Однако у человека таких значительных изменений синтеза стероидов не происходит [22].

Таким образом, исследования *in vivo* предпочтительнее осуществлять в хроническом опыте, что позволяет адекватно анализировать патогенез и нарушения сократительной деятельности матки и функционального состояния плода с учетом регуляторного влияния нервной и эндокринной систем организма матери, а также позволяет оценивать эффект монотерапии утеротоническими и утеролитическими препаратами. При этом экспериментальные должны быть подтверждены в клинических исследованиях.

*Моделирование in silico.* В последние годы в связи с развитием компьютерных технологий появилась возможность создания объемной реконструкции органов, в том числе матки, и разработки новейших алгоритмов для прогноза развития аномалий родовой деятельности. При помощи компьютерных технологий на основе данных, полученных в экспериментах на изолированных полосках миометрии и при выполнении электрогистрографии (ЭГГ) у женщин, проводится математическое моделирование *in silico*. Данный экспериментальный

подход используют при изучении фундаментальных свойств сократительной активности миометрии человека. Такое моделирование — важный вклад в неинвазивное изучение электрической проводимости миометрии и разработку новых технологий мониторинга сократительной активности матки. В условиях модели можно анализировать реакцию системы на различные стимулы и выявлять нарушения расчетных физиологических закономерностей. Данный подход позволяет оценивать распространение гладкомышечного возбуждения в матке в конце беременности у человека [22, 23].

В исследованиях S. Rihana и C. Marque [24], а также L. Bursztyн и соавторов [25] удалось максимально корректно смоделировать возникновение клеточного потенциала действия в миометрии. Авторы сформулировали алгоритм, описывающий связь между возбуждением и сокращением, как функцию большого количества электрофизиологических параметров, связанных с изменениями концентраций ионов потенциала действия (ПД) [24, 25]. На основе данных, полученных с помощью наружной ЭГГ, была разработана аналитическая модель паттерна электрической активности миометрии [26]. ЭГГ матки регистрировалась в конце беременности у женщин сетью из 64 электродов высокой плотности, расстояние от миометрии до передней брюшной стенки измерялось с помощью электрографии. Модель описывает электрический сигнал на клеточном уровне, его распространение в миометрии и проводимость к поверхности брюшины. Модель точно описывает проводимость сигнала от миометрии к коже с помощью ограниченного числа параметров [26]. На основе этих данных были созданы различные многоуровневые модели электрической активности миометрии у женщин. Так, модель [26] была дополнена данными, полученными другими авторами в конце беременности с помощью магнитомиографии (ММГ) на сверхчувствительных магнитометрах SQUID. P.S. La Rosa и соавторы [27] на основе данных ЭГГ и ММГ построили упрощенную геометрическую модель сократительной активности матки у женщин в конце беременности. В этой многоуровневой модели матка представлена в виде сферы с одним водителем ритма, локализованным в области дна [27]. Эта модель была дополнена в новом исследовании M. Zhang и соавторов [22]. Авторы разработали математическую модель, в которой для моделирования геометрии объема матки учитывается не только чувствительность ММГ, но и ориентация функциональных модулей матки, а также расположение пейсмекера. По мнению авторов, данную модель можно использовать как неинвазивный метод оценки паттерна сокращения матки, расширяющий клинические представления о сократительной активности матки и анома-

лиях родовых сил [22]. Следовательно, моделирование *in silico* расширяет возможности исследований у человека интранатальной маточной активности, патогенеза аномалий родовых сил и путей их медикаментозной коррекции. Однако моделирование *in silico* основано на упрощенной анатомии матки, строится только на данных электрофизиологии и не учитывает особенности метаболизма утеромиоцитов. С этим утверждением согласны и другие авторы, доказавшие, что для создания комплексных моделей срочных и преждевременных родов необходимо интегрировать электрофизиологические и молекулярные данные [28].

Таким образом, сопоставление преимуществ и недостатков моделей *in vitro*, *in situ*, *in vivo*, *in silico* и их сочетаний позволяет осуществить выбор экспериментального подхода для решения проблем физиологического и патологического акушерства согласно поставленным задачам. При этом хронический опыт на животных, имеющих гемохориальный тип плаценты, позволяет проводить синхронную регистрацию электрической активности матки и сердечного ритма плодов с последующими биохимическими и морфологическими исследованиями плодово-плацентарного и материнского материала. Подобный, максимально приближенный к клиническим условиям дизайн, целесообразно использовать для изучения влияния лекарственных средств, обладающих анальгетическими, утеролитическими, утеротоническими, антиоксидантными, антигипоксантами свойствами в монотерапии. Кроме того модель можно считать адекватной для проведения фундаментальных исследований по изучению патогенеза аномалий сократительной деятельности матки и путей их коррекции.

### Литература

- Константинова Н.Н., Павлова Н.Г. Развитие представлений об универсальных гемодинамических реакциях в функциональной системе мать-плацента-плод. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2004; 53(1): 27-30.
- Савицкий Г.А., Савицкий А.Г. *Биомеханика физиологической и патологической родовой схватки*. СПб; «Элби», 2003.
- Железова М.Е. Быстрые роды в современном акушерстве. *Практическая медицина*. 2016; 1(93): 16-21.
- Ившин А.А., Гуменюк Е.Г., Шифман Е.М., Колыбина П.В., Гарлоева Ю.Н. Влияние родостимуляции на церебральную гемодинамику плода. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2013; 62(2): 93-100.
- Савицкий А.Г., Савицкий Г.А., Милль К.В. *Фундаментальные механические свойства миометрия человека*. СПб; «Элби-СПб», 2013.
- Balki M., Ramachandran N., Lee S., Talati C. The Recovery Time of Myometrial Responsiveness After Oxytocin-Induced Desensitization in Human Myometrium *In Vitro*. *Anesthesia & Analgesia*. 2016; 122(5): 1508-15.
- Савицкий А.Г., Савицкий Г.А., Иванов Д.О., Милль К.В. О миогенном механизме синхронизации и координации сокращений утеромиоцитов во время родовой схватки человека. *Бюллетень Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова*. 2012; 3(14): 33-40.
- Hajagos-Tóth J., J. Bóta, Ducza E., Csányi A., Tiszai Z., Borsodi A., et al The effects of estrogen on the  $\alpha 2$ -adrenergic receptor subtypes in rat uterine function in late pregnancy *in vitro*. *Croat Med J*. 2016; 57(2): 100-9.
- Geisler K., Künzel J., Grundtner P., Müller A., Beckmann M. W., Dittrich R. The perfused swine uterus model: long-term perfusion. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10:110: 1-10. 2012.
- Künzel J., Geisler K., Maltaris T., Müller A., Hoffmann I., Schneider H., et al Effects of Interactions Between Progesterone and Prostaglandin on Uterine Contractility in a Perfused Swine Uterus Model. *In Vivo*. 2014; 28(4): 467-75.
- Самоделькин Е.И., Меркучева Н.Г., Косарева П.В., Нестерова Л.Ю. Роль простагландинов и циклооксигеназы в патогенезе хронического эндометрита. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(2): 98-100.
- Bulletti C.S., de Ziegler D. Uterine contractility and embryo implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005; 17: 265-76.
- Lammers W. J. E. P., Stephen B., Al-Sultan M. A., Subramanya S. B., Blanks A. M. The location of pacemakers in the uteri of pregnant guinea pigs and rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015; 309: R1439-R1446.
- Young R.C. The uterine pacemaker of labor. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2018; 52: 68-87.
- Lutton E.J., Lammers W.J.E.P., James S., van den Berg H.A., Blanks A.M. Identification of uterine pacemaker regions at the myometrial-placental interface in the rat. *J Physiol*. 2018; 596(14): 2841-52.
- Lutton E.J., Lammers W.J., James S., van den Berg H.A., Blanks A.M. A computational method for three-dimensional reconstruction of the microarchitecture of myometrial smooth muscle from histological sections. *PLoS One*. 2017; 16; 12(3): e0173404.
- Абрамченко В.В., Убайдатова Б.А., Корхов В.В., Петросян М.А. Влияние транквилизаторов (грандаксин, феназепам, реланиум) на сократительную активность матки беременных животных. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2005; 54(3): 70-3.
- Buhimschi C.S., Saade G.R., Buhimschi I.A., Gokdeniz R., Boyle M.B., Garfield R.E. Effect of stimulatory and inhibitory drugs on uterine electrical activity measured noninvasively from the abdominal surface of pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183: 68-75.
- Buhimschi C., Garfield R.E. Uterine contractility as assessed by abdominal surface recording of electromyographic activity in rats during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 174(2): 744-53.
- Назарова Л.А., Константинова Н.Н., Толибова Г.Х., Базиан Е.В., Морозов Т.Е., Павлова Н.Г. Сократительная активность матки самок кролика в конце беременности и метод ее регистрации. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2007; 144(9):355-58.
- Mitchell B. F., Taggart M. J. Are animal models relevant to key aspects of human parturition? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 297: R525-R545.
- Zhang M., Tidwell V., La Rosa P. S., Wilson J. D., Eswaran H., Nehorai A. Magnetomyograms of Uterine Contractions during Pregnancy Using a Multiscale Forward Electromagnetic Approach. *PLOS ONE*. 2016; 11(3):e0152421-23.
- Sharp G.C., Saunders P.T.K., and Norman J.E. Computer models to study uterine activation at labour. *Mol. Hum. Reprod*. 2013; 19(11): 711-7.
- Rihana S., Marque C. Preterm labor-modeling the uterine electrical activity from cellular level to surface recording. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2008; 3726-9.



25. Bursztyn L., Eytan O., Jaffa A.J., Elad D. Mathematical model of excitation-contraction in a uterine smooth muscle cell. *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2007; 292: C1816–C1829.
26. Rabotti C., Mischi M., Beulen L., Oei G., Bergmans J.W.M. Modeling and Identification of the Electrohysterographic Volume Conductor by High-Density Electrodes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering.* 2010; 57(3): 519–27.
27. La Rosa P.S., Eswaran H., Preissl H., Nehorai A. Multiscale forward electromagnetic model of uterine contractions during pregnancy. *BMC Med Phys.* 2012; 12: 4.
28. Aslanidi O., Atia J., Benson A.P., H.A. van den Berg, Blanks A.M., Choi C., et al. Towards a computational reconstruction of the electrodynamics of premature and full term human labour. *Prog Biophys Mol Biol.* 2011; 107: 183–92.
12. Bulletti C.S., de Ziegler D. Uterine contractility and embryo implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005; 17: 265–76.
13. Lammers W.J.E.P., Stephen B., Al-Sultan M.A., Subramanya S.B., Blanks A.M. The location of pacemakers in the uteri of pregnant guinea pigs and rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015; 309: R1439–R1446.
14. Young R.C. The uterine pacemaker of labor. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.* 2018; 52: 68–87.
15. Lutton E.J., Lammers W.J.E.P., James S., van den Berg H.A., Blanks A.M. Identification of uterine pacemaker regions at the myometrial–placental interface in the rat. *J Physiol.* 2018; 596(14): 2841–2852.
16. Lutton E.J., Lammers W.J., James S., van den Berg H.A., Blanks A.M. A computational method for three-dimensional reconstruction of the microarchitecture of myometrial smooth muscle from histological sections. *PLoS One.* 2017; 16; 12(3):e0173404.
17. Abramchenko V.V., Ubaydatova B.A., Korhov V.V., Petrosjan M.A. Effect tranquilizers (grandaxinum, phenazepam, relanium) uterine contractile activity in pregnant animals. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 54(3): 70–73.2005; (in Russian)
18. Buhimschi C.S., Saade G.R., Buhimschi I.A., Gokdeniz R., Boyle M.B., Garfield R.E. Effect of stimulatory and inhibitory drugs on uterine electrical activity measured noninvasively from the abdominal surface of pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183: 68–75.
19. Buhimschi C., Garfield R.E. Uterine contractility as assessed by abdominal surface recording of electromyographic activity in rats during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 174(2): 744–53.
20. Nazarova L.A., Konstantinova N.N., Tolibova G.H., Bazian E.V., Morozov T.E., Pavlova N.G. Rabbit uterine contractile activity in late pregnancy and the method of its registration. *Bulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny.* 2007; 144 (9): 355–8. (in Russian)
21. Mitchell B. F., Taggart M. J. Are animal models relevant to key aspects of human parturition? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 297: R525–R545.
22. Zhang M., Tidwell V., La Rosa P. S., Wilson J. D., Eswaran H., Nehorai A. Magnetomyograms of Uterine Contractions during Pregnancy Using a Multiscale Forward Electromagnetic Approach. *PLOS ONE.* 2016; 11(3):e0152421–23.
23. Sharp G.C., Saunders P.T.K., and Norman J.E. Computer models to study uterine activation at labour. *Mol. Hum. Reprod.* 2013; 19(11): 711–7.
24. Rihana S., Marque C. Preterm labor—modeling the uterine electrical activity from cellular level to surface recording. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2008; 3726–9.
25. Bursztyn L., Eytan O., Jaffa A.J., Elad D. Mathematical model of excitation-contraction in a uterine smooth muscle cell. *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2007; 292: C1816–C1829.
26. Rabotti C., Mischi M., Beulen L., Oei G., Bergmans J.W.M. Modeling and Identification of the Electrohysterographic Volume Conductor by High-Density Electrodes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering.* 2010; 57(3): 519 – 27.
27. La Rosa P.S., Eswaran H., Preissl H., Nehorai A. Multiscale forward electromagnetic model of uterine contractions during pregnancy. *BMC Med Phys.* 2012; 12: 4.
28. Aslanidi O., Atia J., Benson A.P., H.A. van den Berg, Blanks A.M., Choi C., et al. Towards a computational reconstruction of the electrodynamics of premature and full term human labour. *Prog Biophys Mol Biol.* 2011; 107: 183–92.

## References

1. Konstantinova N.N., Pavlova N.G. Concept development of complex hemodynamic reactions to the mother-placenta-fetus functional system. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2004; 53(1): 27–30. (in Russian)
2. Savitskiy G.A., Savitskiy A.G. *Biomechanics of physiological and pathological contraction. [Biomechanika fiziologicheskoy i patologicheskoy rodovoy skhvatki].* Sankt-Peterburg: «Jelbi», 2003. (in Russian)
3. Zhelezova M.E. Metypercinesia in modern obstetrics. *Prakticheskaya meditsina.* 2016; 1(93): 16–21. (in Russian)
4. Ivshin A.A., Gumenjuk E.G., Shifman E.M. Kolybina P.V., Garloeva Ju.N. Labor induction effect on fetal cerebral hemodynamics. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2013; 62(2): 93–100. (in Russian)
5. Savitskiy A.G., Savitskiy G.A., Mill' K.V. *Fundamental mechanical properties of human myometrium. [Fundamental'nye mekhanicheskie svoystva miometriya cheloveka].* Sankt-Peterburg: «Jelbi- SPb», 2013. (in Russian)
6. Balki M., Ramachandran N.; Lee S.; Talati C. The Recovery Time of Myometrial Responsiveness After Oxytocin-Induced Desensitization in Human Myometrium In Vitro. *Anesthesia & Analgesia.* 2016; 122(5): 1508–15.
7. Savickij A.G., Savickij G.A., Ivanov D.O., Mill' K.V. About the muscular mechanism of synchronization and coordination of uterine contractions of during the human delivery. *Bulleten' Federal'nogo tsentra serdtsa, krovi i endokrinologii im. V.A. Almazova.* 2012; 3(14): 33–40. (in Russian)
8. Hajagos-Tóth J., Bóta J., Ducza E., Csányi A., Tiszai Z., Borsoodi A., et al The effects of estrogen on the  $\alpha$ 2-adrenergic receptor subtypes in rat uterine function in late pregnancy in vitro. *Croat Med J.* 2016; 57(2): 100–9.
9. Geisler K., Künzel J., Grundtner P., Müller A., Beckmann M. W., Dittrich R. The perfused swine uterus model: long-term perfusion. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2012; 10:110: 1–10.
10. Künzel J., Geisler K., Maltaris T., Müller A., Hoffmann I., Schneider H., et al Effects of Interactions Between Progesterone and Prostaglandin on Uterine Contractility in a Perfused Swine Uterus Model. *In Vivo.* 2014; 28(4): 467–75.
11. Samodelkin E.I., Mercucheva N.G., Kosareva P.V., Nesterova L.Y. The role of prostaglandins and Cyclooxygenase in pathogenesis of chronic endometritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2017; 61(2): 98–100. (in Russian)

## Сведения об авторах:

**Яковлева Анастасия Александровна**, науч. сотр. лаб. патофизиологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, e-mail: barabulka875@gmail.com;

**Павлова Наталия Григорьевна**, доктор мед. наук, проф., каф. акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, e-mail: ngrp05@yandex.ru

## Некролог

### Памяти Виталия Кузьмича Решетняка



12 сентября 2019 г. после тяжелой и продолжительной болезни ушел из жизни выдающийся ученый, заслуженный деятель науки РФ, лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники, член-корреспондент РАН, профессор, доктор мед. наук **Виталий Кузьмич Решетняк**.

Мы все очень любили и уважали Виталия Кузьмича. Исключительно доброжелательный, с живым чувством юмора он всегда находил добрые слова поддержки, протягивал руку помощи в трудную минуту. Он умел ставить цели и «плыть против течения», добиваясь их реализации, умел мужественно противостоять невзгодам.

Сфера научных интересов В.К. Решетняка включала обширный круг проблем патологии нервной системы, в частности, изучения патофизиологических механизмов острой и хронической боли. Виталий Кузьмич был членом Всемирной и Европейской Ассоциации по изучению боли. Он являлся одним из создателей Российской Ассоциации по изучению боли, где в течение 10 лет был её Генеральным секретарем, а с 1997 г. — Вице-президентом.

Исследования В.К. Решетняка были направлены на решение актуальных практических задач. Им был

разработан метод профилактики возникновения фантомно-болевого синдрома после ампутации конечностей, созданы способы лечения тригеминальной невралгии. На эти новые разработки В.К. Решетняк получил 10 авторских свидетельств и патентов, для реализации которых были созданы и внедрены в клиническую практику три оригинальных прибора, за что он получил почетный знак «Изобретатель СССР». Один из этих приборов получил золотую медаль ВДНХ.

Помимо изучения проблемы боли, В.К. Решетняк уделял серьезное внимание изучению патогенетических механизмов нарушений сна различного генеза. В частности, им были сформулированы медико-технические требования для создания отечественного аппарата для лечения синдрома обструктивного апноэ сна. За эту работу в составе авторского коллектива в 2003 г. Виталий Кузьмич был удостоен премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

За достигнутые трудовые успехи, высокий профессионализм и многолетний добросовестный труд Указом Президента Российской Федерации В.К. Решетняку было присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации».

Виталий Кузьмич много сил вложил в организацию учебно-педагогического процесса в Институте общей патологии и патофизиологии и Медицинском центре Управления делами Президента РФ. За большой вклад в подготовку и воспитание медицинских кадров он был награжден Знаком отличия «За добросовестный труд» и Почетным знаком «За доблестный труд» Медицинского центра Управления делами Президента РФ.

Виталий Кузьмич внес существенный вклад в работу профессиональных научных журналов — он был заместителем Главного редактора журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия», членом редколлегии журналов: «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», «Российский журнал боли», «Клиническая патофизиология».

Светлая память о Виталии Кузьмиче — талантливом ученом и просто замечательном человеке всегда будет жить в нашей памяти, наших сердцах.

*Коллеги и друзья*