

Адрес редакции:

125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
ФГБНУ «НИИ общей патологии
и патофизиологии», 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

Двухлетний импакт-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 11.05.2020
Подписано к печати 25.05.2020
Опубликовано 10.06.2020

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. № 2. 1–136

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 № 2 · 2020

Апрель–Июнь

Главный редактор:

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

Заместители главного редактора:

И.С. Гущин, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., Институт иммунологии, 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. Кубатиев, *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. Баякин, *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., АМИЦДО, 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, Германия*

А.П. Ястребов, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., УГМУ, Екатеринбург*

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 2020
Signed for publication on 2020
Published on 06/10/2020

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 2. 1–136

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 № 2 · 2020
April–June

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*

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*

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Мухомедзянов А.В., Маслов Л.Н.** К вопросу об участии брадикининовых, каннабиноидных и ваниллоидных рецепторов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к нормобарической гипоксии 5
- Прокопьева В.Д., Ветлугина Т.П., Ярыгина Е.Г., Плотников Е.В., Бохан Н.А.** Роль анионного компонента в проявлении эффектов органических солей лития на окислительную модификацию белков и липидов крови больных депрессивными расстройствами 13
- Алексеев В.В., Каде А.Х.** Функциональная и корреляционная зависимость между показателями метаболической активности нейтрофилов и α -дефензинов у животных различных возрастных групп в динамике острой соматической боли 21
- Абакумова Т.В., Генинг С.О., Долгова Д.Р., Антонева И.И., Генинг Т.П., Федотова А.Ю.** Транскрипционные факторы HIF-1 α и NF- κ B в опухолевой ткани и клетках асцита при распространённом раке яичников 30
- Казаков О.В., Повещенко А.Ф., Орлов Н.Б., Райтер Т.В., Повещенко О.В., Кабаков А.В., Стрункин Д.Н., Лыков А.П., Коненков В.И.** Взаимосвязь содержания цитокинов лимфы и структурных преобразований в брыжеечных лимфатических узлах при химиотерапии, оперативном лечении и химиотерапии экспериментального рака молочной железы 37
- Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю.** Коррекция морфофункционального состояния печени при остром гепатите с помощью стволовых клеток 46
- Савилов П.Н.** Кровоток и напряжение кислорода в печени при различных способах ее повреждения и гипероксии ... 54
- Демяшкин Г.А.** Иммунофенотипическая характеристика сперматогенеза при идиопатической форме мужского бесплодия 63
- Воронков А.В., Геращенко А.Д.** Эндотелиопротекторные свойства АТАСЛ и катехин гидрата в условиях истощающих нагрузок крыс 74

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Успенская М.С., Ляпина М.Г., Майстренко Е.С.** Гепариноид из корней пиона (*Paeonia anomala*): воздействие на полимеризацию и растворение фибрина при тромбообразовании 80
- Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г.** О феномене повышенной чувствительности крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, к диабетогенному воздействию суммарной РНК 85
- Тиньков А.А., Айсывакова О.П., Скальная М.Г., Карганов М.Ю., Chang S. J.-S., Скальный А.В.** Определение изменений уровня кобальта, меди, марганца и железа в сыворотке крови, волосах и моче при ожирении и сопутствующей артериальной гипертензии методом ICP-MS 89
- Разуваева Я.Г., Торопова А.А., Гармаев Д.Э.** Стресс-протективное действие настойки *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim. при длительном эмоциональном стрессе 96

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Naryzhnaya N.V., Tsibulnikov S.Yu., Mukhomedzyanov A.V., Maslov L.N.** Participation of bradykinin, cannabinoid, and vanilloid receptors in the infarct-limiting effect of adaptation to normobaric hypoxia 5
- Prokopieva V.D., Vetlugina T.P., Yarygina E.G., Plotnikov E.V., Bochan N.A.** Role of the anionic component in manifestation of effects of organic lithium salts on oxidative modification of blood proteins and lipids in patients with depressive disorders 13
- Alekseev V.V., Kade A.Kh.** Functional and correlational relationship between indexes of the metabolic activity of neutrophils and α -defensins in animals of different age groups in the dynamics of acute somatic pain 21
- Abakumova T.V., Gening S.O., Dolgova D.R., Antoneva I.I., Gening T.P., Fedotova A.Yu.** Transcription factors HIF-1 α and NF- κ B of tumor tissue and ascites cells in advanced ovarian cancer 30
- Kazakov O.V., Poveshchenko A.F., Orlov N.B., Reiter T.V., Poveshchenko O.V., Kabakov A.V., Strunkin D.N., Lykov A.P., Konenkov V.I.** Relationship between lymph concentration of cytokines and structural transformations in mesenteric lymph nodes in chemotherapy, surgical treatment, and chemotherapy of experimental breast cancer 37
- Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu.** Correction of the the liver morpho-functional state with stem cells in acute hepatitis 46
- Savilov P.N.** Hepatic blood flow and oxygen tension in different types of liver damage and hyperoxia 54
- Demyashkin G.A.** Immunophenotypic characteristics of spermatogenesis in idiopathic male infertility 63
- Voronkov A.V., Gerashchenko A.D.** Endothelium-protective properties of ATACL and catechin hydrate in exhaustive exercise of rat 74

BRIEF MESSAGE

- Uspenskaya M.S., Lyapina M.G., Maistrenko E.S.** A heparinoid from peony roots (*Paeonia anomala*): effects on polymerization and dissolution of fibrin in thrombosis 80
- Gevorgyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G.** A phenomenon of hypersensitivity to the diabetogenic effect of total RNA in rats that had alloxan diabetes 85
- Tinkov A.A., Ajsuvakova O.P., Skalnaya M.G., Karganov M.Yu., Chang S.J.-S., Skalny A.V.** Measuring changes in serum, hair and urinary levels of cobalt, copper, manganese, and iron in obesity and hypertension using the ICP-MS technique 89
- Razuvaeva Ya.G., Toropova A.A., Garmayev D.E.** Stress-protective effect of the *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim tincture in chronic emotional stress 96

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Степанов И.А., Белобородов В.А., Шамеева М.А.** Молекулярно-генетические механизмы формирования очагов гетеротопической оссификации..... 102
- Пальцын А.А.** Остеокальцин..... 111
- Туйзарова И.А., Свеклина Т.С., Козлов В.А., Сардинов Р.Т.** Роль кальция и витамина D в формировании артериальной гипертензии 117

МЕТОДИКА

- Денисова Ю.В., Мандра Е.В., Ляндуп А.В., Александров Л.С., Ищенко А.И., Никонов А.П.** Выбор оптимального метода повреждения матки при создании модели для проведения доклинических исследований..... 124

CONTENTS

REVIEWS

- Stepanov I.A., Beloborodov V.A., Shameeva M.A.** Molecular and genetic mechanisms of heterotopic ossification 102
- Paltsyn A.A.** Osteocalcin 111
- Tausarova I.A., Sveklina T.S., Kozlov V.A., Sardinov R.T.** The role of calcium and vitamin D in arterial hypertension 117

METHODS

- Denisova Yu.V., Mandra E.V., Lyundup A.V., Aleksandrov L.S., Ischenko A.I., Nikonov A.P.** Selecting an optimal model of uterine damage for preclinical studies 124

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.9,616-092.19

Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Мухомедзянов А.В., Маслов Л.Н.

К вопросу об участии брадикининовых, каннабиноидных и ванилоидных рецепторов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к нормобарической гипоксии

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
634012, г. Томск, Россия, ул. Киевская, д. 111а

Известно, что при хронической умеренной гипоксии формируется неспецифическая резистентность миокарда к повреждению при ишемии и следующей за ней реперфузии. Однако рецепторные механизмы формирования подобной устойчивости исследованы недостаточно. **Цель исследования** – изучение участия брадикининовых, каннабиноидных и ванилоидных рецепторов (TRPV1-каналов) в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической нормобарической гипоксии. **Методика.** Исследование выполнено на самцах крыс Вистар адаптированных к гипоксии, для чего животных подвергали непрерывной нормобарической гипоксии (ННГ) в течение 21 сут при 12% рО₂, 0,3% рСО₂. У крыс воспроизводили коронароокклюзию наложением лигатуры на левую нисходящую коронарную артерию в ее верхней трети на 45 мин. Реперфузию осуществляли путем освобождения лигатуры с визуальным контролем возобновления коронарного кровообращения по гиперемии ишемизированной области. Продолжительность реперфузии 2 ч. Для выявления зоны риска лигатуру вновь затягивали и в аорту вводили 5%-й раствор перманганата калия. Участок миокарда, не подвергшийся ишемии, окрашивался, неокрашенный участок являлся зоной риска. Срезы левого желудочка толщиной 2 мм окрашивали 1% раствором 2,3,5-трифенилтетразолия (37 °С, 30 мин). Размер зоны некроза и зоны риска определяли планиметрически с помощью программы Ellipse 2.02 (ViDiTo, Чешская республика). Для ингибирования каннабиноидных СВ1-рецепторов и СВ2-рецепторов использовали соответственно их селективные антагонисты римонабант (1 мг/кг) и AM630 (2,5 мг/кг); селективный антагонист НОЕ140 (50 мкг/кг) применяли для инактивации брадикининовых В2-рецепторов, капсазепин (3 мг/кг) – ванилоидных рецепторов (TRPV1-каналов). Все антагонисты вводили за 15 мин до коронароокклюзии. **Результаты.** Показано, что размер некротического повреждения миокарда у крыс адаптированных к гипоксии составляет 33% процента от размера зоны риска (53% у неадаптированных), что свидетельствует о выраженном инфаркт-лимитирующем эффекте. Этот эффект не проявлялся при ингибировании В2-брадикининовых рецепторов. Блокада каннабиноидных или ванилоидных рецепторов не влияла на инфаркт-лимитирующее действие ННГ. Следовательно, инфаркт-лимитирующий эффект ННГ зависит от активации брадикининовых В2-рецепторов, адаптационное повышение толерантности сердца к ишемии/реперфузии не зависит от каннабиноидных или ванилоидных рецепторов. **Заключение.** Брадикининовые рецепторы можно рассматривать в качестве одного из ключевых механизмов формирования инфаркт-лимитирующего действия ННГ. Учитывая данные о важной роли опиоидных рецепторов в кардиопротекции при ННГ, можно говорить о реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической гипоксии через Gi/o-протеин-сопряженные опиоидные и брадикининовые рецепторы. Каннабиноидные рецепторы и TRPV1-каналы не участвуют в инфаркт-лимитирующем действии адаптации к нормобарической гипоксии.

Ключевые слова: миокард; ишемия; реперфузия; каннабиноидные рецепторы; брадикининовые рецепторы; TRPV1-каналы; хроническая гипоксия.

Для цитирования: Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Мухомедзянов А.В., Маслов Л.Н. К вопросу об участии брадикининовых, каннабиноидных и ванилоидных рецепторов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к нормобарической гипоксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 5-12.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.5-12

Для корреспонденции: Нарыжная Наталья Владимировна, e-mail: natalynar@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, Грант № 16-15-10001. Исследование с НОЕ140 выполнено в рамках госзадания АААА-А15-115120910024-0.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н.; сбор и обработка материала – Цибульников С.Ю., Мухомедзянов А.В.; статистическая обработка – Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю.; написание текста – Нарыжная Н.В.; редактирование – Маслов Л.Н.

Поступила 08.02.2020

Принята к печати 20.04.2020

Опубликовано 28.05.2020

Naryzhnaya N.V., Tsubulnikov S.Yu., Mukhomedzyanov A.V., Maslov L.N.

Participation of bradykinin, cannabinoid, and vanilloid receptors in the infarct-limiting effect of adaptation to normobaric hypoxia

Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center,
Kievskaya Str. 111a, Tomsk 634012, Russia

Aim. Chronic moderate hypoxia is known to induce nonspecific myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury. However, receptor-mediated mechanisms of this resistance are understudied. The aim of this study was to investigate the involvement of bradykinin, cannabinoid, and vanilloid (TRPV1 channel) receptors in development of the infarction-limiting effect of chronic normobaric hypoxia (CNH). **Methods.** The study was performed on male Wistar rats exposed to CNH at 12% pO₂ and 0.3% pCO₂ for 21 days. Coronary occlusion was induced by ligation of the left descending coronary artery at the upper third of the artery for 45 min, which was followed by 2-h reperfusion produced by releasing the ligature under visual control of the recovery of coronary blood flow by hyperemia of the ischemic area. For detection of the area at risk, the ligature was tightened again, and 5% potassium permanganate solution was infused into the aorta to stain the nonischemic myocardial area. 2-mm sections of the left ventricle were stained with 1% solution of 2,3,4-triphenyl tetrazolium (37 °C, 30 min). Necrotic area and area at risk were measured planimetrically with the tEclipse 2.02 (ViDiTo, Czech Republic) software. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors were inhibited with their respective antagonists, rimonabant (1 mg/kg) and AM630 (2.5 mg/kg); bradykinin B2 receptors were inactivated with the selective antagonist HOE140 (50 µg/kg); and vanilloid receptors (TRPV1 channels) were inhibited with capsazepine (3 mg/kg). All antagonists were administered 15 minutes prior to coronary occlusion. **Results.** The size of necrotic area was 33% of the area at risk in rats adapted to hypoxia vs. 53% in non-adapted rats. This infarct-limiting effect of adaptation to hypoxia was abolished by inhibition of B2-bradykinin receptors. Blockade of cannabinoid or vanilloid receptors did not change the infarct-limiting effect of CNH. Therefore, the infarction-limiting effect of CNH depends on activation of bradykinin B2 receptors but not of cannabinoid or vanilloid receptors. **Conclusion.** Activation of bradykinin receptors can be considered a key mechanism of the infarct-limiting effect of CNH. Since opioid receptors are known to play an important role in CNH cardioprotection, the infarct-limiting effect of CNH may be mediated by Gi/o-coupled opioid and bradykinin receptors. Cannabinoid receptors and TRPV1-channels do not contribute to the infarct-limiting effect of adaptation to normobaric hypoxia.

Keywords: myocardium; ischemia; reperfusion; cannabinoid receptor; bradykinin receptor; TRPV1-channel; chronic hypoxia.

For citation: Naryzhnaya N.V., Tsubulnikov S.Yu., Mukhomedzyanov A.V., Maslov L.N. Participation of bradykinin, cannabinoid and vanilloid receptor in the mechanism of infarct-limiting effect of adaptation to normobaric hypoxia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 5-12. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.5-12

For correspondence: **Natalia V. Naryzhnaya**, Doctor of Medical Sciences, Leading scientist, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science, Tomsk, Russia; 111a, Kievskaya Street, Tomsk, 634012, E-mail: natalynar@yandex.ru.

Foundation. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research Grant № 16-15-10001. The study with HOE140 was performed as part of the state task AAAA-A15-115120910024-0.

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

Contribution: the concept and design of the study – Naryzhnaya N.V., Maslov L.N.; collection and processing of material – Tsubulnikov S.Yu., Mukhomedzyanov A.V.; statistical processing – Naryzhnaya N.V., Tsubulnikov S.Yu.; writing a text – Naryzhnaya N.V.; editing – Maslov L.N.

Information about the authors:

Naryzhnaya N.V., <https://orcid.org/0000-0003-2264-1928>

Tsubulnikov S.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-1534-2516>

Mukhomedzyanov A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1808-556X>

Maslov L.N., <https://orcid.org/0000-0002-6020-1598>

Received 08.02.2020

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Введение

Проблема защиты миокарда при ишемическом повреждении остается актуальной, несмотря на значительный прогресс в данной области. Причиной этого является, в частности, отсутствие эффективных кардиопротекторных препаратов, не обладающих сильными побочными эффектами. Эффективность применяемой в настоящий момент терапии бета-адреноблокаторами, агонистами альфа-2-адренорецепторов, блокаторами кальциевых каналов, нитратами, статинами, макроэргическими соединениями недостаточна для защиты от ишемии, что, при наличии множества побочных эффектов ставит под сомнение целесообразность их применения. Поиск новых средств для защиты миокарда при ишемическом-реперфузионном повреждении остается актуальной задачей современной фармакологии.

Одним из путей направленного поиска таких средств является исследование механизмов неспецифической адаптационной устойчивости миокарда к ишемическому повреждению. Так, известно, миокард животных при умеренной хронической гипоксии более устойчив к ишемической атаке, чем миокард интактных животных [1, 2]. Этот феномен изучается на протяжении 60 лет, однако многие стороны формирования адаптационной устойчивости миокарда по-прежнему не ясны. Недостаточно изученными остаются рецепторные механизмы устойчивости. Имеются многочисленные данные об изменении представительства адренорецепторов на мембранах кардиомиоцитов у животных, адаптированных к гипоксии в различных режимах [3, 4], а также данные по изменению активности Gs-белков, опосредующих внутриклеточный ответ при активации этих рецепторов [5]. Лишь в нескольких исследованиях, проведенных с блокаторами адренорецепторов, показано участие альфа-1 типа этих рецепторов в сохранении сократительной активности миокарда [6] и бета-1-адренорецепторов в формировании инфаркт-лимитирующего действия эффекта [7] у крыс, адаптированных к хронической прерывистой гипобарической гипоксии. Известно об увеличении экспрессии М-холинорецепторов на мембранах кардиомиоцитов при адаптации к хронической прерывистой гипоксии [8], однако доказано лишь их участие в формировании проаритмогенного эффекта экспериментального апноэ [9]. В отношении участия аденозиновых рецепторов данные литературы свидетельствуют, что активация аденозиновых рецепторов является пусковым механизмом для реализации кардиореспираторных эффектов только при острой гипоксии и их

активность ослабевает уже на 7 сут хронической гипоксии [10]. Роль аденозиновых рецепторов в кардиопротекции при хронической гипоксии не исследована.

Исследованию участия опиоидных рецепторов в защитных эффектах хронической гипоксии посвящен ряд наших работ, установлена зависимость антиаритмического эффекта прерывистой гипобарической гипоксии от активации дельта-опиоидных рецепторов [11]. Исследованиями последних лет показали повышение выработки эндогенных опиоидов при адаптации крыс к хронической нормобарической гипоксии [1]. При этом блокирование мю- или дельта-1 опиоидных рецепторов предупреждало проявление инфаркт-лимитирующего [1] или цитопротекторного действия [2] адаптации к хронической нормобарической гипоксии.

Одними из рецепторов, играющих важную роль в поддержании устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению, являются брадикининные рецепторы [12]. Установлено, что при воздействии ишемического стимула брадикининные В2-рецепторы участвуют в формировании инфаркт-лимитирующего и антиаритмического эффекта ишемического прекондиционирования, а экзогенные агонисты этих рецепторов имитируют этот феномен [12]. Установлено, что в ответ на острую гипоксию увеличивается экспрессия брадикининных рецепторов [13], однако исследований, подтверждающих участие этих рецепторов в защите миокарда от ишемического-реперфузионного повреждения у особей, адаптированных к хронической гипоксии, не проводилось.

Несмотря на достаточно детально исследованное участие каннабиноидных рецепторов в регуляции устойчивости миокарда к ишемии и в реализации протекторных эффектов кондиционирующих воздействий [14], информация об их роли при хронической гипоксии очень лаконична. Известно об увеличении содержания эндоканнабиноида анандамида в ткани легких при острой гипоксии [15]. Зависимость протекторных эффектов хронической умеренной гипоксии от активации каннабиноидных рецепторов не установлена.

Ванилоидные рецепторы (TRPV1-каналы) так же, как и опиоидные, каннабиноидные или брадикининные рецепторы, участвуют в поддержании устойчивости миокарда к ишемии и реализации кардиопротекторного действия кондиционирования [16]. Увеличение экспрессии TRPV1-каналов в гладкомышечных клетках легочной артерии происходит при острой [17] и хронической гипоксии [18]. Однако исследования участия этого рецептора в защитных эффектах долгосрочной адаптации к гипоксии не проводились.

Цель исследования — изучение участия брадикининовых, каннабиноидных и ванилоидных рецепторов (TRPV1-каналов) в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта непрерывной нормобарической гипоксии (ННГ).

Методика

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. Исследования одобрены этическим комитетом НИИ кардиологии ТНИМЦ, все болезненные процедуры с животными проводили под наркозом. В исследование включено 117 самцов крыс Вистар массой 250–300 г. Животные были произвольно разделены на 10 экспериментальных групп — 5 опытных групп (адаптированные к гипоксии) и 5 контрольных групп, содержащихся в стандартных условиях вивария. Адаптацию к гипоксии моделировали непрерывным содержанием крыс при 12% рО₂ и 0,3% рСО₂ и нормальном атмосферном давлении в специальной камере в течение 21 сут [1, 2]. Контроль над состоянием газовой среды осуществляли с помощью датчиков TCO₂-IR и OLC 20 (Oldham) и аппарата «Био-Нова-204G4R1» (НТО «Био-Нова») через блок управления MX 32 (Oldham). За 24 ч до начала эксперимента животных опытных групп извлекали из гипоксической камеры.

Процедуру коронароокклюзии выполняли под наркозом (а-хлоралоза 100 мг/кг внутривенно) в условиях искусственной вентиляции атмосферным воздухом через интубированную трахею (аппарат ИВЛ SAR-830 Series, Central Wisconsin Engineers Inc., Schofield, США). Для выполнения коронароокклюзии грудную клетку вскрывали на уровне V межреберья слева от грудины, сердце освобождали от перикарда и накладывали лигатуру на левую нисходящую коронарную артерию в ее верхней трети на 45 мин. Реперфузию осуществляли освобождением лигатуры под визуальным контролем возобновления коронарного кровообращения (гиперемия ишемизированной области) [1]. Продолжительность реперфузии составляла 2 ч. Сердце извлекали из грудной клетки и промывали через аорту физиологическим раствором. Для выявления зоны риска в миокарде лигатуру, наложенную ранее на левую коронарную артерию, вновь затягивали и в аорту вводили 5% раствор перманганата калия. Таким образом, участок миокарда, не подвергшийся ишемии, прокрашивался, а непрокрашенный участок миокарда являлся зоной риска. После ополаскивания миокар-

да физиологическим раствором, разделяли и взвешивали правый и левый желудочки. Из левого желудочка готовили срезы толщиной 2 мм параллельно оси сердца. Срезы окрашивали 1% раствором 2,3,5-трифенилтетразолия (37 °С, 30 мин). Восстановление 2,3,5-трифенилтетразолия сукцинатдегидрогеназой и другими клеточными дегидрогеназами приводит к окрашиванию миокарда в розовый цвет. Дегидрогеназы «вымываются» из зоны некроза при повреждении мембран кардиомиоцитов (при некрозе и его формах), поэтому «инфарктный» миокард, в котором значительная часть клеток уже некротизирована, остаётся неокрашенным. Срезы фиксировали 1 сут в 10% растворе нейтрального формалина [1], сканировали (Scanjet G2710), размер зоны некроза и зоны риска (гипоперфузии) определяли планиметрически с помощью программы Ellipse 2.02 (ViDiTo, Чешская республика). Величину инфаркта выражали в процентах от размера зоны риска и в процентах от размера левого желудочка.

Для ингибирования рецепторов применяли соответственно: антагонист каннабиноидных СВ1-рецепторов римонабант (1 мг/кг), селективный антагонист каннабиноидных СВ2-рецепторов AM630 (2,5 мг/кг), селективный антагонист брадикининовых В2-рецепторов НОЕ140 (50 мкг/кг), антагонист ванилоидных рецепторов (TRPV1-каналов) капсазепин (3 мг/кг). Все антагонисты вводили за 15 мин до коронароокклюзии. Выбор доз фармакологических агентов проводили на основе данных литературы [19–22].

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 13.0 (StatSoft, Inc.). Полученные данные проверяли на соответствие нормальному распределению с помощью критериев Колмогорова-Смирнова (с поправкой Лиллиефорса) и критерия Шапиро-Уилка. Проверку на гомогенность дисперсий производили с использованием критерия Левене. Данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей Me (25; 75). При сравнении нескольких независимых выборок количественных данных использовали two way ANOVA, с последующим применением апостериорного критерия (поправка Бонферрони). Пороговое значение уровня значимости *p* принято равным 0,05.

Результаты

Коронароокклюзия и последующая реперфузия приводили к развитию некротического повреждения миокарда, зона которого составляла 53% от размера ишемизированной области (зоны риска) (**рис.**). У крыс, адаптированных к нормобарической гипоксии размер формирующегося инфаркта составлял лишь 33%, сле-

довательно, мы наблюдали выраженный инфаркт-лимитирующий эффект. Результаты представлены в таблице и на рисунке. Как показывают данные таблицы отмечается гипертрофия правого желудочка миокарда, характерная для состояния хронической гипоксии.

Обнаружено, что ингибирование каннабиноидных СВ1-рецепторов селективным антагонистом римонабантом не приводило к изменению размера инфаркта у крыс, адаптированных к непрерывной нормобарической гипоксии (ННГ). Эти данные свидетельствуют о том, что СВ1-каннабиноидные рецепторы не участвуют в формировании инфаркт-лимитирующего действия ННГ. Введение селективного антагониста СВ2-каннабиноидных рецепторов (АМ630) так же не влияло на размер инфаркта при коронароокклюзии и реперфузии у крыс, адаптированных к ННГ. Полученные данные позволяют говорить о том, что СВ1 и СВ2-каннабиноидные рецепторы не участвуют в инфаркт-лимитирующем действии гипоксии.

Блокада брадикининовых В2-рецепторов селективным антагонистом НОЕ140 приводила к увеличению размера инфаркта у крыс, адаптированных к ННГ, то есть устраняла протекторное действие адаптации к гипоксии. Эти данные свидетельствуют о том, что брадикининовые рецепторы участвуют в формировании инфаркт-лимитирующего действия ННГ.

Ингибирование ванилоидных рецепторов (TRPV1-каналов) селективным блокатором капсазепином не влияло на размер формирующегося инфаркта у крыс после курса ННГ. Полученные данные позволяют сделать заключение об отсутствии связи ванилоидных рецепторов с формированием кардиопротекции при адаптации к нормобарической гипоксии.

Введение селективных антагонистов каннабиноидных, брадикининовых и ванилоидных рецепторов (римонабанта, АМ630, НОЕ140 или капсазепина соответственно) не повлияло на размер инфаркта у неадаптированных крыс при коронароокклюзии-реперфузии.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении брадикининовых рецепторов в запуск защитного механизма при адаптации к хронической гипоксии. К сожалению данных, подтверждающих рост уровня брадикинина в крови и тканях при состоянии адаптации к гипоксии, мы в литературе не обнаружили. Более того, сообщается о снижении содержания брадикинина в плазме крови при хронической высокогорной гипоксии у здоровых добровольцев [23] или об отсутствии влияния гипоксии на содержание этого пептида в плазме крови [24]. Можно предположить, что повышение брадикинина в сыворотке крови или ткани миокарда адаптированных животных, так же как мы это наблюдали в случае опиоидных пептидов [1], происходит в большей степени в ответ на ишемию миокарда, оставаясь низким при отсутствии ишемического воздействия.

Обсуждая механизмы вовлечения брадикинина в инфаркт-лимитирующее действие адаптации к гипоксии важно отметить его вазодилатирующий эффект, который может лежать в основе указанного действия. Вместе с тем, рассматривая такую возможность, следует учитывать, что значимая вазодилатация привела бы к усилению коллатерального кровотока и уменьшению зоны гипоперфузии (зоны риска), что в



Срезы левого желудочка миокарда крыс.

Окраска перманганатом калия и 2,3,5-трифенилтетразолием; ННГ – непрерывная нормобарическая гипоксия.

нашем исследовании не наблюдалось (табл.). Отсутствие снижения зоны гипоперфузии под влиянием брадикинина можно видеть в других исследованиях [25], что противоречит гипотезе о значимости вазодилатации в инфаркт-лимитирующем эффекте брадикинина. Причиной отсутствия такой связи могут быть транзиторность влияния брадикинина на коронарный кровоток [26].

Наряду с опиоидными рецепторами, рецепторы к брадикинину связаны с Gi/o-белками, которые находятся на мембране кардиомиоцита. Последовательная активация рецепторов (опиоидных или брадикининовых) и Gi/o-белков приводит к запуску внутриклеточного киназного механизма, выключающего протеинкиназу C, NO-синтазу, тирозинкиназы, и в последствии к активации АТФ-чувствительных калиевых каналов митохондрий [27]. Результатом последнего является ингибирование открытия поры, регулирующей проницаемость митохондрий (МРТР), повышение устойчивости митохондрий к ионам кальция, улучшение энергетического метаболизма мито-

хондрий и, таким образом, снижение чувствительности клетки к повреждающему действию ишемии и реперфузии [28].

Отсутствие изменения размера зоны инфаркта под влиянием антагонистов каннабиноидных, брадикининовых или ванилоидных рецепторов, которое мы наблюдали у неадаптированных животных, показано ранее в ряде работ [29, 30]. Мы можем предполагать, что в отсутствие гипоксического или ишемического стимула брадикининовая, каннабиноидная и ванилоидная системы остаются в базовом состоянии с низким уровнем соответствующих рецепторам эндогенных агонистов в крови и тканях. При воздействии ишемии или гипоксии происходит увеличение выброса агонистов из депо. В случае же длительной адаптации к гипоксии эндогенные депо могут увеличиваться и выброс медиатора при ишемическом стимуле оказывается более выраженным, чем у неадаптированных особей. Подобную картину мы наблюдали в отношении эндогенных опиоидов, когда базовый уровень эндоморфинов у неадаптированных крыс был низок, несколько повышен

Таблица

Влияние антагонистов каннабиноидных, брадикининовых и ваниллоидных рецепторов на размер инфаркта при 45-минутной коронароокклюзии и 120-минутной реперфузии Me [ниж. кв; верх. кв]

Группа	Масса правого желудочка, мг	Масса левого желудочка, мг	Размер зоны риска, мг	Размер зоны инфаркта, мг	Размер инфаркта относительно зоны риска, %
Контроль	176,1 (173,0;178,8)	983,8 (974,9;988,8)	351,7 (349,1; 352,8)	187,7 (181,7; 193,2)	53,6 (51,64;55,22)
Римонабант 1 мг/кг	175,5 (174,15;176,75)	985,8 (976,4; 993,4)	352,1 (349,3; 353,9)	185,3 (182,4; 189,9)	52,6 (51,75;53,95)
AM630, 2,5 мг/кг	176,6 (174,3;178,25)	957,4 (946,2; 981,1)	362,5 (353,4; 370,1)	183,6 (178,4; 188,1)	50,4 (49,90;51,58)
НОЕ 140 50 мкг/кг	176,8 (175,3;178,95)	989,3 (966,0; 996,1)	352,5 (349,4; 354,7)	186,1 (182,4;190,8)	53,0 (51,47;54,06)
Капсазепин 3 мг/кг	176,5 (175,6;176,8)	981,2 (973,1; 990,8)	359,2 (353,5; 373,7)	184,5 (175,6; 187,7)	49,1 (47,79;53,06)
ННГ	227,3 (219,65;230,95)*	957,5 (950,3; 967,7)	366,8 (362,2; 378,8)	123,7 (120,5; 126,9)	33,9 (32,45;34,69)*
ННГ + римонабант 1 мг/кг	223,5 (221,10;229,4)	990,1 (985,6; 995,6)	376,5 (363,2; 380,6)	131,3 (123,1; 136,5)	34,7 (32,93;35,95)
ННГ + AM630 2,5 мг/кг	236,9 (228,95;242,05)	967,1 (959,0; 977,3)	364,4 (362,7; 367,7)	119,2 (116,6; 122,1)	32,8 (32,10;33,42)
ННГ + НОЕ 140 50 мкг/кг	229,4 (223,35;235,15)	980,5 (959,0; 990,2)	388,4 (382,2; 402,3)	221,1 (215,8; 225,8)	56,1 (55,75;57,17)#
ННГ + капсазепин 3 мг/кг	217,0 (212,70;223,5)	978,5 (964,7; 987,7)	376,8 (363,2; 382,2)	129,5 (127,6; 132,78)	34,4 (33,24;35,77)

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, # – с группой ННГ (непрерывной нормобарической гипоксии).

у животных в состоянии адаптации и значительно воз- растал под действием ишемии миокарда у адаптиро- ванных крыс [1]. Это может объяснить отсутствие влия- ния антагонистов исследуемых рецепторов на размер инфаркта у неадаптированных крыс.

Заключение

Полученные результаты позволяют представить брадикининовые рецепторы в качестве одного из клю- чевых механизмов формирования инфаркт-лимитиру- ющего действия непрерывной нормобарической гипоксии. Учитывая данные о важной роли опиоидных рецепторов в кардиопротекции при непрерывной но- мобарической гипоксии [1, 2], можно говорить о ре- ализации инфаркт-лимитирующего эффекта хрони- ческой гипоксии через Gi/o-протеин-сопряженные опиоидные и брадикининовые рецепторы. Каннабино- идные рецепторы и TRPV1-каналы не участвуют в ин- фаркт-лимитирующем действии адаптации к нормоба- рической гипоксии.

Литература

(п.п. 1; 2; 4-10; 13-26; 28; 30 см. References)

3. Меерсон Ф.З., Копылов Ю.Н., Балденков Г.Н. Повышение альфа-1-адренореактивности сердца крыс при адаптации к пе- риодической гипоксии. *Бюлл. экпер. биол. и мед.* 1991; 111 (6): 570-2.
11. Нарыжная Н.В., Крылатов А.В., Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Гросс Г.Дж., Стефано Дж.Б. Об участии δ -опиатных рецепто- ров и их лигандов в формировании адаптационной защиты сердца при аритмогенных воздействиях. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2001; 87(12): 1617-25.
12. Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Подоксенов Ю.К., Горбунов А.С., Жанг И., Пей Ж.-М. Роль брадикинина в механизме ишемиче- ского прекодиционирования сердца. перспективы примене- ния брадикинина в кардиохирургической практике. *Вестник РАМН.* 2015; 70(2): 188-95. DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1312
27. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Халиулин И.Г., Пей Ж.М., Жанг И., Цепочкина А.В. et al. Адаптация с помощью хронической не- прерывной нормобарической гипоксии увеличивает толерант- ность кардиомиоцитов крыс к аноксии-реоксигенации: роль протеинкиназ. *Рос. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2016; 102 (12): 1462-71.
29. Ласукова О.В., Маслов Л.Н., Ермаков С.Ю., Кроуфорд Д., Барт Ф., Крылатов А.В., Хануш Л.О. Значение каннабиноидных ре- цепторов в регуляции устойчивости миокарда к действию ише- мии и реперфузии. *Известия Российской академии наук. Серия биологическая.* 2008; 35(4): 471-8.

References

1. Maslov L.N., Naryzhnaia N.V., Tsubulnikov S.Y., Kolar F., Zhang Y., Wang H. et al. Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia. *Life Sci.* 2013; 93(9-11): 373-9. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.07.018
2. Naryzhnaya N.V., Khaliulin I., Lishmanov Y.B., Suleiman M.S., Tsubulnikov S.Y., Kolar F., Maslov L.N. Participation of opioid re-

- ceptors in the cytoprotective effect of chronic normobaric hypoxia. *Physiol. Res.* 2019; 68(2): 245-53. DOI: 10.33549/physiolres.933938
3. Meerson F.Z., Kopylov Iu.N., Baldenkov G.N. Increase of alpha 1-ad- renoreactivity of the rat heart in adaptation to periodic hypoxia. *Bulleten Eksperimentalnoy Biologii i Meditsiny* 1991; 111(6): 570-2. (In Russian)
4. Hahnova K., Kasparova D., Zurmanova, J., Neckar J., Kolar F., No- votny J. β -Adrenergic signaling in rat heart is similarly affected by continuous and intermittent normobaric hypoxia. *General Physiology and Biophysics.* 2016; 35(02), 165-73. DOI:10.4149/gpb_2015053
5. Hrbasová M., Novotny J., Hejnová L., Kolář F., Neckář J., Svoboda P. Altered myocardial G s protein and adenylyl cyclase signaling in rats ex- posed to chronic hypoxia and normoxic recovery. *J. Appl. Physiol. [Internet].* 2003; 94(6): 2423-32. DOI/10.1152/jappphysiol.00958.2002
6. Wang Y.-P., Cui F., Zhang L.-P., Yang C.-Y., Guan, Y., Zhou Z.-N., Zhang Y. Effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia on α (1)- adrenergic receptor of myocardium participates in the cardioprotec- tion. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica].* 2009; 61(1): 21- 6. <http://europepmc.org/abstract/MED/19224050>
7. Mallet R.T., Ryou M.-G., Williams A.G., Howard L., Downey H.F. β 1-Adrenergic receptor antagonism abrogates cardioprotective ef- fects of intermittent hypoxia. *Basic Research in Cardiology.* 2006; 101(5): 436-46. DOI:10.1007/s00395-006-0599-y
8. Richalet J.-P., Kacimi R., Antezana A.-M. The control of cardiac chronotropic function in hypobaric hypoxia. *International Journal of Sports Medicine.* 1992; 13(S1): S22-24. DOI: 10.1055/s-2007-1024582
9. Bober S.L., Ciriello J., Jones D.L. Atrial arrhythmias and autonom- ic dysfunction in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart and Circ. Physiol.* 2018; 314(6): H1160-68. DOI: 10.1152/ajpheart.00173.2017
10. Walsh M.P., Marshall J.M. The role of adenosine in the early respi- ratory and cardiovascular changes evoked by chronic hypoxia in the rat. *The Journal of Physiology.* 2006; 575(1): 277-89. <http://DOI.wiley.com/10.1113/jphysiol.2006.108779>
11. Naryzhnaya N.V., Krylatov A.V., Maslov L.N., Lishmanov Yu. B., Gross G. J., Stefano J. B. Role of δ -opiate receptors and their ligands in the development of adaptive heart protection against arrhythmo- genesis. *Rossiyskiy Fizyologicheskiy Zhurnal im I.M. Sechenova.* 2001; 87(12): 1617-25. (In Russian)
12. Maslov L.N., Naryzhnaia N.V., Podoksenov Iu.K., Gorbunov A.S., Zhang Y., Pei J.M. Role of Bradikynin in the Mechanism of Ischemic Preconditioning of the Heart. Prospects of Bradykinin Appli- cation in Cardiosurgical Praxis. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Medit- sinskikh Nauk.* 2015; (2): 188-95. DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1312. (In Russian)
13. Liesmaa I., Leskinen H.K., Kokkonen J.O., Ruskoaho H., Kovanen P.T., Lindstedt K.A. Induced expression of type-2 receptors in endo- thelial cells triggers NO production, cell migration, and angiogene- sis. *J. Cell. Physiol.* 2009; 221(2): 359-66. DOI: 10.1002/jcp.21861
14. Maslov L.N., Khaliulin I., Zhang Y., Krylatov A.V., Naryzhnaya N.V., Mechoulam R. et al. Prospects for creation of cardioprotective drugs based on cannabinoid receptor agonists. *J. Cardiovasc. Phar- macol. Ther.* 2016; 21(3): 262-72. doi: 10.1177/1074248415612593
15. Wenzel D., Matthey M., Bindila L., Lerner R., Lutz B., Zimmer A. Endo- cannabinoid anandamide mediates hypoxic pulmonary vaso- constriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 2013; 110(46): 18710-5. DOI:10.1073/pnas.1308130110
16. Gorbunov A.S., Maslov L.N., Jaggi A.S., Singh N., De Petrocellis L., Boshchenko A.A. et al. Physiological and pathological role of TRPV1,

- TRPV2 and TRPV4 channels in heart. *Curr. Cardiol. Rev.* 2019; 15(4): 244-251. DOI: 10.2174/1573403X15666190307112326
17. Parpaite T., Cardouat G., Mauroux M., Gillibert-Duplantier J., Robillard P., Quignard J.F. et al. Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 2016; 468(1): 111-30. DOI: 10.1007/s00424-015-1704-6
 18. Wang Y.X., Wang J., Wang C., Liu J., Shi L.P., Xu M., Wang C. Functional expression of transient receptor potential vanilloid-related channels in chronically hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells. *J. Membr. Biol.* 2008; 223(3): 151-9. DOI:10.1007/s00232-008-9121-9
 19. Lichtman A.H., Wiley J.L., LaVecchia K.L., Nevaser S.T., Arthur D.B., Wilson D.M., Martin B.R. Effects of SR 141716A after acute or chronic cannabinoid administration in dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 357(2-3): 139-48. DOI: 10.1016/S0014-2999(98)00558-5
 20. Heymann H.M., Wu Y., Lu Y., Qvit N., Gross G.J., Gross E.R. Transient receptor potential vanilloid 1 inhibitors block laparotomy- and opioid-induced infarct size reduction in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2017; 174(24): 4826-35. DOI: 10.1111/bph.14064
 21. Gross G.J., Hsu A., Gross E.R., Falck J.R., Nithipatikom K. Factors mediating remote preconditioning of trauma in the rat heart: central role of the cytochrome P450 epoxygenase pathway in mediating infarct size reduction. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2013; 18(1): 38-45. DOI: 10.1177/1074248412437586
 22. Toguri J.T., Moxsom R., Szczesniak A.M., Zhou J., Kelly M.E., Lehmann C. Cannabinoid 2 receptor activation reduces leukocyte adhesion and improves capillary perfusion in the iridial microvasculature during systemic inflammation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2015; 61(2): 237-49. DOI: 10.3233/CH-151996
 23. Mason N.P., Petersen M., Mélot C., Kim E.V., Aldashev A., Sarybaev A.R. et al. Changes in plasma concentration and citric acid cough threshold at high altitude. *Wilderness Environ Med.* 2009; 20(4): 353-8. DOI: 10.1580/1080-6032-020.004.0353
 24. Ashack R., Farber M.O., Weinberger M.H., Robertson G.L., Fineberg N.S., Manfredi F. Renal and hormonal responses to acute in normal individuals. *J. Lab. Clin. Med.* 1985; 106(1): 12-6. PMID: 2989395
 25. Cohen M.V., Philipp S., Krieg T., Cui L., Kuno A., Solodushko V., Downey J.M. Preconditioning-mimetics bradykinin and DADLE activate PI3-kinase through divergent pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2007; 42(4): 842-51. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2007.01.004
 26. Driamov S.V., Bellahcene M., Butz S., Buser P.T., Zaugg C.E. Bradykinin is a mediator, but unlikely a trigger, of antiarrhythmic effects of ischemic preconditioning. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2007; 18(1): 93-9. DOI: 10.1111/j.1540-8167.2006.00688.x
 27. Naryzhnaya N.V., Maslov L.N., Khaliulin I.G., Zhang Y., Pei J.M., Tsepokina A.V. et al. Chronic continuous normobaric hypoxia augments cell tolerance to anoxia-reoxygenation: the role of protein kinases. *Rossiyskiy Fizjologicheskii Zhurnal im I.M. Sechenova.* 2016; 102(12): 1462-71. (In Russian)
 28. Prokudina E.S., Naryzhnaya N.V., Mukhomedzyanov A.V., Gorbunov A.S., Zhang Y., Yaggi A.S. et al. Effect of chronic continuous normobaric hypoxia on functional state of cardiac mitochondria and tolerance of isolated rat heart to ischemia and reperfusion: Role of μ and delta2 Opioid Receptors. *Physiol. Res.* 2019; 68(6): 909-20. DOI:10.33549/physiolres.933945
 29. Lasukova O.V., Maslov L.N., Ermakov S.Yu., Krylatov A.V., Crawford D., Barth F., Hanus L.O. Role of cannabinoid receptors in regulation of cardiac tolerance to ischemia and reperfusion. *Isvestiya Rossiyskoy Akademii nauk. Biol. Bull.* 2008; 35(4): 404-10. (In Russian)
 30. Yu J., Chen K., Wu L., Liu X., Lu Y. Anesthetic propofol blunts remote preconditioning of trauma-induced cardioprotection via the TRPV1 receptor. *Biomed Pharmacother.* 2019; 118: 109308. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109308

Сведения об авторах:

Нарыжная Наталья Владимировна, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии «НИИ кардиологии» Томского НИМЦ, e-mail: natalynar@yandex.ru;

Цибульников Сергей Юрьевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии «НИИ кардиологии» Томского НИМЦ, e-mail: tsibulnikov1986@mail.ru;

Мухомедзянов Александр Валерьевич, мл. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии «НИИ кардиологии» Томского НИМЦ, e-mail: sasha_m91@mail.ru;

Маслов Леонид Николаевич, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. экспериментальной кардиологии «НИИ кардиологии» Томского НИМЦ, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.4:616.89:615.01

Прокопьева В.Д., Ветлугина Т.П., Ярыгина Е.Г., Плотников Е.В., Бохан Н.А.

Роль анионного компонента в проявлении эффектов органических солей лития на окислительную модификацию белков и липидов крови больных депрессивными расстройствами

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Томского НИМЦ РАН,
634014, г. Томск, Россия, ул. Алеутская, д. 4

Введение. Литиевые соли широко используются в психиатрии. Изучение новых свойств солей лития с различными анионными компонентами является важной задачей. **Цель** исследования – изучение *in vitro* эффектов солей лития, содержащих разные органические анионные компоненты, на модификацию белков и липидов плазмы крови пациентов с депрессивными расстройствами (ДР). **Методика.** Инкубацию крови пациентов ДР с солями лития (аскорбат лития, сукцинат лития и пируват лития) проводили в течение 1 ч при 37 °С. В качестве окислительного агента использовали 0,5% этанол. Конечная концентрация в пробах ионов лития составляла 1,2 мМ. В плазме крови определяли количество окисленных белков по уровню карбонилированных белков (КБ) с использованием 2,4-динитрофенилгидразина, продукты перекисного окисления липидов – по содержанию продуктов, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных продуктов, ТБК-РП). **Результаты.** У пациентов с ДР уровень КБ повышался по сравнению с контролем (здоровые лица), а концентрация ТБК-РП не отличалась от нормы. Инкубация крови здоровых лиц с 0,5%-ным этанолом приводила к увеличению содержания КБ и ТБК-РП плазмы, на уровень окисленных белков и липидов плазмы крови пациентов ДР в тех же условиях этанол влияния не оказывал. Аскорбат лития и пируват лития в присутствии этанола увеличивал уровень КБ в плазме крови пациентов ДР, сукцинат лития в этих условиях на КБ значимого эффекта не оказывал. На уровень ТБК-РП плазмы крови пациентов ДР все исследуемые соединения влияния не оказывали. В крови здоровых доноров соли лития проявляли антиоксидантный эффект, повышая устойчивость макромолекул плазмы к токсическому (окислительному) действию этанола. **Заключение.** Исследуемые соли лития в условиях эксперимента с применением в качестве окислительного агента этанола оказывали антиоксидантное действие на белки и липиды плазмы крови здоровых лиц. Соли лития, имеющие в своем составе анионы аскорбата или пирувата, проявляли прооксидантный эффект в образцах крови пациентов с депрессивными расстройствами, усиливая окислительное действие этанола на белки, но не на липиды плазмы. Таким образом, соли лития оказывают различное действие на окислительную модификацию белков и липидов крови здоровых лиц и пациентов депрессивными расстройствами *in vitro*, при этом анионный компонент соли играет важную роль в проявлении эффектов соединений.

Ключевые слова: сукцинат лития; пируват лития; аскорбат лития; анионный компонент, карбонилированные белки; ТБК-реактивные продукты; депрессивные расстройства.

Для цитирования: Прокопьева В.Д., Ветлугина Т.П., Ярыгина Е.Г., Плотников Е.В., Бохан Н.А. Роль анионного компонента в проявлении эффектов органических солей лития на окислительную модификацию белков и липидов крови больных депрессивными расстройствами. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 13-20.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.13-20

Для корреспонденции: Прокопьева Валентина Даниловна, e-mail: valyaprok@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда, проект №17-75-20045.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Прокопьева В.Д., Плотников Е.В.; сбор и обработка материала – Прокопьева В.Д., Ветлугина Т.П., Ярыгина Е.Г., Плотников Е.В., Бохан Н.А.; статистическая обработка – Ярыгина Е.Г., Плотников Е.В.; написание текста – Прокопьева В.Д.; редактирование – Ветлугина Т.П., Бохан Н.А.

Поступила 17.06.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликовано 28.05.2020

Prokopieva V.D., Vetlugina T.P., Yarygina E.G., Plotnikov E.V., Bochan N.A.

Role of the anionic component in manifestation of effects of organic lithium salts on oxidative modification of blood proteins and lipids in patients with depressive disorders

Research Institute of Mental Health, Tomsk National Research Medical Center,
Aleutskaya Str. 4, Tomsk 634014, Russia

Introduction. Lithium salts are widely used in psychiatry. Studying new properties of lithium salts with various anionic components is important. The **aim** of this study was to compare *in vitro* effects of lithium salts containing different organic anionic components on oxidative modification of plasma proteins and lipids in patients with depressive disorders (DD). **Methods.** Blood of DD patients was incubated with lithium salts (lithium ascorbate, lithium succinate, and lithium pyruvate) at 37 °C for 1 hour. Ethanol was used as an oxidizing agent. Final concentrations of lithium ions and ethanol in a sample were 1.2 mM and 0.5%, respectively. Plasma content of oxidized proteins was determined by the content of carbonylated proteins (CP) using 2,4-dinitrophenylhydrazine. Lipid peroxidation products were determined by the content of thiobarbituric acid-reactive products (TBA-RP). **Results.** In DD patients, concentration of CP was increased compared to the control (healthy subjects) whereas concentration of TBA-RP did not differ from the control. Incubation of blood from healthy individuals with 0.5% ethanol resulted in increases in both the CP and TBA-RP whereas ethanol did not exert any effect on concentrations of oxidized proteins and TBA-RP in DD patients in the same conditions. Lithium ascorbate and lithium pyruvate in the presence of ethanol increased the CP concentration in blood from DD patients; lithium succinate left unchanged the CP concentration in these conditions. None of the studied compounds had any effect on TBA-RP in plasma of DD patients. In blood of healthy donors, lithium salts exerted an antioxidant effect increasing the resistance of plasma macromolecules to the toxic (oxidative) action of ethanol. **Conclusion.** The studied lithium salts produced an antioxidant effect *in vitro* on ethanol-induced oxidative modification of proteins and lipids in blood from healthy individuals. In blood samples from DD patients, lithium salts containing ascorbate or pyruvate anions showed pro-oxidant properties by potentiating the oxidative effect of ethanol on plasma proteins but not lipids. Therefore, lithium salts differently influence *in vitro* oxidative modification of proteins and lipids in blood of healthy people and DD patients with the anionic component of lithium salt playing an important role in manifestation of effects of these compounds.

Keywords: lithium succinate; lithium pyruvate; lithium ascorbate; anionic component, carbonylated proteins; TBA-reactive products; depressive disorder.

For citation: Prokopieva V.D., Vetlugina T.P., Yarygina E.G., Plotnikov E.V., Bochan N.A. Role of the anionic component in manifestation of effects of organic lithium salts on oxidative modification of blood proteins and lipids in patients with depressive disorders. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 13-20 (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.13-20

For correspondence: **Valentina D. Prokopieva**, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC) Russian Academy of Sciences; 4 Aleutskaya Str., Tomsk 634014, Russian Federation, e-mail: valyaprok@mail.ru

Acknowledgments. The study was supported by the Russian Scientific Foundation (grant # 17-75-20045).

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

Contribution: The concept and design of the study – Prokopieva V.D., Plotnikov E.V.; collection and processing of material – Prokopieva V.D., Vetlugina T.P., Yarygina E.G., Plotnikov E.V., Bochan N.A.; statistical processing – Yarygina E.G., Plotnikov E.V.; writing a text – Prokopieva V.D.; editing – Vetlugina T.P., Bochan N.A.

Information about the authors:

Prokopieva V.D., <https://orcid.org/0000-0002-4811-984X>

Vetlugina T.P., <https://orcid.org/0000-0003-2068-0931>

Yarygina E.G., <https://orcid.org/0000-0003-1047-2231>

Plotnikov E.V., <https://orcid.org/0000-0002-4374-6422>

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

Received 17.06.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Введение

Методика

Депрессии (аффективные расстройства по МКБ-10) в современном мире остаются серьезными медико-социальными и экономическими проблемами, обусловленными широкой распространенностью, коморбидностью с другими психическими и соматическими заболеваниями, трудностью терапии [1]. Биологические исследования сложной и многогранной природы аффективных расстройств все чаще включают в поле зрения окислительный стресс. В эксперименте *in vivo* на животных, и при исследовании биоматериала пациентов, было доказано, что при депрессии увеличивается окислительное повреждение белков, липидов и нуклеиновых кислот, как в ткани мозга, так и в периферических образцах [2]. На необходимость дальнейшего изучения роли окислительного стресса в патогенезе депрессий, а также и важность поиска новых потенциальных антиоксидантных препаратов для лечения депрессивных расстройств указывают Т. Liu и соавт. [3]. В этой связи актуальной задачей является разработка перспективных соединений комплексного нормотимического и антиоксидантного действия, расширяющих спектр фармакологических средств терапии психической патологии аффективного спектра.

В лечении аффективных расстройств применяют препараты лития, чаще всего в виде карбоната, которые оказывают нормотимическое (антидепрессивное, седативное и антиманиакальное) действие [4, 5]. В литературе есть данные о том, что литий в отдельности или в сочетании с оланзапином снижает перекисное окисление липидов и увеличивает общий антиоксидантный статус у пациентов с биполярным аффективным расстройством [6]. В исследовании на здоровых добровольцах, получавших терапевтические дозы лития в течение 2–4 нед, показано, что после приема препарата лития наблюдалось значительное снижение соотношения СОД/каталаза в сыворотке крови, что говорит о меньшей выраженности окислительного стресса в результате снижения уровня пероксида водорода [7]. К сожалению, при изучении эффектов литиевых препаратов авторы не всегда указывают, какая именно соль лития использовалась в исследовании. Хотя, как известно, анионный компонент соли лития также может вносить существенный вклад в терапевтический (антиоксидантный, нормотимический) и другие эффекты препарата [8, 9].

Цель исследования – сравнительное изучение *in vitro* эффектов солей лития, содержащих разные органические анионные компоненты, на окислительную модификацию белков и липидов плазмы крови больных депрессивными расстройствами.

В качестве биологического материала использовали кровь 25 больных с депрессивными расстройствами (ДР), диагноз которых по МКБ-10 квалифицировался как F3 «Аффективное расстройство настроения»: F32 – «Депрессивный эпизод» – 13 пациентов (3 мужчины, 10 женщин) и F33 – «Рекуррентное депрессивное расстройство» – 12 пациентов (2 мужчины, 10 женщин). Все пациенты проходили лечение в клинике НИИ психического здоровья Томского Национального исследовательского медицинского центра. Контрольную группу составили 24 практически здоровых человека (7 мужчин, 17 женщин). Средний возраст участников исследования составил $43,0 \pm 2,2$ года, различий по данному показателю между группами не выявлено. Забор крови осуществляли из локтевой вены утром натощак с использованием стерильной системы однократного применения Vacutainer («Becton Dickinson», США) с антикоагулянтом Sodium Heparin.

Исследование проводили с соблюдением принципов информированного согласия Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, на проведение исследований с участием людей получено разрешение локального этического комитета при НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (протокол №361 от 23.10.2017 г.).

Соли лития (Li-аскорбат, Li-пируват и Li-сукцинат) для данного исследования были синтезированы в Исследовательской школе химических и биомедицинских технологий Томского политехнического университета. В качестве анионного компонента использованы аскорбиновая кислота (аскорбат), а также кислоты цикла Кребса – сукцинат и пируват. Химический состав и чистота солей подтверждены физико-химическими методами, также ранее вольтамперометрическим методом в модельной системе по реакции электровосстановления кислорода, протекающей на катоде, была установлена высокая антиоксидантная активность этих соединений [10].

При исследовании эффектов соединений лития на окислительную модификацию белков и липидов плазмы крови в качестве токсического (окислительного) агента использовали этанол. Исследуемые образцы крови разливали в 5 пробирок по 0,6 мл. Затем в первую пробирку добавляли физиологический раствор (контроль без этанола), во вторую – физиологический раствор и этанол (контроль с этанолом). В каждую последующую пробирку добавляли раствор исследуемого соединения в физиологическом растворе (аскорбат лития, пируват лития и сукцинат лития, соответствен-

но), после чего в эти пробирки также добавляли этанол. Конечная концентрация этанола в пробах составляла 0,5%, соединений лития 1,2 ммоль/л в пересчете на ионы лития. Все пробы после инкубации в течение 1 ч при 37 °С центрифугировали 10 мин (3000 об/мин). Полученную плазму замораживали и хранили при -80 °С до исследования окисленных макромолекул.

Окислительную модификацию белков определяли по уровню карбонилированных белков (карбонилы белков, КБ) с использованием 2,4-динитрофенилгидразина (Panreac, Espana). Окислительную модификацию липидов – по содержанию ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РП) с применением набора реактивов ТБК АГАТ (ООО «Агат-Мед», РФ). Методики были адаптированы для измерения оптической плотности конечного продукта реакций в планшетах (Orangescientific, Бельгия) на спектрофотометре ЕРОСН (BioTekInstruments, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «Statistica-10». Для проверки соответствия нормальному закону распределения количественных показателей использовали критерий Шапиро–Уилка. Данные представляли в виде медианы (Me) и межквартильного интервала (QL–QU). Для оценки значимости различий использовали непараметрический критерий Манна–Уитни (Mann–Whitney,

U test). Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты исследования окислительной модификации белков плазмы крови по уровню карбониллов белков представлены в **табл. 1**.

Как видно из **табл. 1**, в контрольных пробах без этанола у больных с депрессивными расстройствами уровень карбониллов белков повышен по сравнению с соответствующими пробами здоровых лиц. Внесение в кровь этанола приводило к повышению уровня КБ в плазме крови здоровых лиц и не оказывало влияния на уровень карбониллов белков в пробах пациентов депрессивными расстройствами. В результате, различия между группами пациентов и здоровых лиц по уровню КБ в контроле с этанолом становились статистически незначимыми. Сравнительный анализ эффектов солей лития показал, что Li-аскорбат и Li-сукцинат тормозили окислительное действие этанола на белки плазмы крови здоровых лиц, статистически значимо снижая уровень КБ в этих пробах по сравнению с пробами «контроль с этанолом». В присутствии Li-пирувата снижение КБ не достигало уровня статистической значимости (**табл. 1**).

В плазме крови пациентов ДР во всех экспериментальных пробах с солями лития и этанолом уровень КБ

Таблица 1

Влияние солей лития на содержание карбониллов белков в плазме крови здоровых лиц и пациентов депрессивными расстройствами, Me (QL – QU)

Исследуемые пробы	Карбонилы белков, нмоль/мг белка	
	Здоровые (n=24)	Пациенты ДР (n=25)
Контроль без этанола	0,19 (0,15-0,23)	0,26 (0,22-0,32) ** $p < 0,001$
Контроль + этанол	0,25 (0,21-0,28) * $p < 0,001$	0,27 (0,20-0,36) * $p = 0,670$ ** $p = 0,298$
Li-аскорбат+ этанол	0,21 (0,14-0,25) * $p = 0,828$ # $p = 0,029$	0,34 (0,23-0,42) * $p = 0,036$ # $p = 0,035$ ** $p < 0,001$
Li-пируват+ этанол	0,20 (0,17-0,30) * $p = 0,198$ # $p = 0,277$	0,32 (0,26-0,41) * $p = 0,1592$ # $p < 0,010$ ** $p < 0,010$
Li-сукцинат+ этанол	0,19 (0,18-0,22) * $p = 0,601$ # $p = 0,044$	0,29 (0,21-0,37) * $p = 0,733$ # $p = 0,338$ ** $p < 0,001$

Примечание. Статистическая значимость: * p – по сравнению с соответствующим контролем без этанола; # p – по сравнению с пробой «контроль с этанолом»; ** p – сравнение соответствующих показателей у здоровых лиц и пациентов с депрессивными расстройствами.

оставался статистически значимо повышенным по сравнению с показателями здоровых лиц. При этом Li-аскорбат и Li-пируват в присутствии этанола приводили к статистически значимому повышению уровня карбонил-белков, тогда как Li-сукцинат влияния не оказывал – концентрация КБ в пробах с сукцинатом лития оставалась на уровне контроля с этанолом (табл. 1).

При сравнении уровня ТБК-реактивных продуктов (маркера окислительной модификации липидов) в плазме крови пациентов ДР и здоровых лиц значимых различий между группами не выявлено (табл. 2). Как и в случае с карбонилированными белками, добавление этанола приводило к повышению содержания ТБК-РП в плазме крови здоровых лиц и не влияло на уровень продуктов ПОЛ в плазме крови пациентов ДР. При этом концентрация ТБК-РП в контрольных пробах с этанолом у здоровых лиц была статистически значимо повышена по сравнению с соответствующими пробами пациентов ДР (табл. 2).

Согласно данным, представленным в табл. 2, как и в случае с КБ, аскорбат лития и сукцинат лития в присутствии этанола приводили к снижению содержания ТБК-реактивных продуктов только в плазме крови здоровых лиц, но не пациентов ДР. При этом у пациентов ДР не выявлено усиления окислительной

модификации липидов при добавлении любой из исследуемых солей лития (Li-аскорбата, или Li-пирувата, или Li-сукцината). Значения концентрации ТБК-реактивных продуктов в пробах с солями лития в присутствии этанола были сопоставимы с значением в контрольных пробах с этанолом.

Проведенные исследования выявили повышенную концентрацию карбонил-белков в плазме крови пациентов с депрессивными расстройствами, что согласуется с данными литературы о формировании окислительного стресса и повышенном содержании окисленных белков в сыворотке крови и клетках пациентов аффективными расстройствами [2, 3]. Повышение КБ может свидетельствовать о недостаточности или ослаблении антиоксидантных систем организма при депрессии. Однако показатели ТБК-реактивных продуктов в плазме крови обследованных групп существенно не различались, то есть повреждающему действию окислительного стресса, сопутствующего депрессивным расстройствам, в большей степени были подвержены макромолекулы белка.

Карбонилы белков и ТБК-реактивные продукты являются известными маркерами окислительного стресса, отражающими накопление конечных продуктов окислительной модификации биомолекул.

Таблица 2

Влияние солей лития на содержание ТБК-реактивных продуктов в плазме крови здоровых лиц и пациентов депрессивными расстройствами, Me (QL – QU)

Исследуемые пробы	ТБК-реактивные продукты, нмоль/мл	
	Здоровые (n=24)	Больные ДР (n=25)
Контроль без этанола	2,36 (2,05-2,79)	2,20 (1,85-2,56) **p=0,352
Контроль + этанол	2,77 (2,46-3,38) *p<0,001	2,05 (1,74-2,87) *p=0,773 **p<0,001
Li-аскорбат+ этанол	2,54 (2,36-2,89) *p=0,586 *p=0,004	2,36 (2,00-2,77) *p=0,367 #p=0,230 **p=0,318
Li-пируват+ этанол	2,72 (2,36-3,12) *p=0,043 #p=0,145	2,26 (1,85-2,67) *p=0,968 #p=0,968 **p=0,041
Li-сукцинат+ этанол	2,36 (2,15-3,49) *p=0,145 *p<0,010	2,05 (1,95-2,67) *p=0,861 #p=0,513 **p=0,047

Примечание. Статистическая значимость: *p – по сравнению с соответствующим контролем без этанола; #p – по сравнению с пробой «контроль с этанолом»; **p – сравнение соответствующих показателей у здоровых лиц и пациентов с депрессивными расстройствами.

Многообразие свободно-радикальных, окислительных и антиоксидантных процессов, находящихся в тонком балансе в биологической системе, позволяют различным соединениям воздействовать одновременно на несколько звеньев патогенеза. Такие воздействия могут изменять баланс в ту или иную сторону через прямые или фермент-опосредованные реакции, а также влияя на клеточный метаболизм и экспрессию определенных генов. Все это объясняет различные, меняющиеся в широких пределах, уровни эффективности и направленности воздействия соединений в разных модельных условиях.

Для моделирования окислительного стресса в экспериментах *in vitro* применяют различные реагенты, которые активизируют отдельные фазы окислительных процессов и при этом часто не физиологичны. Так, увеличение количества свободных радикалов может быть вызвано добавлением диоксида калия, перекиси водорода или пероксида трет-бутила, а также использованием препаратов, способствующих генерации супероксида (паракват, менадион) [11]. Известно, что внесение этанола в образцы крови *in vitro* приводит к увеличению окислительной модификации белков и липидов плазмы крови [12]. Этанол является эндогенным метаболитом и физиологичен по своей природе. Но в определенных условиях и при повышенной концентрации также может выступать в качестве агента, индуцирующего окислительную модификацию биомолекул. Использование этанола в настоящем исследовании показало, что в конкретных экспериментальных условиях его воздействие приводит к окислительной модификации белков и липидов плазмы крови у здоровых лиц, но не пациентов с депрессивными расстройствами. Частично это можно объяснить особенностями патогенеза заболевания и состоянием ферментных систем пациентов, однако, молекулярный механизм пока не ясен.

В используемую нами модельную биологическую систему соли лития вносили в дозе 1,2 ммоль/л в расчете на ион лития (Li^+), которая соотносится с терапевтической дозой при лечении аффективных расстройств [13]. Все соли лития проявляли антиоксидантное действие на белки и липиды плазмы крови здоровых лиц, в то время как в экспериментах с кровью пациентов ДР выявлен прооксидантный эффект Li -аскорбата и Li -пирувата – обнаружено повышение концентрации окисленных белков в плазме крови в их присутствии. Li -сукцинат на уровень окисленных белков плазмы крови больных ДР значимого эффекта не оказывал. Не выявлено также значимого влияния исследуемых соединений лития на уровень продуктов

ТБК-РП плазмы крови пациентов ДР. В аналогичных исследованиях на образцах крови пациентов с алкогольной зависимостью статистически значимого эффекта солей лития на биомолекулы плазмы крови пациентов обнаружено не было, при этом инкубация крови здоровых людей с солями лития выявила их защитное действие от этанол-индуцированного окисления белков и липидов, сопоставимое по эффективности с карнозином, у Li -аскорбата, Li -карбоната и Li -сукцината [14].

Обсуждение

О разнонаправленном (про- или антиоксидантном) действии аскорбата известно из разных источников [8, 9, 15, 16]. Наши исследования еще раз демонстрируют способность аскорбата проявлять не только анти-, но и прооксидантное действие в биологической системе, каковой является кровь.

Пируват с точки зрения его про- и антиоксидантных свойств изучен в меньшей степени, чем аскорбат. Так, при оценке эффекта пирувата лития на клеточной модели мононуклеаров периферической крови больных алкоголизмом обнаружены его выраженные антиоксидантные и цитопротекторные свойства, а именно, уменьшение доли клеток с активными формами кислорода, снижение процента клеток, находящихся как в состоянии раннего апоптоза, так и в состоянии позднего апоптоза/некроза [17]. Антиоксидантные свойства пирувата ранее были продемонстрированы в другой работе [18]. В наших исследованиях в опытах *in vitro* на образцах крови здоровых лиц и больных алкогольной зависимостью пируват лития не оказывал заметного эффекта на уровень окислительного повреждения белков и липидов плазмы крови [14].

Таким образом, результаты эксперимента показали, что все исследуемые соли лития в условиях эксперимента с применением в качестве окислительного агента этанола оказывали антиоксидантный эффект на белки и липиды плазмы крови здоровых лиц. При этом соли лития, имеющие в своем составе анионы аскорбата или пирувата, проявляли прооксидантный эффект в образцах крови пациентов депрессивными расстройствами, усиливая окислительное действие этанола на белки, но не на липиды плазмы.

С учетом полученных результатов и данных литературы можно заключить, что про/антиоксидантные эффекты солей лития зависят от многих факторов, в том числе, от применяемой дозы лития, условий эксперимента, объекта исследования. Важной задачей дальнейших исследований является подбор оптимального анионного компонента, который способен по-

тенцировать эффекты лития, что может значительно повышать ожидаемый терапевтический эффект. Данный подход является перспективным в плане создания новых препаратов лития комбинированного нормотимического и антиоксидантного действия.

Литература

1. Счастный Е.Д., Симуткин Г.Г., Лебедева Е.В., Яковлева А.Л., Лосенков И.С., Репин А.Н. и др. Клинико-динамические и биологические аспекты полиморфизма и эффективности терапии расстройств настроения. *Сибирский медицинский журнал (г. Томск)*. 2018; 33 (3): 86-92. <https://elibrary.ru/item.asp?id=36475707>
2. Tang V., Wang J.F. Oxidative Stress in Bipolar Disorder. *Biochem & Anal Biochem*. 2012; S2: 002. doi: 10.4172/2161-1009.S2-002
3. Liu T., Zhong S., Liao X., Chen J., He T., Lai S. et al. A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0138904. doi: 10.1371/journal.pone.0138904. eCollection 2015
4. Shao L., Young L.T., Wang J.F. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol. Psychiatry*. 2005; 58: 879-84.
5. Malhi G.S., Outhred T. Therapeutic Mechanisms of Lithium in Bipolar Disorder: Recent Advances and Current Understanding. *CNS Drugs*. 2016; 1(10): 931-49. doi: 10.1007/s40263-016-0380-1
6. Aliyazicioglu R., Kural B., Colak M., Karahan S.C., Ayvaz S., Deger O. Treatment with lithium, alone or in combination with olanzapine, relieves oxidative stress but increases atherogenic lipids in bipolar disorder. *Tohoku J Exp Med*. 2007; 213: 79-87.
7. Khairova R., Pawar R., Salvadore G., Juruena M.F., De Sousa R.T., Soeiro-De-Souza M. et al. Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. *Mol. Med Report*. 2012; 5 (3): 680-2. doi: 10.3892/mmr.2011.732
8. Plotnikov E., Voronova O., Linert W., Martemianov D., Korotkova E., Dorozhko E., et al. Antioxidant and Immunotropic Properties of some Lithium Salts. *J. App. Pharm. Sci*. 2016; 6(1): 086-9.
9. Торшин И.Ю., Сардарян И.С., Громова О.А., Расташанский В.А., Федотова Л.Э. Хемореактомное моделирование эффектов аскорбата, никотината, оксидутирата, комената и карбоната лития. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2016; 3: 47-57.
10. Plotnikov E., Korotkova E., Voronova O., Dorozhko E., Bohan N., Plotnikov S. Lithium-based antioxidants: electrochemical properties and influence on immune cells. *Physiology and pharmacology*. 2015; 19: 107-13.
11. Krall J., Bagley A.C., Mullenbach G.T. Hallelwell R.A., Lynch R.E. Superoxide mediates the toxicity of paraquat for cultured mammalian cells. *J. Biol. Chem*. 1988; 263: 1910-4.
12. Ярыгина Е.Г., Прокопьева В.Д. Защита белков и липидов плазмы крови от повреждения, индуцированного этанолом и ацетальдегидом. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2015; 3: 5-8.
13. Машковский М.Д. *Лекарственные средства*. 16-е изд. М.: Новая Волна, 2017. ISBN 978-5-7864-0287-3.
14. Prokopieva V.D., Plotnikov E.V., Yarygina E.G., Bokhan N.A. Protective action of carnosine and organic lithium salts in case of ethanol-induced oxidative damage of proteins and lipids of blood plasma in healthy persons and alcoholic patients. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry*. 2019; 13 (2): 162-6. doi: 10.1134/S1990750819020082
15. Варданыан Р.Л., Варданыан Л.Р., Айрапетян С.А., Арутюнян Л.Р., Арутюнян Р.С. Антиоксидантное и прооксидантное действие аскорбиновой кислоты. *Химия растительного сырья*. 2015; 1: 113-9. doi: 10.14258/jcprgm.201501295
16. Лосенков И.С., Плотников Е.В., Епимахова Е.В. Цитотоксический и прооксидантный эффекты аскорбата лития in vitro. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2018; 1 (98): 24-9.
17. Епимахова Е.В., Лосенков И.С., Рошина О.В., Плотников Е.В. Оценка цитопротекторного и антиоксидантного действия пирувата лития на мононуклеары периферической крови больных алкоголизмом. *Вопросы наркологии*. 2018; 12(171): 36-47.
18. O'Donnell-Tormey J., Nathan C.F., Lanks K., De-Boer C.J., De la Harpe J. Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *J. Exp. Med*. 1987; 165 (2): 500-14. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2188509/>

References

1. Schastnyy E.D., Simutkin G.G., Lebedeva E.V., Yakovleva A.L., Losenkov I.S., Repin A.N., Nonka T.G. Clinical-dynamic and biological aspects of polymorphism and efficacy of therapy of mood disorders. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Tomsk)*. 2018; 33(3): 86-92. (in Russian)
2. Tang V., Wang J.F. Oxidative Stress in Bipolar Disorder. *Biochem & Anal Biochem*. 2012; S2: 002. doi: 10.4172/2161-1009.S2-002
3. Liu T., Zhong S., Liao X., Chen J., He T., Lai S. et al. A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0138904. doi: 10.1371/journal.pone.0138904. eCollection 2015
4. Shao L., Young L.T., Wang J.F. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol. Psychiatry*. 2005; 58: 879-84.
5. Malhi G.S., Outhred T. Therapeutic Mechanisms of Lithium in Bipolar Disorder: Recent Advances and Current Understanding. *CNS Drugs*. 2016; 1(10): 931-49. doi: 10.1007/s40263-016-0380-1
6. Aliyazicioglu R., Kural B., Colak M., Karahan S.C., Ayvaz S., Deger O. Treatment with lithium, alone or in combination with olanzapine, relieves oxidative stress but increases atherogenic lipids in bipolar disorder. *Tohoku J. Exp. Med*. 2007; 213: 79-87.
7. Khairova R., Pawar R., Salvadore G., Juruena M.F., De Sousa R.T., Soeiro-De-Souza M. et al. Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. *Mol. Med. Report*. 2012; 5 (3): 680-2. doi: 10.3892/mmr.2011.732
8. Plotnikov E., Voronova O., Linert W., Martemianov D., Korotkova E., Dorozhko E., et al. Antioxidant and Immunotropic Properties of some Lithium Salts. *J. App. Pharm. Sci*. 2016; 6(1): 086-9.
9. Torshin I.Yu., Sardaryan I.S., Gromova O.A., Rastashansky V.A., Fedotova L.E. Chemoreactome modeling the effects of anions of lithium salts ascorbate, nicotinate, hydroxybutyrate komekata and lithium carbonate. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2016; 3: 47-57. (in Russian)
10. Plotnikov E., Korotkova E., Voronova O., Dorozhko E., Bohan N., Plotnikov S. Lithium-based antioxidants: electrochemical properties and influence on immune cells. *Physiology and Pharmacology*. 2015; 19: 107-113.
11. Krall J., Bagley A.C., Mullenbach G.T. Hallelwell R.A., Lynch R.E. Superoxide mediates the toxicity of paraquat for cultured mammalian cells. *J. Biol. Chem*. 1988; 263: 1910-4.
12. Yarygina E.G., Prokopieva V.D. Protection of blood plasma proteins and lipids against damage induced by ethanol and acetaldehyde. *Sibirskiy vestnik psikiatrii i narkologii*. 2015; 3: 5-8. (in Russian)

13. Mashkovskiy M.D. *Medicines. [Lekarstvennye sredstva]*. 16th ed. Moscow: Novaya Volna; 2017: 114-6. (in Russian)
14. Prokopenko V.D., Plotnikov E.V., Yarygina E.G., Bokhan N.A. Protective action of carnosine and organic lithium salts in case of ethanol-induced oxidative damage of proteins and lipids of blood plasma in healthy persons and alcoholic patients. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry*. 2019; 13(2): 162-6. doi: 10.1134/S1990750819020082
15. Vardanian R.L., Vardanian L.R., Airapetian S.A., Arutiunian L.R., Arutiunian R.S. Antioxidant and prooxidant action of ascorbic acid. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2015; 1: 113-9. doi: 10.14258/jcprm.201501295 (in Russian)
16. Losenkov I.S., Plotnikov E.V., Epimakhova E.V. Study of cytotoxic effect of lithium ascorbate and its influence on oxidative stress in vitro. *Sibirskiy vestnik psikiatrii i narkologii*. 2018; 1(98): 24-9. (in Russian)
17. Epimakhova E.V., Losenkov I.S., Roshchina O.V., Plotnikov E.V. Evaluation of cytoprotective and antioxidant activities of lithium pyruvate on peripheral blood mononuclear cells from patients with alcohol addiction. *Voprosy narkologii*. 2018; 12(171): 36-47. (in Russian)
18. O'Donnell-Tormey J., Nathan C.F., Lanks K., De-Boer C.J., De la Harpe J. Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *J. Exp. Med*. 1987; 165(2): 500-14. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2188509/>

Сведения об авторах:

Прокопьева Валентина Даниловна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии «НИИ психического здоровья» Томского НИМЦ, e-mail: valyaprok@mail.ru;

Ветлугина Тамара Парфёновна, доктор биол. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии «НИИ психического здоровья» Томского НИМЦ, e-mail: vetlug@mail.tomsknet.ru;

Ярыгина Екатерина Григорьевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии «НИИ психического здоровья» Томского НИМЦ, e-mail: yr.kat@mail.ru;

Плотников Евгений Владимирович, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. отд-ния эндогенных расстройств «НИИ психического здоровья» Томского НИМЦ, e-mail: plotnikov.e@mail.ru;

Бохан Николай Александрович, академик РАН, доктор мед. наук, проф., директор «НИИ психического здоровья» Томского НИМЦ, зав. каф. психиатрии, наркологии и психотерапии Сибирского гос. мед. университета e-mail: mental@tnimc.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Алексеев В.В.¹, Каде А.Х.²

Функциональная и корреляционная зависимость между показателями метаболической активности нейтрофилов и α -дефензинов у животных различных возрастных групп в динамике острой соматической боли

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, г. Ростов-на-Дону, Россия, пер. Нахичеванский, д. 29;

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 350063, г. Краснодар, Россия, ул. имени М. Седина, д. 4

В последние годы все чаще встречаются штаммы микроорганизмов, устойчивые к антибиотикам. Необходим поиск новых средств, обеспечивающих надежный антибактериальный эффект. Актуальным является изучение антимикробных пептидов. Возникает вопрос, α -дефензины активируются только при микробной атаке или существуют и иные триггеры их вовлечения в иммунологический процесс. Если исходить из того, что любая рана всегда болезненна, но не любая острая боль связана с внешним повреждением тканей, встает вопрос о возможности вовлечения нейтрофилов и α -дефензинов в долорогенный процесс как таковой. **Цель** работы – выявление корреляционной связи и особенностей вовлечения нейтрофилов и α -дефензинов в острый долорогенный процесс на этапах онтогенеза. **Методика.** Объект исследования – белые беспородные крысы 3 возрастных групп: месячные (30-35-дневные, $n=36$), взрослые половозрелые (2-3 месячные, $n=36$), старые (старше 1 года, $n=36$). Каждая группа делилась на контрольную и экспериментальную подгруппы. В экспериментальных подгруппах моделировали острую соматическую боль методом электростимуляции. После болевого воздействия брали материал для исследования через 2, 30-60, 120-180 мин. Содержание α -дефензинов в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа. Для оценки микробицидной активности нейтрофилов использовали спонтанный и стимулированный НСТ – тест. Для оценки корреляционной связи между изучаемыми показателями применяли метод ранговой корреляции Спирмена. **Результаты.** Острая краткосрочная соматическая боль активирует кислородзависимые механизмы микробицидности нейтрофилов и приводит к увеличению уровня α -дефензинов в периферической крови. В онтогенезе реакция имеет свои особенности, но ее стандартный и непродолжительный характер очевиден. Установлена прямая корреляционная зависимость между функциональной активностью нейтрофилов и уровнем α -дефензинов в периферической крови у 30-35-дневных и 2-3-месячных животных. **Заключение.** Полученные данные имеют значение при разработке препаратов на основе α -дефензинов и их применении пациентами различного возраста при наличии в анамнезе острого болевого синдрома.

Ключевые слова: боль; крысы; α -дефензины; нейтрофилы; онтогенез.

Для цитирования: Алексеев В.В., Каде А.Х. Функциональная и корреляционная зависимость между показателями метаболической активности нейтрофилов и α -дефензинов у животных различных возрастных групп в динамике острой соматической боли. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 21-29.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.21-29

Для корреспонденции: Алексеев Владимир Вячеславович, e-mail: alexeev911@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста – Алексеев В.В.; концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование – Каде А.Х.

Поступила 12.07.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Alekseev V.V.¹, Kade A.Kh.²**Functional and correlational relationship between indexes of the metabolic activity of neutrophils and α -defensins in animals of different age groups in the dynamics of acute somatic pain**¹Rostov State Medical University,

Nakhichevansky Pereulok 29, Rostov-on-Don 344022, Russia;

²Kuban State Medical University,

Mitrofana Sedina Str. 4 Krasnodar 350063, Russia

Microorganism strains resistant to antibiotics have become more common. This fact prompts searching for new means that would provide a reliable antibacterial effect. Studying antimicrobial polypeptides is relevant. A question arises whether α -defensins are activated only during a microbial attack or there are other triggers for their involvement in the immunological process. Since any wound is always painful but acute pain is not always associated with an external injury, the question is whether neutrophils and α -defensins can be involved in the dolorogenic process as such. **The aim** of the study was to determine correlation and features of neutrophil and α -defensin involvement in an acute dolorogenic process at stages of ontogenesis. **Methods.** The study was performed on white rats divided into three age groups (30-35-day-old, 2-3-month-old, and older than one year). Each group was divided into control and experimental subgroups. In experimental subgroups, acute somatic pain was modeled by electrostimulation. Material was collected at 2, 30-60, and 120-180 min after electrostimulation. Serum content of α -defensins was measured by enzyme immunoassay. Neutrophil microbicidal activity was evaluated using the spontaneous and stimulated NBT tests. Values were compared using the non-parametric Mann-Whitney U-test, and correlations were analyzed using the Spearman rank correlation test. **Results.** Acute short-term somatic pain activated oxygen-dependent mechanisms of neutrophil microbicidal activity and induced increased levels of α -defensins in peripheral blood. This reaction has specific features in ontogenesis but it is obviously standard and short-term. The functional activity of neutrophils was directly correlated with the level of α -defensins in peripheral blood of 30-35-day-old and 2-3-month-old animals. **Conclusion.** At stages of ontogenesis, oxygen-dependent neutrophil microbicidal activity and peripheral blood content of α -defensins increase in response to acute, short-term somatic pain. The type of response is determined by age-related features. The study results are important for development of α -defensin-based drugs and prescribing them to patients of different age with a history of acute pain.

Keywords: pain; rats; α -defensins; neutrophils; ontogenesis.

For citation: Alekseev V.V., Kade A.Kh. Functional and correlational relationship between indexes of the metabolic activity of neutrophils and α -defensins in animals of different age groups in the dynamics of acute somatic pain. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 21-29. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.21-29

For correspondence: Vladimir V. Alekseev, PhD, professor assistant of the department of pathological physiology the Rostov State Medical University; 29, Nakhichevansky Lane, Rostov-on-Don, 344022, Russia, e-mail: alexeev911@gmail.com

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Contribution: the concept and design of the study, collection and processing of material, writing a text— Alekseev V.V.; the concept and design of the study, writing a text, editing — Kade A.Kh.

Information about authors:Alekseev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-8055-2184>Kade A.Kh., <https://orcid.org/0000-0002-0694-9984>

Received 12.07.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Введение

Непреложной истиной является то, что любое ранение сопровождается первичным или вторичным инфицированием зоны повреждения [1, 2]. Очевидным является и тот факт, что повреждение тканей сопровождается острой болевой реакцией. В связи с этим протокол оказания помощи при получении травмы включает обязательное обезболивание и введение антибиотиков [3, 4]. К сожалению, в последние годы все чаще

встречаются штаммы микроорганизмов, устойчивые к антибиотикам [5, 6]. Необходим поиск новых средств, обеспечивающих надежный антибактериальный эффект. В этом плане обнадеживающим является изучение антимикробных полипептидов (АМП). В последние десятилетия идентифицировано более ста АМП. Среди них далеко не последнее место занимают дефензины. В клинической практике акценты сделаны на

изучении α -дефензинов [7, 8]. Возникает вопрос, α -дефензины активируются только при микробной атаке или существуют и иные триггеры их вовлечения в иммунологический процесс. Если исходить из того, что любая рана всегда болезненна, но не любая острая боль связана с внешним повреждением тканей, встает вопрос о возможности вовлечения нейтрофилов и α -дефензинов в долорогенный процесс как таковой.

Сочетанное изучение реакции нейтрофилов и α -дефензинов диктуется их тесной функциональной связью [9].

Цели исследования:

1. Установление факта вовлечения нейтрофилов и α -дефензинов в острый долорогенный процесс.

2. Выявление особенностей реакции факторов врожденного иммунитета на острую кратковременную соматическую боль на этапах онтогенеза.

3. Выявление корреляционной зависимости между изменениями кислородзависимой микробицидности и уровнем α -дефензинов при острой кратковременной соматической боли.

Методика

Объектом исследований служили белые беспородные крысы.

Выделено несколько возрастных групп: месячные (30-35-дневные, $n=36$), взрослые половозрелые (2-3-месячные, $n=36$), старые (старше 1 года, $n=36$). Каждая возрастная группа распределялась на контрольную и экспериментальную подгруппы. У крыс опытной подгруппы электрокожным раздражением рецепторной зоны корня хвоста моделировали острую соматическую боль (ОСБ) 3-й–4-й степени интенсивности по критериям А.В. Вальдмана и Ю.Н. Васильева в модификации В.Г. Овсянникова [10]. Взятие материала для исследования осуществляли через 2, 30-60 и 120-180 мин после моделирования ОСБ. Содержание α -дефензинов в сыворотке крови крыс определяли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы Cloud-Clone Corp (США). Приготовление растворов стандартов, конъюгатов А и В, промывочного буфера проводили согласно инструкции к набору.

Для оценки микробицидной активности нейтрофилов использовали цитохимический метод спонтанного и стимулированного НСТ–теста [11]. Под микроскопом оценивали процентное содержание нейтрофилов с темно-синими гранулами формазана в цитоплазме. Анализировали 100 сегментоядерных нейтрофилов. Вычисляли процент нейтрофилов с признаками восстановления тетразолия в формазан до и после моделирования ОСБ.

Все экспериментальные работы выполнены с соблюдением утвержденных Европейской конвенцией правил этики о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях и Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России № 708 от 23.08.2010. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России.

Статистическую обработку данных проводили на основе непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Критическое значение уровня значимости (p) принималось равным 0,05. Результаты представлены как медиана с верхним и нижним квартилями и интервалом значений $Me [Q_{0,25}; Q_{0,75}]$ (Min-Max). Для выявления корреляционной связи между изучаемыми показателями применяли метод ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

В табл. 1 представлены результаты исследования животных в контрольных группах.

В сравнении с месячными крысами у взрослых половозрелых животных как спонтанный, так и стимулированный тест ярче выражен. Тем не менее более высокая метаболическая активность не обуславливает активацию микробицидности нейтрофилов, равно как и их способности увеличивать содержание в периферической крови α -дефензинов.

Таким образом, у животных контрольной группы показатели, характеризующие спонтанный НСТ–тест, возрастают по мере взросления животных. Стимулированный НСТ–тест у взрослых половозрелых крыс выше, чем у крыс месячного возраста, однако у старых животных он снижается, одновременно в старости снижается и микробицидность нейтрофилов. Содержание α -дефензинов по мере взросления животных также повышается, а к старости постепенно снижается, однако остается более высоким, чем у месячных крыс.

Через 2 мин после болевой стимуляции у крыс месячного возраста показатели, характеризующие метаболическую активность нейтрофилов и уровень α -дефензинов в периферической крови возрастают. При этом прирост значений, характеризующих микробицидность нейтрофилов и содержание α -дефензинов имеют высоко значимое различие ($p<0,01$) по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 2).

Проведенный корреляционный анализ выявил прямую зависимость между увеличением киллинговой активности нейтрофилов и нарастанием уровня α -дефензинов ($\rho=0,047$).

При анализе показателей, характеризующих метаболическую активность нейтрофилов взрослых крыс, обращают на себя внимание 3 обстоятельства: 1) абсо-

лютные значения спонтанного и стимулированного НСТ-теста у взрослых крыс несколько ниже, чем у месячных животных (**табл. 2**); 2) не выявлено значимых

Таблица 1

Уровень регистрируемых параметров в контрольной группе животных

	спНСТ		стНСТ		К стим		α-Деф	
	Me		Me		Me		Me	
месячные	Me	55,5	Me	90,5	Me	1,63	Me	12,5
	Q _{0,25}	54,1	Q _{0,25}	86,0	Q _{0,25}	1,60	Q _{0,25}	11,9
	Q _{0,75}	58,4	Q _{0,75}	93,8	Q _{0,75}	1,66	Q _{0,75}	13,1
	min	49,7	min	82,0	min	1,58	min	11,5
	max	60,4	max	100,3	max	1,72	max	15,6
взрослые	Me	65,7	Me	111,5	Me	1,67	Me	15,9
	Q _{0,25}	57,5	Q _{0,25}	104,8	Q _{0,25}	1,61	Q _{0,25}	15,7
	Q _{0,75}	63,2	Q _{0,75}	122,7	Q _{0,75}	1,71	Q _{0,75}	16,9
	min	56,5	min	86,4	min	1,53	min	15,4
	max	87,8	max	141,0	max	1,78	max	17,4
старые	Me	73,3	Me	108,2	Me	1,47	Me	13,7
	Q _{0,25}	71,1	Q _{0,25}	100,8	Q _{0,25}	1,44	Q _{0,25}	13,2
	Q _{0,75}	74,6	Q _{0,75}	113,5	Q _{0,75}	1,52	Q _{0,75}	15,0
	min	68,9	min	98,2	min	1,39	min	13,4
	max	76,3	max	113,7	max	1,53	max	15,1

Примечание. Обозначения здесь и в табл. 2–4: спНСТ (спонтанный), стНСТ (стимулированный) нитросиний тетразолиевый тест.

Таблица 2

Уровень регистрируемых параметров через 2 мин после острой соматической боли

	спНСТ		стНСТ		К стим		α-Деф	
	Me		Me		Me		Me	
месячные	Me	79,9*	Me	143,8*	Me	1,82*	Me	21,0*
	Q _{0,25}	59,9	Q _{0,25}	112,6	Q _{0,25}	1,81	Q _{0,25}	19,5
	Q _{0,75}	83,4	Q _{0,75}	150,9	Q _{0,75}	1,84	Q _{0,75}	22,5
	min	47,5	min	93,3	min	1,79	min	19,0
	max	85,4	max	155,2	max	2,03	max	23,1
взрослые	Me	61,6	Me	119,1	Me	1,91*	Me	31,2*
	Q _{0,25}	54,8	Q _{0,25}	105,3	Q _{0,25}	1,89	Q _{0,25}	24,0
	Q _{0,75}	73,4	Q _{0,75}	132,7	Q _{0,75}	1,93	Q _{0,75}	47,0
	min	48,3	min	90,9	min	1,80	min	23,8
	max	79,4	max	163,0	max	2,05	max	51,0
старые	Me	71,8	Me	114,9*	Me	1,59*	Me	20,8*
	Q _{0,25}	70,4	Q _{0,25}	111,1	Q _{0,25}	1,58	Q _{0,25}	20,1
	Q _{0,75}	73,1	Q _{0,75}	118,2	Q _{0,75}	1,61	Q _{0,75}	22,4
	min	57,7	min	91,2	min	1,57	min	19,8
	max	74,8	max	119,9	max	1,64	max	23,5

Примечание. * – $p < 0,05$ статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой. Обозначения см. табл. 1.

изменений спонтанного и стимулированного НСТ-тестов сразу после болевой атаки по отношению к контрольным значениям; 3) очевидно, главное, интегральная величина (коэффициент микробицидности, характеризующий киллинговую активность нейтрофилов) половозрелых крыс, выше, чем у крыс месячного возраста, и по сравнению с контрольными значениями в этой возрастной группе имеется высокозначимое различие ($p < 0,01$) (табл. 2).

Очевидно, приведенная триада свидетельствует о более упорядоченном и рациональном характере метаболизма у взрослых половозрелых животных по сравнению с крысами месячного возраста, что позволяет, при меньших ресурсных затратах, обеспечивать более выраженный эффект. Образование α -дефензинов сразу после нанесения ноцицептивного раздражения резко возрастает, различие с контролем высокозначимо ($p < 0,01$), в абсолютных значениях этот прирост выше, чем у месячных животных, что лишь подтверждает высказанное выше предположение (табл. 2).

Через 2 мин после болевого воздействия у старых крыс спонтанный НСТ-тест не претерпевает изменений, стимулированный – демонстрирует тенденцию роста, что же касается самой микробицидности нейтрофилов и уровня α -дефензинов, то здесь обнаруживается высокозначимый прирост (табл. 2).

Можно констатировать, что у животных месячного возраста реакция в ответ на боль, характеризующая метаболическую активность нейтрофилов, более лабильна, чем у взрослых и старых животных.

Судя по результатам, у крыс месячного возраста через 30-60 мин после болевого воздействия продолжается активация фагоцитарной активности, но она не свидетельствует о нарастании переваривающей способности нейтрофилов и увеличении биосинтеза α -дефензинов. Напротив, в этот временной промежуток киллинговая активность нейтрофилов падает и содержание α -дефензинов в периферической крови также снижается. Проявляется своеобразная диссоциация функций: поглотительной, переваривающей и синтетической (табл. 3). При этом корреляционный анализ подтверждает это наблюдение. Между снижением коэффициента микробицидности нейтрофилов и падением уровня α -дефензина выявляется прямая корреляционная зависимость ($\rho = 0,43$). Характерным признаком для данной группы (1 мес) является депрессия всех показателей, характеризующих метаболическую активность нейтрофилов. На первый взгляд продолжает сохраняться высокий уровень α -дефензинов ($p < 0,001$), но это, очевидно, связано не с их усиленной продукцией, а недостаточным разрушением в периферической крови в течение 1-го ч после болевого воздействия (табл. 3).

Таблица 3

Уровень регистрируемых параметров через 30-60 мин после острой соматической боли

	спНСТ		стНСТ		К стим		α -Деф	
	Me		Me		Me		Me	
месячные	Me	131,2*	Me	163,1*	Me	1,37*	Me	14,2*
	Q _{0,25}	114,3	Q _{0,25}	158,1	Q _{0,25}	1,30	Q _{0,25}	13,7
	Q _{0,75}	146,0	Q _{0,75}	199,2	Q _{0,75}	1,41	Q _{0,75}	14,6
	min	106,9	min	149,3	min	1,14	min	13,2
	max	161,4	max	209,5	max	1,45	max	15,0
взрослые	Me	64,7	Me	113,6	Me	1,72	Me	17,7*
	Q _{0,25}	60,9	Q _{0,25}	100,5	Q _{0,25}	1,69	Q _{0,25}	17,5
	Q _{0,75}	68,5	Q _{0,75}	119,9	Q _{0,75}	1,75	Q _{0,75}	18,0
	min	53,5	min	92,3	min	1,64	min	16,9
	max	74,5	max	125,9	max	1,82	max	18,3
старые	Me	104,8	Me	176,7	Me	1,68*	Me	16,4*
	Q _{0,25}	65,7	Q _{0,25}	108,0	Q _{0,25}	1,64	Q _{0,25}	15,9
	Q _{0,75}	117,9	Q _{0,75}	213,2	Q _{0,75}	1,79	Q _{0,75}	18,5
	min	50,7	min	93,1	min	1,58	min	15,2
	max	124,4	max	240,5	max	1,84	max	19,5

Примечание. * – $p < 0,05$ статистически значимые различия по сравнению с контрольной группы. Обозначения см. табл. 1.

Характерной особенностью для этой возрастной группы (1 мес) следует считать поступательное увеличение значений, характеризующих киллинговую активность нейтрофилов в течение 1-го ч после начала эксперимента. Уровень α -дефензинов в крови к этому времени снижается, но остается выше контрольных значений (табл. 3).

Из приведенного цифрового материала у месячных животных следует, что величина спонтанного и стимулированного НСТ-теста в абсолютных значениях снижалась по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, однако продолжает оставаться более высокой по сравнению с контрольными значениями.

После зарегистрированной депрессии к концу 1-го ч эксперимента наблюдается вторая волна статистически значимого увеличения микробицидности нейтрофилов ($p < 0,01$) и содержания α -дефензинов ($p < 0,001$) (табл. 4).

Полученные результаты позволяют говорить о высокой функциональной лабильности нейтрофилов у крыс месячного возраста. Они бурно реагируют на болевое раздражение, реакция быстро истощается, но и достаточно быстро (в течение 2–3 ч) возрастают киллинговая активность нейтрофилов и уровень α -дефензинов в периферической крови.

Взрослые крысы четко реагировали на болевое воздействие увеличением переваривающего потенциала

нейтрофилов и продукцией α -дефензинов, т.е. демонстрировали превентивную готовность к отражению возможной антигенной агрессии. Однако, поскольку такой сценарий не состоялся, все показатели практически возвращались к контрольным значениям и даже были ниже последних (табл. 4).

Определенная инертность в развертывании спонтанного и стимулированного НСТ-теста у старых животных очевидна. Это проявляется в сохранении уровня показателей контрольных значений в течение 2 ч, в последующем они несколько активируются (табл. 4).

Диссонансом в выявленной реакции является значимое снижение в этот временной промежуток киллинговой активности нейтрофилов. Содержание α -дефензинов к концу 3-го ч остается несколько увеличенным по сравнению с контрольными значениями. Создается впечатление, что у старых крыс срабатывает все тот же инерционный механизм, когда сохраняется баланс между продукцией и разрушением α -дефензина на несколько более высоком уровне, чем у животных контрольной группы (табл. 4).

Обсуждение

При всех рассмотренных возрастных и временных особенностях реакции изучаемых факторов врожденного иммунитета прослеживается общая закономерность:

Таблица 4

Уровень регистрируемых параметров через 120-180 мин после острой соматической боли

	спНСТ, ед		стНСТ, ед		К стим		α -Деф, нг/мл	
	Me		Me		Me		Me	
месячные	Me	89,4*	Me	156,7*	Me	1,75*	Me	19,4*
	Q _{0,25}	84,1	Q _{0,25}	148,9	Q _{0,25}	1,72	Q _{0,25}	19,2
	Q _{0,75}	93,4	Q _{0,75}	161,6	Q _{0,75}	1,77	Q _{0,75}	21,2
	min	81,3	min	133,0	min	1,64	min	18,7
	max	98,1	max	174,6	max	1,78	max	23,8
взрослые	Me	68,5	Me	104,3	Me	1,52*	Me	17,5*
	Q _{0,25}	66,9	Q _{0,25}	103,0	Q _{0,25}	1,54	Q _{0,25}	16,8
	Q _{0,75}	73,1	Q _{0,75}	109,7	Q _{0,75}	1,49	Q _{0,75}	17,9
	min	63,3	min	91,9	min	1,42	min	16,5
	max	91,9	max	130,2	max	1,59	max	18,5
старые	Me	109,4*	Me	122,9*	Me	1,31*	Me	15,6*
	Q _{0,25}	86,3	Q _{0,25}	109,4	Q _{0,25}	1,23	Q _{0,25}	15,5
	Q _{0,75}	116,0	Q _{0,75}	156,4	Q _{0,75}	1,35	Q _{0,75}	16,2
	min	80,6	min	107,1	min	1,00	min	15,3
	max	129,8	max	170,1	max	1,42	max	18,8

Примечание. * – $p < 0,05$ статистически значимые различия по сравнению с контрольной группы. Обозначения см. табл. 1.

в ответ на аллогенное воздействие включаются как механизмы кислородзависимой микробицидности нейтрофилов, так и продукции α -дефензинов. Причем в месячном возрасте и в возрасте половой зрелости эти факторы не просто изменяются параллельно друг другу, а имеют четкую корреляционную зависимость, которая расценивается как умеренная (ρ в пределах 0,3-0,69). Исходя из того, что нейтрофилы играют значительную роль в продукции α -дефензинов, следует заключить, что активация метаболической активности нейтрофилов связана с биосинтезом α -дефензинов (рисунок).

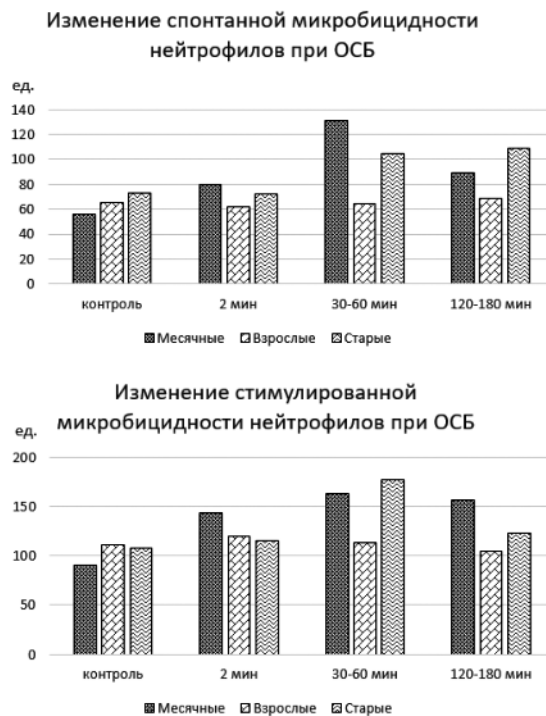
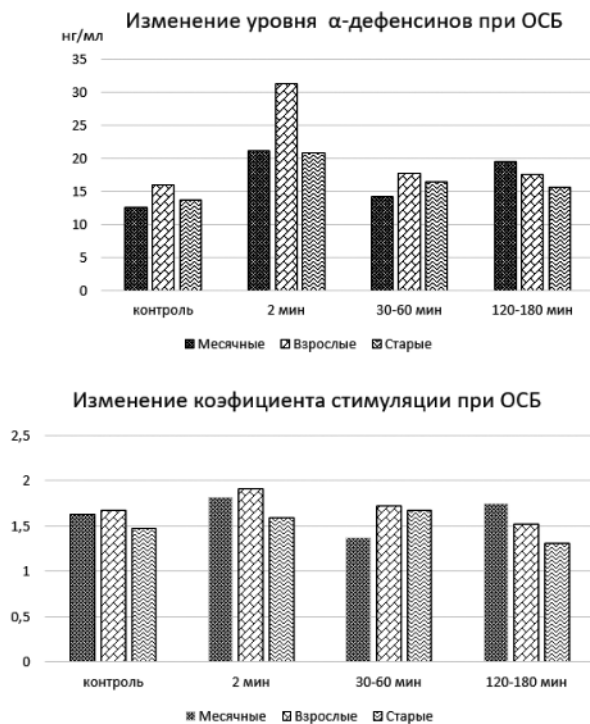
У старых животных столь выраженная корреляция не прослеживается. Объяснение вовлечения описанных факторов врожденного иммунитета следует искать в нейроиммунноэндокринных взаимодействиях при реализации универсальной стресс-реакции. А острая боль является именно таковой.

Было показано, что острая соматическая боль приводит к активации симпатoadреналовой системы во всех возрастных группах животных, которая, безусловно, имеет свои онтогенетические особенности, но выброс катехоламинов в ответ на долорогенное раздражение является обязательным [12]. Одной из

мишеней воздействия катехоламинов являются нейтрофилы. Этот факт, обнаруженный более 30 лет назад, находит все новые подтверждения [13]. Считается установленным тот факт, что на нейтрофилах присутствуют α - и β -адренорецепторы, которые регулируют функцию гранулоцитов. Через α -адренорецепторы активируется метаболическая активность нейтрофилов, а также их фагоцитарная и микробицидная активность [14-23].

Образующиеся активные формы кислорода, способны повреждать собственные клеточные структуры. Однако, количество β -адренорецепторов, лимитирующих микробицидность нейтрофилов, возрастает и тем самым предупреждают развитие деструктивного процесса [24, 25].

С этих позиций становится понятным, почему активация фагоцитов и увеличение биосинтеза α -дефензинов, закономерно возникающие, носят краткосрочный характер. Система, превентивно по отношению к возможному инфицированию, обретает функциональную готовность, но так как сценарий инфицирования не запускается, микробицидный потенциал быстро падает.



Графики изменения исследуемых параметров в ходе эксперимента.

Выводы

На этапах онтогенеза у крыс в ответ на острую кратковременную соматическую боль возрастает кислородозависимая микробицидность нейтрофилов и увеличивается содержание α -дефензинов в периферической крови.

Характер реакции определяется возрастными особенностями.

У крыс месячного возраста и достигнувших половой зрелости имеется прямая корреляционная зависимость между активацией метаболической активности нейтрофилов и ростом содержания α -дефензинов в периферической крови.

Заключение

Полученные данные имеют значение при разработке препаратов на основе α -дефензинов и их применении пациентами различного возраста при наличии в анамнезе острого болевого синдрома.

Литература

(п.п. 6; 12; 13 см. References)

1. Гуманенко Е.К. *Военно-полевая хирургия*. М.: ГЭОТАР-медиа; 2015.
2. Дьяченко С.В., Бобровникова М.Ю., Слободенюк Е.В. Бактериологический мониторинг раневых инфекций в многопрофильном хирургическом стационаре. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015; 1: 80-2.
3. Каралин А.Н., Терентьев В.А., Мурзаева Л.Г. Профилактика и лечение раневой инфекции на этапах медицинской эвакуации. *Здравоохранение Чувашии*. 2008; 2: 24-8.
4. Бордаков В.Н. *Рана. Раневой процесс. Принципы лечения ран*. Минск: БГМУ. 2014.
5. Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л., Смирнова Т.А., Гапонов А.М., Писарев В.М. и др. Влияние факторов врожденного иммунитета на развитие антибиотикотолерантности и выживание бактериальных популяций, подвергаемых антибиотической атаке. *Микробиология*. 2015; 84(6): 660.
7. Будихина А.С., Пинегин Б.В. α -дефензины – антимикробные пептиды нейтрофилов: свойства и функции. *Иммунология*. 2008; 29(5): 317-20.
8. Ганковская Л.В., Богомильский М.Р., Ганковская О.А., Ланда Р.И., Лавров В.Ф., Китайгородский А.П. и др. Роль дефензинов как факторов врожденного иммунитета в защите организма детей с тяжелыми формами паратонзиллитов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2011; 5(60): 30-3.
9. Вахрамеева Т.Н., Бедарева Т.Ю. Дефензины как маркер системной активации нейтрофилов при клещевых нейроинфекциях. *Медицина в Кузбассе*. 2008; 3: 15-9.
10. Овсянников В.Г., Алексеев В.В. *Алгология (учение о боли): учебное пособие*. Ростов-н/Д: РостГМУ; 2017.
11. Маянский Д.Н., Цырендоржиев Д.Д., Макарова О.П. *Диагностическая ценность лейкоцитарных тестов. Ч.2: Определение биоцидности лейкоцитов: Метод. рекомендации*. Новосибирск: СО РАМН; 1996.

14. Орлова Е.Г., Ланин Д.В., Шилов Ю.И. Модуляция функциональной экспрессии аднерорецепторов фагоцитирующих клеток при остром стрессе и введении гидрокортизона. *Медицинская иммунология*. 2003; 5(3-4): 209.
15. Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Ланин Д.В. Адренергические механизмы регуляции иммунного ответа и функций неспецифических эффекторных клеток при стрессе. *Медицинская иммунология*. 2005; 7(2-3): 127.
16. Шилов С.Ю., Шилов Ю.И., Черешнев В.А. Адренергические механизмы в реализации иммуномодулирующих эффектов глюкокортикоидов. *Иммунология Урала*. 2005; 1: 31.
17. Годовалов А.П., Шилов Ю.И. Влияние адренергических соединений на иммунный ответ при экспериментальном тиреотоксикозе. *Вестник медицинской академической науки*. 2009; 2-1: 90.
18. Шилова Ю.А., Шилов Д.Ю., Шилов Ю.И. Влияние стресса на активность лейкоцитов периферической крови. *Успехи современного естествознания*. 2010; 7: 54-5.
19. Шилов Ю.И., Годовалов А.П. Влияние агониста и антагониста бета-адренорецепторов на кислород-зависимую микробицидную активность нейтрофилов периферической крови в НСТ-тесте при экспериментальном тиреотоксикозе. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2011; 2-1(35):79-80.
20. Шилов С.Ю., Шилов Ю.И. Влияние гидрокортизона и блокады бета-адренорецепторов в эффекторную фазу иммунного ответа на фагоцитарную активность клеток регионарного лимфатического узла, моноцитов крови и перитонеальных макрофагов. *Acta Biomedica Scientifica*. 2012; 3-2(85): 343-7.
21. Шилов Ю.И., Годовалов А.П. Адренергическая регуляция иммунного ответа при экспериментальном тиреотоксикозе у крыс. *Acta Biomedica Scientifica*. 2012; 3-2(85): 348-54.
22. Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Валиева Ю.В. Изменения нейтрофильного фагоцитоза при старении самцов и самок крыс, и введение им дегидроэпиаандростерона. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2014; 3(49): 47-8.
23. Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Туляев Я.А. и др. Экспериментальная модель зимозанового перитонита у крыс и ее использование в нейроиммунологии и фармакологии. В кн.: *Материалы II Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни»*. Пермь: 2018: 276-8.
24. Коваленко Е.И., Семенкова Г.Н., Черенкевич С.Н. Влияние пероксида водорода на способность нейтрофилов генерировать активные формы кислорода и хлора и секретировать миелопероксидазу in vitro. *Цитология*. 2007; 49(10): 839-47.
25. Гудков С.В., Брусков В.И., Куликов А.В., Бобылев А.Г., Куликов Д.А., Молочков А.В. Биоантиоксиданты: Обзор (часть 1). *Альманах клинической медицины*. 2014; 31: 61-5.

References

1. Gumanenko E.K. *Military Field Surgery. [Военно-полевая хирургия]*. Moscow: GJeOTAR-media; 2015. (In Russian)
2. D'yachenko S.V., Bobrovnikova M.Yu., Slobodenyuk E.V. Bacteriological monitoring of wound infections in a multidisciplinary surgical hospital. *Tihookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 1: 80-2. (In Russian)
3. Karalin A.N., Terent'ev V.A., Murzaeva L.G. Prevention and treatment of wound infections at the stages of medical evacuation. *Zdravoohranenie Chuvashii*. 2008; 2: 24-8. (In Russian)

4. Bordakov V.N. *Wound. Wound process. Principles of wound healing Rana. [Ranevoy process. Printsipy lecheniya ran]*. Minsk; BGMU. 2014. (In Russian)
5. Demkina E.V., Loyko N.G., Mulyukin A.L., Smirnova T.A., Gaponov A.M., Pisarev V.M. et al. Influence of factors of innate immunity on the development of antibiotic tolerance and the survival of bacterial populations subjected to antibiotic attack. *Mikrobiologiya*. 2015; 84(6): 660. (In Russian)
6. Weintrob A.C., Murray C.K., Xu J., Krauss M. et al. Early infections complicating the care of combat casualties from Iraq and Afghanistan. *Surgical Infections*. 2018; 19(3): 286-97.
7. Budihina A.S., Pinegin B.V. A-defensins – antimicrobial peptides of neutrophils: properties and functions. *Immunologiya*. 2008; 29(5): 317-20. (In Russian)
8. Gankovskaya L.V., Bogomil'skiy M.R., Gankovskaya O.A., Landa R.I., Lavrov V.F., Kitaygorodskiy A.P. et al. The role of defensins as factors of innate immunity in protecting the body of children with severe forms of para-tonsillitis. *Epidemiologiya i vaksionoprofilaktika*. 2011; 5(60): 30-3. (In Russian)
9. Vahrmeeva T.N., Bedareva T.Yu. Defensins as a marker of systemic neutrophil activation in tick-borne neuroinfections. *Meditsina v Kuzbasse*. 2008; 3: 15-9. (In Russian)
10. Ovsyannikov V.G., Alekseev V.V. Algology (teaching about pain): study guide. *[Algologiya (uchenie o boli): uchebnoe posobie]*. Rostov-on-Don; RostSMU; 2017. (In Russian)
11. Mayanskiy D.N., Cyrendorzhiev D.D., Makarova O.P. *The diagnostic value of leukocyte tests. Part 2: Determination of leukocyte biocidal behavior: Method. recommendations. [Diagnosticheskaya tsennost' leykotsitarnykh testov. Ch.2: Opredelenie biotsidnosti leykotsitov: Metod. rekomendatsii]*. Novosibirsk; SD RAMN; 1996. (In Russian)
12. Navratilova E., Atcherley C.W., Porreca F. Brain Circuits Encoding Reward from Pain Relief. *Trends Neurosci*. 2015; 38(11): 741–50. doi: 10.1016/j.tins.2015.09.003
13. Nicholls A.S., Wen Wen S., Hall P. Activation of the sympathetic nervous system modulates neutrophil function. *Journal of Leukocyte Biology*. 2017; 103(2): 295-309.
14. Orlova E.G., Lanin D.V., Shilov Yu.I. Modulation of the functional expression of adrenoceptors of phagocytic cells under acute stress and the administration of hydrocortisone. *Meditsinskaya immunologiya*. 2003; 5(3-4): 209. (In Russian)
15. Shilov Yu.I., Shilov S.Yu., Lanin D.V. Adrenergic mechanisms of regulation of the immune response and functions of non-specific effector cells during stress. *Meditsinskaya immunologiya*. 2005; 7(2-3): 127. (In Russian)
16. Shilov S.Yu., Shilov Yu.I., Chereshev V.A. Adrenergic mechanisms in the implementation of the immunomodulating effects of glucocorticoids. *Immunologiya Urala*. 2005; 1: 31. (In Russian)
17. Godovalov A.P., Shilov Yu.I. Effect of adrenergic compounds on the immune response in experimental thyrotoxicosis. *Vestnik meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2009; 2-1: 90. (In Russian)
18. Shilova Yu.A., Shilov D.Yu., Shilov Yu.I. Effect of stress on the activity of peripheral blood leukocytes. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2010; 7: 54-5. (In Russian)
19. Shilov Yu.I., Godovalov A.P. Effect of beta-adrenoceptor agonist and antagonist on the oxygen-dependent microbicidal activity of peripheral blood neutrophils in the NBT test for experimental thyrotoxicosis. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2011; 2-1(35): 79-80. (In Russian)
20. Shilov S.Yu., Shilov Yu.I. Effect of hydrocortisone and beta-adrenoceptor blockade in the effector phase of the immune response to phagocytic activity of cells of the regional lymph node, blood monocytes and peritoneal macrophages. *Acta Biomedica Scientifica*. 2012; 3-2(85): 343-7. (In Russian)
21. Shilov Yu.I., Godovalov A.P. Adrenergic regulation of the immune response in experimental thyrotoxicosis in rats. *Acta Biomedica Scientifica*. 2012; 3-2(85): 348-54. (In Russian)
22. Shilov Yu.I., Shilov S.Yu., Valieva Yu.V. Changes in neutrophilic phagocytosis during aging of male and female rats, and the introduction of dehydroepiandrosterone. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2014; 3(49): 47-8. (In Russian)
23. Shilov Yu.I., Shilov S.Yu., Tulyaev Ya.A. et al. An experimental model of zymosan peritonitis in rats and its use in neuroimmunology and pharmacology. *[Materialy II Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii «Y vysokie tehnologii, opredelyayushhie kachestvo zhizni»]*. Perm'; 2018: 276-8. (In Russian)
24. Kovalenko E.I., Semenkova G.N., Cherenkevich S.N. The effect of hydrogen peroxide on the ability of neutrophils to generate reactive oxygen and chlorine forms and secrete myeloperoxidase in vitro. *Tsitologiya*. 2007; 49(10): 839-47. (In Russian)
25. Gudkov S.V., Bruskov V.I., Kulikov A.V., Bobyl'ov A.G., Kulikov D.A., Molochkov A.V. Bioantioxidants: An Overview (Part 1). *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2014; 31: 61-5. (In Russian)

Сведения об авторах:

Алексеев Владимир Вячеславович, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России;

Каде Азамат Халидович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.18:616-006.6

Абакумова Т.В.¹, Генинг С.О.¹, Долгова Д.Р.¹, Антонеева И.И.^{1,2}, Генинг Т.П.¹, Федотова А.Ю.¹

Транскрипционные факторы HIF-1 α и NF- κ B в опухолевой ткани и клетках асцита при распространённом раке яичников

¹ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»,

432017, г. Ульяновск, Россия, ул. Льва Толстого, д. 42;

²ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер,

432017, г. Ульяновск, Россия, ул. 12 Сентября, д. 90

Введение. Транскрипционный фактор NF- κ B относят к эндогенным промоторам, вовлечённым в опухоль-индуцированное воспаление связанное с раком, который может быть активирован в ответ на гипоксию как и HIF-1 α . При этом между системами NF- κ B и HIF-1 α могут существовать взаимосвязи компенсаторные пути. **Цель исследования** – изучение уровня экспрессии транскрипционных факторов HIF-1 α и NF- κ B в ткани первичной опухоли и опухолевых клетках асцитической жидкости и их корреляции с чувствительностью к платиносодержащей химиотерапии у больных распространённым раком яичников. **Методика.** У 20 больных с впервые диагностированным асцитным серозным раком яичников стадии T₃N_{x-1}M₀ и T₃N_{x-1}M₁ сразу после верификации диагноза получали асцитическую жидкость и выделяли эпителиальные клетки, а также забирали интраоперационно опухолевую и гистологически неизменную ткань яичника, в которых оценивали уровень HIF-1 α и NF- κ B методом иммуноферментного анализа (eBioscience, США и Cloud-CloneCorp., США). Ядерные экстракты для определения содержания HIF-1 α и NF- κ B готовили в соответствии с инструкцией изготовителя. В зависимости от распространенности опухолевого процесса определяли экспрессию транскрипционных факторов, их корреляцию, а также прогностическую значимость в оценке безрецидивной выживаемости при раке яичников. **Результаты.** Корреляционные исследования показали статистически значимое увеличение (в 12 раз) содержания HIF-1 α в опухолевой ткани рака яичников по сравнению с гистологически неизменной тканью, в асцитической жидкости – в 3,1 раза; уровень NF- κ B в опухолевой ткани значимо возрастал в 6,5 раза, в асцитической жидкости – в 2,2 раза. В гистологически неизменной ткани яичников, у пациенток стадии T₃N_{x-1}M₁ по сравнению с материалом от больных стадии T₃N_{x-1}M₀ экспрессия обоих факторов была снижена. Корреляционные связи между содержанием HIF-1 α и NF- κ B как в опухолевой так и в гистологически неизменной ткани были положительными сильными у пациентов на стадии T₃N_{x-1}M₀ и в клетках асцитической жидкости на стадии T₃N_{x-1}M₁. Установлено, что высокие уровни экспрессии в ткани опухоли HIF-1 α и NF- κ B резко сокращают длительность безрецидивного периода. **Заключение.** Полученные данные позволяют предполагать активацию основных сигнальных путей, обеспечивающих ассоциированные с опухолью воспалительные реакции при раке яичников стадии T₃N_{x-1}M₁.

Ключевые слова: рак яичников; асцит; HIF-1 α ; NF- κ B.

Для цитирования: Абакумова Т.В., Генинг С.О., Долгова Д.Р., Антонеева И.И., Генинг Т.П., Федотова А.Ю. Транскрипционные факторы HIF-1 α и NF- κ B в опухолевой ткани и клетках асцита при распространённом раке яичников. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 30-36.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.30-36

Для корреспонденции: Генинг Татьяна Петровна, e-mail: Naum-53@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МК-3196.2018.7).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Генинг Т.П., Долгова Д.Р.; сбор и обработка материала – Абакумова Т.В., Антонеева И.И., Долгова Д.Р., Федотова А.Ю., Генинг С.О.; статистическая обработка – Абакумова Т.В., Генинг Т.П.; написание текста – Генинг Т.П.; редактирование – Генинг С.О.

Поступила 13.08.2019

Принята в печать 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Abakumova T.V.¹, Gening S.O.¹, Dolgova D.R.¹, Antonееva I.I.^{1,2}, Gening T.P.¹, Fedotova A.Yu.¹

Transcription factors HIF-1 α and NF- κ B of tumor tissue and ascites cells in advanced ovarian cancer

¹Ulyanovsk State University, 2 L'va Tolstogo Str., Ulyanovsk 432017, Russia;²Regional Clinical Oncology Dispensary, Ulyanovsk, 90, 12 Sentyabrya Str., Ulyanovsk 432017, Russia

Introduction. NF- κ B belongs to endogenous promoters involved in tumor-associated inflammation. Like HIF-1 α , NF- κ B can also be activated in response to hypoxia. In this case, cross-talks and compensatory pathways can link the NF- κ B and HIF-1 α

systems. **The aim** of this study was to evaluate the expression of transcription factors HIF-1 α and NF- κ B in primary tumor tissue and ascites tumor cells and their correlation with sensitivity to platinum-containing chemotherapy (CT) in patients with advanced ovarian cancer (OC). **Methods.** Samples of ascitic fluid were obtained from 20 patients with first diagnosed and verified stage T₃N_{x-1}M₀ and T₃N_{x-1}M₁ ascitic serous OC immediately after diagnosis, and epithelial cells were isolated from the ascitic fluid. Samples of tumor tissue and histologically normal ovarian tissue were also obtained from patients intraoperatively. Contents of HIF-1 α and NF- κ B were measured using enzyme immunoassay (eBioscience, USA and Cloud-Clone Corp., USA) in all samples. Nuclear extracts for measuring HIF-1 α and NF- κ B were prepared according to the manufacturer's instructions. Expression of transcription factors, their correlation, and prognostic significance for relapse-free survival were determined depending on the tumor spread. **Results.** The content of HIF-1 α was 12 times higher in the ovarian tumor tissue ($p < 0.05$) and 3.1 times higher in ascitic fluid ($p < 0.05$) than in histologically normal tissue; the content of NF- κ B was increased 6.5 times in the tumor tissue ($p \leq 0.05$) and 2.2 times in ascitic fluid ($p \leq 0.05$). The expression of both factors was reduced in histologically normal ovarian tissue from patients with the T₃N_{x-1}M₁ stage compared to patients with the T₃N_{x-1}M₀ stage. A strong positive correlation was observed for contents of HIF-1 α and NF- κ B in both tumor and histologically unchanged tissue from patients with the T₃N_{x-1}M₀ stage and in ascites cells from patients with the T₃N_{x-1}M₁ stage. It was established that high levels of HIF-1 α and NF- κ B expression in tumor tissue dramatically reduced duration of the relapse-free period. **Conclusion.** The study results suggest activation of major signaling pathways for tumor-associated inflammatory reactions in T₃N_{x-1}M₀ stage OC.

Keywords: ovarian cancer; ascites; HIF-1 α , NF- κ B.

For citation: Abakumova T.V., Gening S.O., Dolgova D.R., Antoneeva I.I., Gening T.P., Fedotova A.Yu. Transcription factors HIF-1 α and NF- κ B of tumor tissue and ascites cells in advanced ovarian cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 30-36. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.30-36

For correspondence: Tatyana P. Gening, Head of the Department, Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University; 42 Leo Tolstoy Str., Ulyanovsk 432017, Russian Federation, e-mail: Naum-53@yandex.ru

Acknowledgments. The work was supported by a grant from the President of the Russian Federation (MK-3196.2018.7).

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

Contribution: The concept and design of the study — Gening T.P., Dolgova D.R.; collection and processing of material — Abakumova T.V., Antoneeva I.I., Dolgova D.R., Fedotova A.Yu. Gening S.O.; statistical processing — Abakumova T.V., Gening T.P.; writing a text — Gening T.P.; editing — Gening S.O. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article — all authors.

Information about the authors:

Abakumova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-7559-5246>

Received 13.08.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Введение

Рак яичников (РЯ) — крайне агрессивное злокачественное новообразование [1]. На настоящий момент для оценки прогноза заболевания в обычной клинической практике используются такие лабораторные критерии, как уровень СА-125 сыворотки крови, наличие мутаций генов системы гомологичной рекомбинации, уровень лечебного патоморфоза в опухоли после неoadъювантной химиотерапии. Длительность безрецидивного периода после химиотерапии первой линии напрямую влияет на эффективность последующего лечения; при этом валидизированных маркеров первичной платинорезистентности не существует [2].

Показано, что системное воспаление не только сопровождает развитие рака яичников, но и играет существенную роль в его патогенезе [3]. При раке яичников 29% летальных исходов являются следствием

осложнений воспаления [4]. Белок HIF-1 α регулирует семейство генов, продукты которых опосредуют клеточную пролиферацию, ангиогенез, выживаемость, инвазию и миграцию клеток, влияет на экспрессию ряда генов, связанных с воспалением [5]. Кроме гипоксии HIF активируется факторами роста и онкогенами, а также NF- κ B [6].

Семейство факторов транскрипции NF- κ B является регулятором более 400 генов, участвующих в процессах воспаления, апоптоза, контроле клеточного цикла [7, 8]. Показано, что при РЯ NF- κ B поддерживает существование популяции раковых стволовых клеток (РСК) [9-11]. Активация NF- κ B в ответ на действие цисплатина может приводить к стимуляции экспрессии антиапоптотических факторов, дефектам в апоптозе и вторичной платинорезистентности [12]. На сегодня установлены регуляторные механизмы,

связывающие воспаление и рак [13]. При опухоли-индуцированном воспалении генетические события, вызывающие неоплазию, активируют программы, связанные с воспалением. Ядерный фактор NF- κ B относят к эндогенным промоторам, вовлечённым в воспаление, связанное с раком [14]. Так же показано, что NF- κ B может быть активирован в ответ на гипоксию, хотя в меньшей степени, чем индуцируемый гипоксией фактор HIF-1 α [14]. При этом между системами NF- κ B и HIF-1 α могут существовать пересечения и компенсаторные пути.

Цель исследования — изучение уровня экспрессии транскрипционных факторов HIF-1 α и NF- κ B в ткани первичной опухоли и опухолевых клетках асцитической жидкости и их корреляции с периодом безрецидивной выживаемости у больных с распространённым раком яичников.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Исследование проведено согласно требованиям комиссии по этике Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (протокол № 3 от 15.03.2015). В исследование были включены больные в возрасте от 40 до 65 лет (медиана 57 лет), проходившие лечение в Ульяновском областном клиническом онкологическом диспансере в 2015–2017 гг. Критериями включения были: впервые диагностированный и верифицированный асцитный рак яичников (III–IV стадия по FIGO), общее состояние больной по шкале Eastern Cooperative Oncology Group 0 ± 2 , ожидаемая продолжительность жизни не менее 6 мес, подписанное информированное согласие.

Сразу после установления диагноза больным выполнялась циторедуктивная операция, в ходе которой получали опухолевую и гистологически неизменную ткань яичника, находящуюся на расстоянии не менее 2 см от границы опухоли. В дальнейшем больные этой группы получали адъювантную химиотерапию по схеме AP. До начала лечения получали асцит и выделяли из асцитической жидкости эпителиальные клетки.

В зависимости от времени возникновения рецидива после последнего курса ХТ все пациентки были разделены на две группы: I группа — с рецидивом в течение 6–12 мес ($n=9$, медиана возраста $62 \pm 2,5$ лет) и

II группа — без рецидива ($n=11$, медиана возраста $51,5 \pm 8,4$ года). В ткани опухоли и эпителиальных клетках асцитической жидкости уровень NF- κ B и HIF-1 α оценивали с использованием наборов NF- κ Bp65 Phospho-NF κ Bp65 (Ser536) (eBioscience, США) и ELISA Kit for Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha (HIF1 α) (Cloud-Clone Corp., США) методом иммуноферментного анализа. Ядерные экстракты для определения содержания HIF-1 α и NF- κ B готовили в соответствии с инструкцией изготовителя.

Статистический анализ данных производили с помощью пакета прикладных программ Statistica 10. В качестве центральной характеристики применяли медиану; при сравнении использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали данные при $p \leq 0,05$. Для оценки безрецидивной выживаемости пациентов использовали критерий Каплан–Майера.

Результаты

В результате проведённых исследований установлено, что в опухолевой ткани по сравнению с гистологически неизменной тканью содержание HIF-1 α возросло в 12 раз, NF- κ B — в 6,5 раза.

В опухолевых клетках асцитической жидкости уровень HIF-1 α был ниже, чем в опухолевой ткани, но превышал уровень фактора в нормальной ткани в 3,1 раза. Содержание NF- κ B в асцитической жидкости также превышало его уровень в гистологически неизменной ткани яичника в 2,2 раза (**табл. 1**).

Из данных **табл. 2** следует, что экспрессия HIF-1 α значимо зависит от наличия метастазов только в гистологически неизменной ткани яичника. Выявлено, что содержание HIF-1 α снижается у больных с метастазами (M_1) по сравнению с больными со стадией M_0 . Экспрессия NF- κ B также снижалась у пациентов стадии $T_3N_{x-1}M_1$ по сравнению со стадией $T_3N_{x-1}M_0$. В опухолевой ткани и эпителиальных клетках асцитической жидкости значимых изменений содержания HIF-1 α и NF- κ B в зависимости от наличия метастазов не выявлено.

Корреляция содержания HIF-1 α и NF- κ B может свидетельствовать о возможности одновременной активации этих транскрипционных факторов при прогрессировании рака яичников. Корреляционные связи между содержанием HIF-1 α и NF- κ B были сильными положительными у пациентов с отсутствием метастазов (M_0) как в гистологически неизменной ($r=1,000, p \leq 0,01$), так и в опухолевой ткани ($+ - + = 1,000, p \leq 0,01$). Связи резко ослаблялись у пациентов с наличием метастазов (M_1). В эпителиальных клетках асци-

тической жидкости уровень HIF-1α коррелировал с содержанием NF-kB ($r=0,6848, p \leq 0,05$).

Прогнозирование исхода заболевания крайне актуально, поскольку рак яичников склонен к раннему метастазированию. Была исследована прогностическая значимость определения транскрипционных факторов NF-kB и HIF-1α в оценке безрецидивной выживаемости больных с использованием критерия Каплан-Майера. В качестве пороговых значений был использован их средний уровень. Нами установлено, что у 70% пациентов с асцитной формой рака яичников отмечены ранние рецидивы. При этом в группе больных с высоким уровнем HIF-1α в опухолевых клетках медиана безрецидивного периода составила 250±81 сут; в группе с низким уровнем HIF-1α медиана безрецидивного периода не была достигнута ($p=0,06415$) (рис. 1, а).

В группе больных с высоким уровнем NF-kB в опухолевых клетках медиана безрецидивного периода составила 250±74 сут; в группе с низким уровнем NF-kB медиана не была достигнута ($p=0,16309$) (рис. 1, б).

При оценке периодов безрецидивной выживаемости у больных раком яичников в зависимости от уровня HIF-1α в клетках асцитической жидкости установлено, что при высоких значениях фактора этот период составил 261±64 сут, а при низких – 425±124 сут ($p=0,20245$) (рис. 2, а). Различия показателей длительности безрецидивного периода в зависимости от уровня NF-kB в опухолевых клетках асцитической жидкости были статистически не значимы ($p=0,99802$) (рис. 2, б).

Во всех исследованных опухолях и гистологически неизмененных тканях яичника, а также в эпителиальных клетках асцитической жидкости обнаружены из-

Таблица 1

Экспрессия транскрипционных факторов HIF-1α и NF-kB в ткани опухоли и опухолевых клетках асцита больных раком яичников

Исследуемая ткань <i>n</i> =20	Фактор транскрипции	M±m	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
Гистологически неизменная ткань	HIF-1α	3,831±1,634	1,151	0,965	4,088
	NF-kB	0,019±0,009	0,011	0,002	0,016
Ткань опухоли	HIF-1α	36,685±10,695 <i>p</i> =0,023	37,094	9,976	39,089
	NF-kB	0,125±0,029 <i>p</i> =0,0041	0,112	0,099	0,156
Эпителиальные клетки асцитической жидкости <i>n</i> =20	HIF-1α	12,022±2,518 <i>p</i> =0,0072	9,027	4,092	15,074
	NF-kB	0,055±0,015 <i>p</i> =0,1085	0,020	0,011	0,094

Примечание. *p* – статистическая значимость различий с соответствующими показателями в гистологически неизменной ткани.

Таблица 2

Экспрессия транскрипционных факторов HIF-1α и NF-kB в ткани опухоли в зависимости от наличия метастазов при раке яичников (M₀-M₁)

Группа	Нормальная ткань		Опухолевая ткань		Эпителиальные клетки асцитической жидкости	
	T ₃ N _{x-1} M ₀ <i>n</i> =12	T ₃ N _{x-1} M ₁ <i>n</i> =8	T ₃ N _{x-1} M ₀ <i>n</i> =12	T ₃ N _{x-1} M ₁ <i>n</i> =8	T ₃ N _{x-1} M ₀ <i>n</i> =12	T ₃ N _{x-1} M ₁ <i>n</i> =8
HIF-1α, пг/мг б	7,217±3,020 (0,573-14,075)	1,151±0,325 (0,151-3,085) <i>p</i> =0,0541	34,568±26,101 (6,724-112,847)	39,089±5,657 (18,888-69,717) <i>p</i> =0,1649	13,695±4,482 (1,492-46,933)	10,350±2,465 (2,907-27,209) <i>p</i> =0,8798
NF-kB, пг/мг б	0,033±0,019 (0,0009-0,0842)	0,006±0,001 (0,002-0,012) <i>p</i> =0,0013	0,109±0,068 (0,004-0,303)	0,143±0,013 (0,082-0,175) <i>p</i> =0,1769	0,048±0,019 (0-0,189)	0,062±0,024 (0,0009-0,204) <i>p</i> =0,5947

Примечание. *p* – статистическая значимость различий с соответствующими показателями при T₃N_{x-1}M₀.

меряемые количества HIF-1 α и NF-kB. Содержание HIF-1 α и NF-kB в опухолевой ткани и эпителиальных клетках асцитической жидкости было значимо выше, чем в неизмененных тканях яичника.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сильной положительной корреляционной связи между повышением уровней HIF-1 α и NF-kB в опухолевой ткани и эпителиальных клетках асцитической

жидкости, а также о наличии тенденции к сокращению периода безрецидивной выживаемости больных распространенным раком яичников при активации основных сигнальных путей, обеспечивающих ассоциированные с опухолью воспалительные реакции. Таким образом, оценка статуса HIF-1 α /NF-kB-сигналинга может быть полезна в плане прогнозирования клинических исходов при раке яичников.

а

б

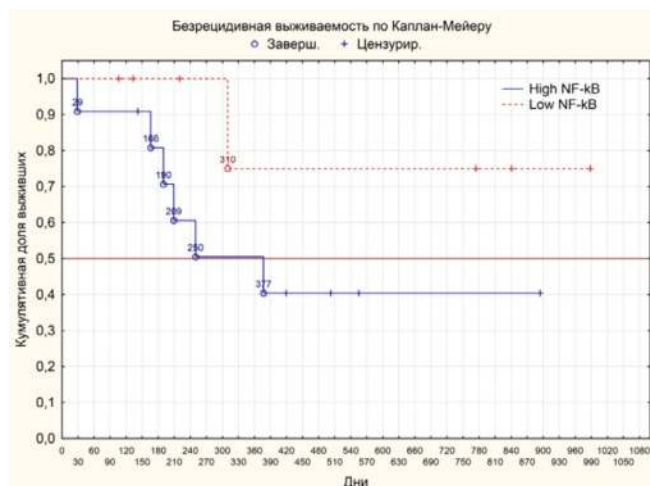
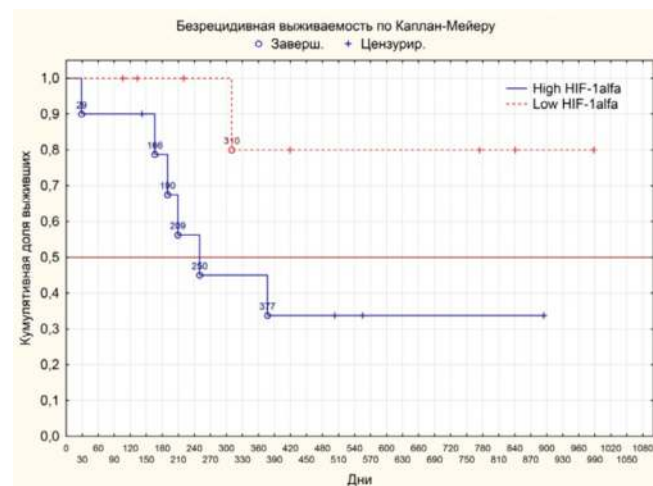


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных в зависимости от уровня HIF-1 α (а) и NF-kB (б) в опухолевой ткани яичника.

а

б

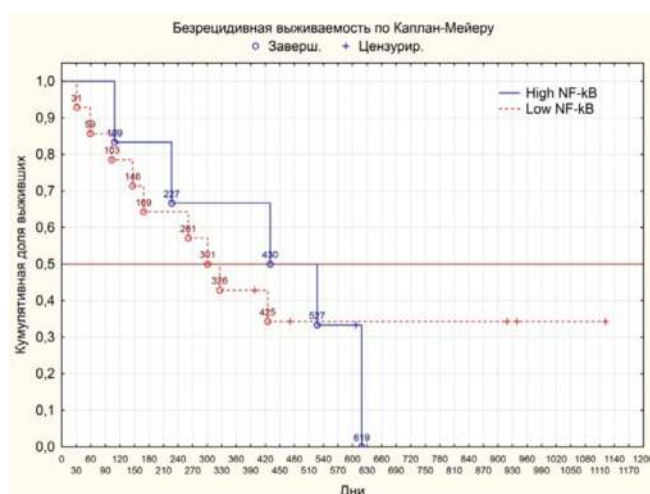
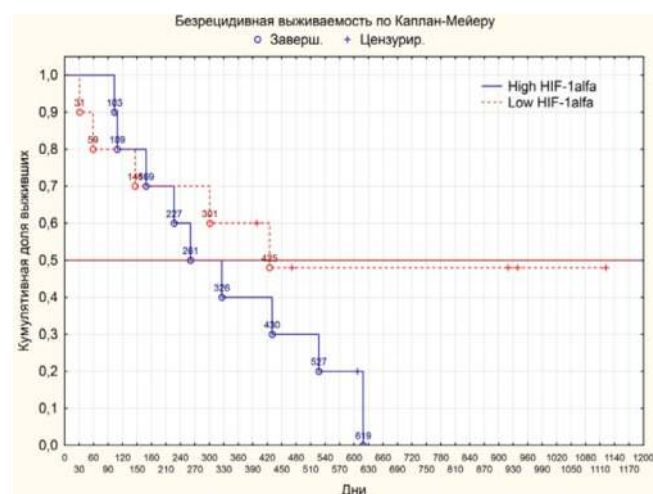


Рис. 2. Безрецидивная выживаемость больных в зависимости от уровня HIF-1 α (а) и NF-kB (б) в клетках асцитической жидкости.

Литература

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. ред. *Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году*. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018. <http://oncology-association.ru>
- Colombo N., Sessa C., du Bois A., Ledermann J., McCluggage W.G., McNeish I., et al. On behalf of the ESMO–ESGO Ovarian Cancer Consensus Conference Working Group. ESMO–ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease. *Annals of Oncology*. 2019; 30: 672–705. doi: 10.1136/ijgc-2019-000308
- Wang Y.Q., Jin C., Zheng H.M., Zhou K., Shi B.B., Zhang Q., et al. A novel prognostic inflammation score predicts outcomes in patients with ovarian cancer. *Clin Chim Acta*. 2016; 456: 163–9. doi: 10.1016/j.cca.2016.03.013. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898116300985?via%3Dihub>
- Chen W., Zheng R., Baade P.D., Zhang S., Zeng H., Bray F., et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2016; 66(2): 115–32. doi: 10.3322/caac.21338. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21338>
- Дмитриева О.С., Шиловский И.П., Хаитов М.Р., Гривенников С.И. Интерлейкин 1 и интерлейкин 6 как главные медиаторы воспаления при развитии рака (обзор). *Биохимия*. 2016; 81; 2: 166–78. doi: 10.1134/S0006297916020024 <https://link.springer.com/article/10.1134%2FS0006297916020024>
- D'Ignazio L., Bandarra D., Rocha S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J*. 2016; 283(3): 413–24. doi: 10.1111/febs.13578. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.13578>
- Кобляков В.А. HIF α как объект воздействия различных онкобелков при канцерогенезе. *Успехи молекулярной онкологии*. 2018; 5(4): 64–71. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-4-64-71>
- Zheng B., Geng L., Zeng L., Liu F., Huang Q. AKT2 contributes to increase ovarian cancer cell migration and invasion through the AKT2-PKM2-STAT3/NF- κ B axis. *Cell Signal*. 2018; 45: 122–31. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.01.021. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656818300275?via%3Dihub>
- Thakur B., Ray P. Cisplatin triggers cancer stem cell enrichment in platinum-resistant cells through NF- κ B-TNF α -PIK3CA loop. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017; 36(1): 164. doi: 10.1186/s13046-017-0636-8. <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-017-0636-8>
- Qin J., Liu Y., Lu Y., Liu M., Li M., Li J., Wu L. Hypoxia-inducible factor 1 alpha promotes cancer stem cells-like properties in human ovarian cancer cells by upregulating SIRT1 expression. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 10592. doi: 10.1038/s41598-017-09244-8. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-09244-8>
- House C.D., Jordan E., Hernandez L., Ozaki M., James J.M., Kim M., et al. NF κ B Promotes Ovarian Tumorigenesis via Classical Pathways That Support Proliferative Cancer Cells and Alternative Pathways That Support ALDH⁺ Cancer Stem-like Cells. *Cancer Res*. 2017; 77(24): 6927–40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0366. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/77/24/6927.long>
- Miow Q.H., Tan T.Z., Ye J., Lau J.A., Yokomizo T., Thierry J.P., Mori S. Epithelial-mesenchymal status renders differential responses to cisplatin in ovarian cancer. *Oncogene*. 2015; 34(15): 1899–907. doi: 10.1038/onc.2014.136. <https://www.nature.com/articles/onc2014136>
- Fernandes J.V., Cobucci R.N., Jatobá C.A., Fernandes T.A., de Azevedo J.W., de Araújo J.M. The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathol Oncol Res*. 2015; 21(3): 527–34.
- Yilmaz E., Gul M., Melekoglu R., Koleli I. Immunohistochemical analysis of Nuclear Factor Kappa Beta expression in etiopathogenesis of ovarian tumors. *Acta Cir Bras*. 2018; 33(7): 641–50.

527–34. doi: 10.1007/s12253-015-9913-z. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12253-015-9913-z>

- Yilmaz E., Gul M., Melekoglu R., Koleli I. Immunohistochemical analysis of Nuclear Factor Kappa Beta expression in etiopathogenesis of ovarian tumors. *Acta Cir Bras*. 2018; 33(7): 641–50. doi: 10.1590/s0102-865020180070000009. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-8650201800700641&lng=en&nrm=iso&tlng=en

References

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ed. *The status of cancer care for the population of Russia in 2017. [Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2017 godu]*. Moscow: Moscow Cancer Research Institute (MCRI) named after P.A. Herzen-Federal State Budgetary Institution National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. (in Russian)
- Colombo N., Sessa C., du Bois A., Ledermann J., McCluggage W.G., McNeish I., et al. On behalf of the ESMO–ESGO Ovarian Cancer Consensus Conference Working Group. ESMO–ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease. *Annals of Oncology*. 2019; 30: 672–705. doi: 10.1136/ijgc-2019-000308
- Wang Y.Q., Jin C., Zheng H.M., Zhou K., Shi B.B., Zhang Q., et al. A novel prognostic inflammation score predicts outcomes in patients with ovarian cancer. *Clin Chim Acta*. 2016; 456: 163–9.
- Chen W., Zheng R., Baade P.D., Zhang S., Zeng H., Bray F., et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2016; 66(2): 115–32.
- Dmitrieva O.S., Shilovskij I.P., Haitov M.R., Grivennikov S.I. Interleukins 1 and 6 as main mediators of inflammation and cancer. *Biokhimiya*. 2016; 81(2): 166–78. (in Russian)
- D'Ignazio L., Bandarra D., Rocha S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J*. 2016; 283(3): 413–24.
- Koblyakov V.A. HIF α as a target for different oncoproteins during carcinogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2018; 5(4): 64–71. (in Russian)
- Zheng B., Geng L., Zeng L., Liu F., Huang Q. AKT2 contributes to increase ovarian cancer cell migration and invasion through the AKT2-PKM2-STAT3/NF- κ B axis. *Cell Signal*. 2018; 45: 122–31.
- Thakur B., Ray P. Cisplatin triggers cancer stem cell enrichment in platinum-resistant cells through NF- κ B-TNF α -PIK3CA loop. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017; 36(1): 164.
- Qin J., Liu Y., Lu Y., Liu M., Li M., Li J., Wu L. Hypoxia-inducible factor 1 alpha promotes cancer stem cells-like properties in human ovarian cancer cells by upregulating SIRT1 expression. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 10592.
- House C.D., Jordan E., Hernandez L., Ozaki M., James J.M., Kim M., et al. NF κ B Promotes Ovarian Tumorigenesis via Classical Pathways That Support Proliferative Cancer Cells and Alternative Pathways That Support ALDH⁺ Cancer Stem-like Cells. *Cancer Res*. 2017; 77(24): 6927–40.
- Miow Q.H., Tan T.Z., Ye J., Lau J.A., Yokomizo T., Thierry J.P., Mori S. Epithelial-mesenchymal status renders differential responses to cisplatin in ovarian cancer. *Oncogene*. 2015; 34(15): 1899–907.
- Fernandes J.V., Cobucci R.N., Jatobá C.A., Fernandes T.A., de Azevedo J.W., de Araújo J.M. The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathol Oncol Res*. 2015; 21(3): 527–34.
- Yilmaz E., Gul M., Melekoglu R., Koleli I. Immunohistochemical analysis of Nuclear Factor Kappa Beta expression in etiopathogenesis of ovarian tumors. *Acta Cir Bras*. 2018; 33(7): 641–50.

Сведения об авторах:

Абакумова Татьяна Владимировна, канд. биол. наук, доцент, каф. физиологии и патофизиологии, e-mail: taty-abakumova@yandex.ru;

Генинг Снежанна Олеговна, аспирант каф. онкологии и лучевой диагностики, ассистент каф. физиологии и патофизиологии, e-mail: sgening@bk.ru;

Долгова Динара Ришатовна, канд. биол. наук, доцент, каф. физиологии и патофизиологии, e-mail: dolgova.dinara@yandex.ru;

Антонеева Инна Ивановна, доктор мед. наук, доцент, проф. каф. онкологии и лучевой диагностики, e-mail: aii72@mail.ru;

Генинг Татьяна Петровна, доктор биол. наук, проф., зав. каф. физиологии и патофизиологии, e-mail: Naum-53@yandex.ru;

Федотова Антонина Юрьевна, инженер-исследователь Научно-исследовательского медико-биологического центра, e-mail: tonechkatuzeeva@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.428:616-006.66:616-085:616-089:616-092.9

Казаков О.В.¹, Повещенко А.Ф.^{1,2}, Орлов Н.Б.¹, Райтер Т.В.¹, Повещенко О.В.¹,
Кабаков А.В.¹, Стрункин Д.Н.¹, Лыков А.П.¹, Коненков В.И.¹

Взаимосвязь содержания цитокинов лимфы и структурных преобразований в брыжеечных лимфатических узлах при химиотерапии, оперативном лечении и химиотерапии экспериментального рака молочной железы

¹НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»,
630060, г. Новосибирск, Россия, ул. Тимакова, д. 2;²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет»,
630126, г. Новосибирск, Россия, ул. Виллюйская, д. 28

Цель исследования – анализ корреляции морфометрии брыжеечных лимфатических узлов и концентрации цитокинов в лимфе грудного протока при химиотерапии рака молочной железы, хирургическом лечении и последующей химиотерапии. **Методика.** Рак молочной железы индуцировали введением N-метил-N-нитрозомочевины 5 раз с интервалом 7 сут подкожно в область 2-й молочной железы справа. Курс химиотерапии проходил по схеме CMF. Корреляцию между концентрациями 24 цитокинов лимфы и числом клеток структурных зон лимфатических узлов оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена. **Результаты.** После химиотерапии РМЖ, по сравнению с РМЖ без лечения, морфологические преобразования в лимфатических узлах свидетельствуют о снижении активности местного иммунного ответа. Исследование корреляции концентрации цитокинов в лимфе со структурными изменениями в лимфатических узлах выявило зависимости направленные на повышение иммуномодулирующего и противоопухолевого действия цитокинов. После оперативного лечения РМЖ и последующей химиотерапии, по сравнению только с химиотерапией РМЖ, выявлены положительные связи иммунобластов с цитокином GRO/KC в герминативных центрах, цитокина IL-6 – с митотически делящимися клетками в герминативных центрах и мозговых тяжах, IL-5 – с иммунобластами в мозговых тяжах, хемокина MIP-1a – со зрелыми плазматическими клетками в мозговых синусах. Увеличено количество иммунобластов, средних и малых лимфоцитов в герминативных центрах, возросло количество малых лимфоцитов, незрелых и зрелых плазматических клеток в мозговых синусах. Увеличены площади мозговых тяжей и паракортикальной зоны. Выявлена корреляция: цитокина IL-1α с малыми лимфоцитами, IL-6 с иммунобластами, IL-7 и IL-18 – со средними лимфоцитами, GRO/KC – с иммунобластами, IL-17 – с макрофагами в T-зависимой зоне; IL-7 и IL-18 – с иммунобластами, IL-12 – с макрофагами, MIP-1a и MCP-1 со зрелыми плазматическими клетками в мозговых синусах. **Заключение.** После оперативного лечения РМЖ с последующей химиотерапией, по сравнению только с химиотерапией РМЖ, выявлены взаимозависимости концентрации цитокинов в лимфе грудного протока с морфологическими изменениями в брыжеечных лимфатических узлах, которые могут указывать на повышение активности местного звена иммунного ответа.

Ключевые слова: лимфатические узлы; цитокины лимфы; рак молочной железы; химиотерапия; оперативное лечение; крысы.

Для цитирования: Казаков О.В., Повещенко А.Ф., Орлов Н.Б., Райтер Т.В., Повещенко О.В., Кабаков А.В., Стрункин Д.Н., Лыков А.П., Коненков В.И. Взаимосвязь содержания цитокинов лимфы и структурных преобразований в брыжеечных лимфатических узлах при химиотерапии, оперативном лечении и химиотерапии экспериментального рака молочной железы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 37-45.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.37-45

Для корреспонденции: Казаков Олег Васильевич, e-mail: kazakoff_oleg@mail.ru**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Казаков О.В., Повещенко А.Ф.;

сбор и обработка материала – Казаков О.В., Кабаков А.В., Орлов Н.Б., Райтер Т.В., Повещенко О.В.; статистическая обработка – Лыков А.П., Стрункин Д.Н.; написание текста – Казаков О.В., Повещенко А.Ф.; редактирование – Коненков В.И.

Поступила 25.11.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликовано 28.05.2020

Kazakov O.V.¹, Poveshchenko A.F.^{1,2}, Orlov N.B.¹, Reiter T.V.¹, Poveshchenko O.V.¹, Kabakov A.V.¹, Strunkin D.N.¹, Lykov A.P.¹, Kononkov V.I.¹

Relationship between lymph concentration of cytokines and structural transformations in mesenteric lymph nodes in chemotherapy, surgical treatment, and chemotherapy of experimental breast cancer

¹Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Timakova Str. 2, Novosibirsk 630060, Russia;

²Novosibirsk State Pedagogical University, Vilyuiskaya Str. 28, Novosibirsk 630126, Russia

The aim of this study was to analyze correlations of the morphometry of mesenteric lymph nodes with cytokine concentrations in thoracic duct lymph in chemotherapy and surgical treatment with subsequent chemotherapy of breast cancer. **Methods.** Breast cancer was induced by subcutaneous injection of N-methyl-N-nitrosourea 5 times with 7-day intervals, into the region of the 2nd breast on the right. The course of chemotherapy was performed according to the CMF scheme. Correlations between concentrations of 24 cytokines of the lymph and cells of lymph node structural regions were estimated by the Spearman rank correlation coefficient. **Results.** After chemotherapy for breast cancer compared to untreated breast cancer, morphological transformations in lymph nodes indicated decreased activity of the local immune response. Analysis of correlations between lymph concentrations of cytokines and structural changes in lymph nodes identified relationships aimed at increasing the immunomodulatory and antitumor effects of cytokines. After surgical treatment of breast cancer and subsequent chemotherapy compared to chemotherapy alone, positive correlations were found for immunoblasts with cytokine GRO/KC in germinative centers, for cytokine IL-6 with mitotically dividing cells in germinative centers and medullary cords, for IL-5 with immunoblasts in medullary cords, and for chemokine MIP-1a with mature plasma cells in medullary sinuses. Numbers of immunoblasts and medium and small lymphocytes were increased in germinative centers whereas numbers of small lymphocytes and immature and mature plasma cells were increased in medullary sinuses. Areas of medullary cords and the paracortical zone were increased. Correlations were found for cytokine IL-1 α with small lymphocytes, for IL-6 with immunoblasts, for IL-7 and IL-18 with medium lymphocytes, for GRO/KC with immunoblasts, for IL-17 with macrophages in the T-dependent zone, for IL-7 and IL-18 with immunoblasts, for IL-12 with macrophages, and for MIP-1a and MCP-1 with mature plasma cells in medullary sinuses. **Conclusion.** After surgical treatment of breast cancer and subsequent chemotherapy compared to chemotherapy alone, cytokine concentrations in lymph of the thoracic duct were observed to correlate with morphological changes in mesenteric lymph nodes, which may indicate increased activity of the local immune response.

Keywords: lymph nodes; lymph cytokines; breast cancer; chemotherapy; surgical treatment; rats.

For citation: Kazakov O.V., Poveshchenko A.F., Orlov N.B., Reiter T.V., Poveshchenko O.V., Kabakov A.V., Strunkin D.N., Lykov A.P., Kononkov V.I. Relationship between lymph concentration of cytokines and structural transformations in mesenteric lymph nodes in chemotherapy, surgical treatment, and chemotherapy of experimental breast cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 37-45. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.37-45

For correspondence: Oleg V. Kazakov, Candidate of Biological Sciences, leading researcher, «Scientific institution of clinical and experimental lymphology – branch of federal state budgetary scientific institution “Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics Siberian Division of the Russian Academy of Sciences”, 2 Timakova str., Novosibirsk 630060, Russian Federation, e-mail: kazakoff_oleg@mail.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Contribution: the concept and design of the study — Kazakov O.V., Poveshchenko A.F.; collection and processing of material — Kazakov O.V., Kabakov A.V., Orlov N.B., Reiter T.V., Poveshchenko O.V.; statistical processing — Lykov A.P., Strunkin D.N.; writing a text — Kazakov O.V., Poveshchenko A.F.; editing — Kononkov V.I.

Information about the authors:

Kazakov O.V., <http://orcid.org/0000-0003-3947-4038>

Poveshchenko A.F., <http://orcid.org/0000-0002-4433-7110>

Orlov N.B., <http://orcid.org/0000-0002-3437-7151>

Raiter T.V., <http://orcid.org/0000-0003-0883-9516>

Poveshchenko O.V., <http://orcid.org/0000-0001-9956-0056>

Kabakov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4741-6674>

Strunkin D.N., <http://orcid.org/0000-0003-4357-7443>

Lykov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-4897-8676>

Kononkov V.I., <http://orcid.org/0000-0001-7385-6270>

Received 25.11.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Рак молочной железы (РМЖ) является самой широко диагностируемой онкопатологией у женщин в большинстве стран мира [8]. Одним из патогенетических механизмов возникновения и прогрессии опухолевого роста являются белки, главным образом активированных клеток иммунной системы, обеспечивающие межклеточные взаимодействия — цитокины. Они секретируются как лимфоидными, так и опухолевыми клетками, оказывая влияние на множество различных клеток-мишеней, играя свою роль в патогенезе опухолевого роста и метастазировании, которое происходит, преимущественно, лимфогенно [4, 11]. При метастазировании основным, а зачастую, единственным методом лечения рака является химиотерапия (ХТ), которая усугубляет имеющийся дисбаланс в иммунной системе, оказывая повреждающее действие на лимфоидную ткань, что является одной из центральных проблем терапии опухолей. Изучение взаимосвязи содержания цитокинов в лимфе грудного протока со структурными изменениями в брыжеечных лимфатических узлах при химически индуцированном РМЖ, после химиотерапии, а также оперативного лечения РМЖ с последующей химиотерапии позволит оценить состояние местного иммунного ответа при данных способах лечения.

Цель исследования — изучение взаимосвязи разных функциональных групп цитокинов лимфы грудного лимфатического протока с морфологическими показателями структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов крыс при экспериментальном раке молочной железы, а также после оперативного лечения рака молочной железы и химиотерапии.

Методика

Работа выполнена на 80 половозрелых самках крыс Вистар. Возраст крыс на начало эксперимента 3 мес, масса 250–300 г. Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Минздрава № 577 от 12.08.77 г., с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС). Было сформировано четыре группы животных: 1-я — интактные животные, 2-я — РМЖ без лечения, 3-я — РМЖ+химиотерапия (ХТ), 4-я — резекция РМЖ + ХТ. В каждой группе было по 20 животных. РМЖ индуцировали 5-кратным введением N-метил-N-нитрозомочевины (МНМ; «Sigma») с интервалом в 7 сут (подкожно в область 2-й молочной железы справа) [1]. Через 6 мес с момента индукции РМЖ проводили курс ХТ в виде внутрибрюшинного введения 15 мг/кг 5-фторурацила и 2,5 мг/кг метотрексата («Еbewe») на 1-е и 8-е сут

и 3 мг/кг циклофосфана («Биохимия») внутрибрюшинно ежедневно однократно в течение 14 сут. Из эксперимента крыс выводили через 6.5 мес с момента индукции РМЖ под наркозом (40 мг/кг нембутала внутрибрюшинно; «Sigma»). На основании результатов гистологического и иммуногистохимического исследования через 6 мес верифицирован аналог люминального В-типа РМЖ человека [1]. Гистологическое исследование брыжеечных лимфатических узлов проводили по стандартной методике. При микроскопии определяли общую площадь среза лимфатических узлов, площадь лимфоидных узелков с герминативными и без герминативных центров, коркового плато и паракортикальной зон, мозговых тяжей и мозговых синусов, краевого синуса, капсулы и трабекул. Лимфу брали из цистерны грудного лимфатического протока, куда оттекает лимфа от крациальных брыжеечных лимфатических узлов. Концентрации цитокинов в лимфе оценивали методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе Bio-Plex Assay System (Bio-Rad) с использованием коммерческой тест-системы в соответствии с инструкцией фирмы-производителя Bio-Plex Pro Rat Cytokone 24-Plex Assay (Bio-Rad) [3].

Результаты исследования статистически обрабатывали в программе Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Данные представлены как среднее значение и среднеквадратическое отклонение ($M \pm s$); медиана (Me), нижний и верхний квартили (Q1; Q3). При статистической обработке значения цитокинов, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода (< 2 пкг/мл), принимали за 1 пкг/мл. Статистическую значимость различий рассчитывали по U критерию Манна—Уитни. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$. Сопряженность между исследуемыми параметрами (цитокинами и клетками структурных зон брыжеечных лимфатических узлов) оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена (r).

Результаты

Исследование взаимосвязи концентрации цитокинов лимфы с морфологическими изменениями брыжеечных лимфатических узлов при химически индуцированном РМЖ выявило ряд зависимостей, которые могут быть обусловлены местным иммунным ответом в лимфатических узлах направленным на противоопухолевую защиту [2]. Морфометрические параметры брыжеечных лимфатических узлов при экспериментальном РМЖ и различных вариантов терапии представлены в **табл. 1, 2**.

Как видно из табл. 1 площади герминативных центров лимфоидных узелков и мозговых тяжей увеличе-

ны. Выявлена корреляция (табл. 3) между количеством митотически делящихся клеток в герминативных центрах и мозговых тяжах с иммунорегуляторным цитокином IL-5, который стимулирует пролиферацию и дифференцировку активированных В-клеток [16]. Выявлена корреляция средних лимфоцитов в герминативных центрах и мозговых тяжах с хемокином MIP-1 α , иммунобластов герминативных центров с цитокином GRO/KC (табл. 3), увеличено количество макрофагов в В- и Т-зависимых зонах (табл. 2) при увеличении площади синусной системы и общей площади срезов лимфатических узлов (табл. 1).

В паракортикальной зоне выявлена корреляция макрофагов с хемокином MCP-1 и IL-6 с ретикулярными клетками (табл. 3). Оба цитокина продуцируются мезенхимными стволовыми клетками, способствуя миграции и метастазированию клеток РМЖ, что может служить одним из факторов роста и прогрессирования опухоли [6, 7, 14].

Об этом может свидетельствовать корреляция ретикулярных клеток с цитокином M-CSF, который оказывает влияние на фагоцитарную активность, что также может быть связано с ростом первичной опухоли и метастазами в лимфатические узлы. Уменьшение количества малых лимфоцитов и зрелых плазматических клеток в мозговых синусах и их прямая взаимосвязь с хемокином GRO/KC, определяющим хемотаксис иммунокомпетентных клеток, может быть обусловлена миграцией этих клеток из лимфатического узла.

После ХТ РМЖ выявлена положительная связь концентрации цитокина IFN γ с макрофагами и малыми лимфоцитами в герминативных центрах лимфоидных узелков (площадь герминативных центров уменьшена, пролиферативная активность клеток в ней снижена),

и митотически делящимися клетками в мозговых тяжах (площадь мозговых тяжей уменьшена). Эта зависимость может быть связана с действием IFN γ , который обладает иммуномодулирующим и противоопухолевым действием, усиливая цитотоксические реакции, опосредованные Т-лимфоцитами. О влиянии на иммунную систему может указывать корреляция иммунобластов с хемокином MIP-1 α в герминативных центрах и увеличение количества малых лимфоцитов на 28% в Т-зависимой зоне лимфатических узлов. Об этом также может свидетельствовать корреляция цитокина IL-17 с количеством зрелых плазматических клеток (количество увеличено на 34%) в мозговых тяжах. Основное действие IL-17 заключается в активации нейтрофилов и макрофагов в месте воспаления, а также в усилении активности большинства цитокинов, особенно провоспалительных [5]. К провоспалительным цитокинам относится и цитокин IL-12, имеющий положительную связь с нейтрофилами в мозговых тяжах и являющийся ключевым цитокином для усиления клеточно-опосредованного иммунного ответа. В мозговых синусах выявлена положительная связь зрелых плазматических клеток с цитокином IL-18, который непосредственно вовлечен в патогенез РМЖ, являясь одним из основных иммунорегуляторных цитокинов, принимающим участие в местном ответе организма на процессы опухолеобразования [13]. По биологическим эффектам IL-18 является функциональным дублером и синергистом IL-12 [15], способствуя преимущественной дифференцировке Т-хелперов 0 в Т-хелперы 1. Кроме того, IL-18 приводит к образованию GM-CSF и тем самым усиливает лейкопоэз.

После оперативного лечения РМЖ и последующей ХТ, по сравнению только с ХТ РМЖ, выявлены взаи-

Таблица 1

Изменение площади брыжеечных лимфатических узлов, лимфоидных узелков с герминативными центрами, мозговых тяжей, мозговых и краевого синусов, паракортикальной зоны при химически индуцированном РМЖ, химиотерапии (ХТ), операции РМЖ и ХТ (ОХТ), Me (LQ-HQ)

Параметр	Контроль (1)	РМЖ (2)	ХТ (3)	ОХТ (4)
Общая площадь БЛУ	215.5 (200-248)	284 (249-308) ¹	117 (111-134) ^{1,2}	212 (198-228) ^{2,3}
Площадь лимфоидных узелков с герминативными центрами	6 (4-7)	9 (9-11) ¹	2 (2-3) ^{1,2}	3 (2-3) ²
Площадь мозговых тяжей	71,5 (69-86)	95 (90-102) ¹	45 (43-50) ^{1,2}	71 (69-77) ^{2,3}
Площадь мозговых синусов	56 (54-60)	92 (80-93) ¹	38 (37-40) ^{1,2}	73 (69-78) ^{1,3}
Площадь краевого синуса	2 (2-2)	3 (3-4) ¹	1 (0-2) ²	1 (1-2) ²
Площадь паракортикальной зоны	65 (58-73)	62 (48-72)	24 (22-29) ^{1,2}	55 (51-58) ³

Примечание. Цифры 1, 2, 3 — статистически значимые отличия от величин соответствующих экспериментальных групп, $p < 0,05$.

Клеточный состав структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов крыс Вистар в контроле, при химически индуцированном РМЖ, химиотерапии (ХТ), операции и ХТ (ОХТ), Ме (LQ-HQ)

Клетки	Интактные животные (1)	РМЖ (2)	ХТ (3)	ОХТ (4)
Герминативные центры вторичных лимфоидных узелков				
ИМ	8,4 (7,2-9,0)	9,4 (9,4-9,8) ¹	3,2 (3,0-3,4) ^{1,2}	10,4 (10,4-12,0) ^{1,2,3}
СЛ	16,0 (15,6-16,6)	15,0 (14,0-15,2)	9,2 (8,8-9,2) ^{1,2}	14,6 (14,4-14,6) ^{1,3}
МЛ	40,4 (37,4-40,6)	26,4 (26,4-26,6) ¹	31,0 (31,4-32,8) ^{1,2}	35,6 (35,4-35,6) ^{1,2,3}
МФ	3,4 (3,0-3,6)	5,2 (4,8-5,4) ¹	1,6 (1,6-1,8) ^{1,2}	4,0 (4,0-4,4) ^{1,2,3}
РК	5,0 (4,8-6,0)	4,2 (4,2-4,6)	4,6 (4,2-4,8)	6,6 (6,6-7,0) ^{1,2,3}
Митозы	1,6 (1,4-1,6)	2,6 (2,2-2,6) ¹	0,0 (0,0-0,4) ^{1,2}	3,4 (2,8-3,4) ^{1,2,3}
Паракортикальная зона				
ИМ	1,2 (0,8-1,2)	0,6 (0,4-0,6) ¹	0,2 (0,2-0,4)	0,2 (0,0-0,2)
СЛ	4,6 (4,6-5,2)	4,0 (4,0-4,4) ¹	3,8 (3,8-4,8)	6,2 (6,0-6,4) ^{1,2,3}
МЛ	77,6 (75,6-82,0)	64,8 (63,6-67,8) ¹	83,0 (82,2-83,0) ^{1,2}	56,2 (56,0-58,6) ^{1,2,3}
МФ	2,8 (2,8-3,0)	4,8 (4,8-5,8) ¹	1,0 (1,0-1,2) ^{1,2}	1,8 (1,6-2,0) ^{1,2,3}
РК	3,6 (3,4-4,0)	4,4 (4,0-4,6)	3,8 (3,4-3,8) ²	7,2 (7,2-8,6) ^{1,2,3}
ТК	0,2 (0-0,2)	0,2 (0-0,2)	0,2 (0,2-0,4)	0,2 (0,2-0,2)
Мозговые тужи				
СЛ	5,2 (5,0-7,2)	7,0 (6,8-7,8)	8,8 (6,0-8,8)	7,0 (6,8-7,2)
МЛ	17,4 (17,4-17,8)	11,8 (11,4-12,2) ¹	14,8 (14,6-15,2) ^{1,2}	12,6 (12,6-12,8) ^{1,2,3}
ИМ	1,4 (1,4-1,6)	1,2 (1,2-1,6)	1,4 (1,2-1,4)	1,6 (1,4-2,2)
НПл	4,8 (4,8-5,2)	5,0 (5,0-7,0)	12,4 (11,2-13,8) ^{1,2}	10,8 (10,6-10,8) ^{1,2,3}
ЗПл	21,4 (20,6-24,0)	16,0 (15,2-17,6) ¹	21,4 (20,6-21,6) ²	19,0 (18,8-19,0) ^{1,2}
МФ	2,8 (2,4-2,8)	6,0 (6,0-6,2) ¹	3,8 (3,6-4,0) ^{1,2}	3,6 (3,6-3,6) ^{1,2}
РК	3,2 (2,8-3,4)	6,0 (5,8-6,2) ¹	7,4 (7,2-8,0) ^{1,2}	6,6 (6,6-6,8) ^{1,2,3}
Митозы	0,2 (0,2-0,4)	0,6 (0,4-0,8)	0,2 (0,2-0,4)	0,2 (0,2-0,6)
НФ	0,2 (0,2-0,2)	0,2 (0,2-0,2)	0,2 (0,2-0,2)	0,6 (0,6-0,6)
Мозговые синусы				
СЛ	4,0 (3,8-4,6)	3,4 (3,0-4,0)	3,0 (3,0-3,8)	10,0 (10,0-10,4) ^{1,2,3}
МЛ	18,0 (16,8-18,8)	11,4 (10,4-11,8) ¹	10,2 (9,8-10,2) ^{1,2}	16,0 (15,8-16,2) ^{2,3}
ИМ	0,8 (0,8-0,8)	1,0 (1,0-1,2) ¹	0,4 (0,2-0,4) ^{1,2}	0,2 (0,2-0,4) ^{1,2}
НПл	4,8 (4,4-5,0)	3,6 (3,0-3,8) ¹	4,2 (3,8-4,4)	6,6 (6,6-6,8) ^{1,2,3}
ЗПл	14,2 (13,0-14,4)	9,2 (9,2-9,6) ¹	14,0 (13,0-14,4) ²	21,8 (21,2-22,0) ^{1,2,3}
МФ	2,2 (2,0-2,4)	4,4 (4,4-5,4) ¹	2,4 (2,4-2,6) ²	4,0 (3,6-4,6) ^{1,3}
РК	5,8 (4,8-6,0)	6,6 (6,0-6,6)	6,2 (5,2-6,2)	6,6 (6,4-6,8) ¹
ТК	0,2 (0,2-0,2)	0,2 (0,0-0,2)	0,0 (0,0-0,4)	0,2 (0,2-0,2)
НФ	0,0 (0,0-0,4)	0,2 (0,0-0,2)	0,2 (0,2-0,4)	0,4 (0,4-0,6) ²

Примечание. ИМ — иммунобласты, СЛ — средние лимфоциты, МЛ — малые лимфоциты, НПл — незрелые плазмциты, ЗПл — зрелые плазмциты, РК — ретикулярные клетки, МФ — макрофаги, ТК — тучные клетки, НФ — нейтрофилы. 1, 2, 3 — обозначено статистически значимое отличие от величин соответствующих экспериментальных групп. $p < 0,05$.

Таблица 3

Положительные связи клеток структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов с цитокинами в лимфе крыс Вистар при химически индуцированном РМЖ, после химиотерапии РМЖ (ХТ) и после операции и химиотерапии (ОХТ) (r)

Группы	Клетки	Цитокины											
		IL-1a	IL-5	IL-6	IL-7	IL-12	IL-17	IL-18	GRO/KC	IFN γ	M-CSF	MIP-1a	MCP-1
Герминативные центры вторичных лимфоидных узелков													
РМЖ	ИМ	-	-	-	-	-	-	-	0.949	-	-	-	-
	СЛ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	-
	РК	-	-	-	-	0.949	-	-	-	-	-	-	-
	Мит	-	0.975	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ХТ	ИМ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.975	-
	МЛ	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	-	-	-
	МФ	-	-	-	-	-	-	-	-	0.975	-	-	-
ОХТ	ИМ	-	-	-	-	-	-	-	0.979	-	-	-	-
	Мит	-	-	0.889	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Паракортикальная зона													
РМЖ	МФ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.949
	ТК	-	0.949	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	РК	-	-	0.90	-	-	-	-	-	-	0.90	-	-
ОХТ	ИМ	-	-	0.892	-	-	-	-	0.949	-	-	-	-
	СЛ	-	-	-	0.90	-	-	0.90	-	-	-	-	-
	МЛ	0.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	МФ	-	-	-	-	-	0.975	-	-	-	-	-	-
	ТК	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.894	-	-
Мозговые тяжи													
РМЖ	СЛ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	-
	Мит	-	0.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ХТ	ИМ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.975	-	-
	ЗПл	-	-	-	-	-	0.975	-	-	-	-	-	-
	Мит	-	-	-	-	-	-	-	-	0.975	-	-	-
	НФ	-	-	-	-	0.895	-	-	-	-	-	-	-
ОХТ	ИМ	-	0.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	СЛ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	-	-
	Мит	-	-	0.973	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	РК	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.975
Мозговые синусы													
РМЖ	МЛ	-	-	-	-	-	-	-	0.90	-	-	-	-
	ИМ	-	-	-	-	-	-	-	-	0.894	-	-	-
	ЗПл	-	-	-	-	-	-	-	0.975	-	-	-	-
ХТ	ЗПл	-	-	-	-	-	-	0.90	-	-	-	-	-
	МФ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ОХТ	ИМ	-	-	-	0.894	-	-	0.894	-	-	-	-	-
	ЗПл	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	0.90	-
	МФ	-	-	-	-	0.90	-	-	-	-	-	-	-
	РК	-	-	-	-	0.90	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Приведен коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Сокращения: ИМ – иммунобласты, СЛ – средние лимфоциты, МЛ – малые лимфоциты, ЗПл – зрелые плазмциты, Мит – митозы, РК – ретикулярные клетки, МФ – макрофаги, ТК – тучные клетки. $p < 0,05$.

мозависимости концентрации цитокинов в лимфе грудного протока с морфологическими изменениями в брыжеечных лимфатических узлах, которые могут указывать на повышение активности местного звена иммунного ответа. Об этом могут свидетельствовать выявленные положительные связи иммунобластов в герминативных центрах лимфоидных узелков с цитокином GRO/КС, цитокина IL-6 – с количеством митотически делящихся клеток в герминативных центрах и мозговых телях, IL-5 – с иммунобластами в мозговых телях, хемокина MIP-1a – с количеством зрелых плазматических клеток в мозговых синусах.

Обсуждение

Выявленные коррелятивные взаимосвязи могут указывать на усиление пролиферативной активности В-клеток, регуляции процессов созревания антителопродуцирующих клеток и продукции иммуноглобулинов [12, 17]. Эти зависимости выявлены на фоне повышения пролиферативной активности клеток в герминативных центрах, увеличения площади мозговых телях, увеличения количества малых лимфоцитов, а также незрелых и зрелых плазматических клеток в мозговых синусах (табл. 1, 2). После оперативного лечения РМЖ и ХТ нами также были выявлены признаки повышения активности Т-звена иммунного ответа. Отмечаемая в паракортикальной зоне положительная связь малых лимфоцитов с цитокином IL-1 α может быть вызвана преимущественной активацией данным цитокином Т-лимфоцитов. Взаимосвязи цитокина IL-6 с иммунобластами, а IL-7 и IL-18 – со средними лимфоцитами в паракортикальной зоне и иммунобластами в мозговых синусах, могут быть обусловлены стимуляцией пролиферации незрелых и дифференцированных активированных Т-клеток. По данным литературы цитокин IL-6 демонстрирует более сильную синергию с IL-7, чтобы стимулировать наивные CD8 (+) Т-клетки [9]. Отмечаемая положительная связь средних лимфоцитов (количество которых в паракортикальной зоне увеличено) с цитокином IL-18, а также увеличение самой площади паракортикальной зоны может свидетельствовать о повышении активности Т-звена иммунного ответа. При этом в паракортикальной зоне выявлены связи GRO/КС – с иммунобластами, M-CSF – с тучными клетками, а также отмечаются признаки макрофагальной реакции: возросло количество макрофагов, выявлена положительная связь IL-17 с макрофагами. Об активации макрофагальной реакции и влиянии на иммунные клеточные реакции может свидетельствовать положительная взаимосвязь IL-12 с макрофагами [10] в мозговых сину-

сах, а также увеличение количества макрофагов в герминативных центрах и мозговых синусах.

Заключение

После оперативного лечения РМЖ и последующей ХТ, по сравнению только с ХТ РМЖ, выявлены взаимосвязи концентрации цитокинов в лимфе грудного протока с морфологическими изменениями в брыжеечных лимфатических узлах, которые могут указывать на повышение активности местного звена иммунного ответа.

Литература

1. Кабаков А.В., Лыков А.П., Морозов Д.В., Казаков О.В., Повешенко А.Ф., Райтер Т.В., Стрункин Д.Н., Коненков В.И. Фенотипическая характеристика химически индуцированной опухоли молочной железы. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2017; 163(4): 490-3.
2. Казаков О.В., Райтер Т.В., Повешенко А.Ф., Орлов Н.Б., Повешенко О.В., Кабаков А.В. и др. Корреляционный анализ морфологических изменений структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов с цитокинами лимфы грудного лимфатического протока при экспериментальном раке молочной железы. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2019; 168(10): 501-5.
3. Повешенко А.Ф., Казаков О.В., Орлов Н.Б., Повешенко О.В., Ким И.И., Бондаренко Н.А., и др. Цитокины лимфы как маркеры онкогенеза и эффективности терапии при экспериментальной опухоли молочной железы крыс Wistar. *Пат. физиол. и exper. тер.* 2016; 60(3): 68-75.
4. Соснина А.В., Великая Н.В., Аутеншлюс А.И. *Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований.* Новосибирск: Вектор-Бест, 2013.
5. Шипилов М.В., Иванов В.В. Th17-ответ организма при острых респираторных вирусных инфекциях различного генеза. *Цитокины и воспаление.* 2012; 11(1): 109-13.
6. De Luca A., Gallo M., Aldinucci D., Ribatti D., Lamura L., D'Alessio A., et al. Role of the EGFR ligand/receptor system in the secretion of angiogenic factors in mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol* 2011; 226(8): 2131-38.
7. De Luca A, Lamura L, Gallo M, Maffia V., Normanno N. Mesenchymal stem cell-derived interleukin-6 and vascular endothelial growth factor promote breast cancer cell migration. *J Cell Biochem.* 2012; 113(11): 3363-70.
8. Dhesy-Third S., Fletcher G.G., Blanchette P.S., Clemons M.J., Dillmon M.S., Frank E.S., et al. Use of Adjuvant Bisphosphonates and Other Bone-Modifying Agents in Breast Cancer: A Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clinical Oncology.* 2017; 35(18): 2062-81.
9. Gagnon J., Ramanathan S., Leblanc C., Cloutier A., McDonald P.P., Ilangumaran S. IL-6, in synergy with IL-7 or IL-15, stimulates TCR-independent proliferation and functional differentiation of CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2008; 180(12): 7958-68.
10. Grohmann U., Belladonna M.L., Vacca C., Bianchi R., Fallarino F., Orabona C., et al. Positive Regulatory Role of IL-12 in Macrophages and Modulation by IFN- γ . *J Immunol.* 2001; 167(1): 221-7.
11. Harrel M.I., Iritani B.M., Ruddell A. Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *Am. J. Pathol.* 2007; 170(2): 774-86.

12. Kita M., Ohmoto Y., Hirai Y., Yamaguchi N., Imanishi J. Induction of cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by mycoplasmas. *Microbiol. Immunol.* 1992; 36: 507–16.
13. Merendino R.A., Gangemi S, Ruello A, Bene A, Losi E, Lonbardo G, Purello-Dambrosio G. Serum levels of interleukin-18 and sICAM-1 in patients affected by breast cancer: preliminary considerations. *Int J Biol Markers.* 2001; 16(2): 126–9.
14. Molloy A. P., Martin F. T., Dwyer R. M., Griffin T. P., Murphy M., Barry F. P., et al. Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their potential role in mediating interactions with breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2009; 124(2): 326–32.
15. Sugama S., Conti B. Interleukin-18 and stress. *Brain research reviews.* 2008; 58(1): 85–95.
16. Takatsu K. Interleukin 5 and B cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9: 25–35.
17. Yokota T., Arai N., J. De Vries, Spits H., Banchemreau J., Zlotnik A., et al. Molecular biology of interleukin 4 and interleukin 5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells, and hemopoietic cells. *Immunol Rev.* 1988; 102: 137–87.
6. De Luca A., Gallo M., Aldinucci D., Ribatti D., Lamura L., D'Alesio A., et al. Role of the EGFR ligand/receptor system in the secretion of angiogenic factors in mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol* 2011; 226(8): 2131–38.
7. De Luca A, Lamura L, Gallo M, Maffia V, Normanno N. Mesenchymal stem cell-derived interleukin-6 and vascular endothelial growth factor promote breast cancer cell migration. *J Cell Biochem.* 2012; 113(11): 3363–70.
8. Dhesy-Thind S., Fletcher G.G., Blanchette P.S., Clemons M.J., Dillmon M.S., Frank E.S., et al. Use of Adjuvant Bisphosphonates and Other Bone-Modifying Agents in Breast Cancer: A Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clinical Oncology.* 2017; 35(18): 2062–81.
9. Gagnon J., Ramanathan S., Leblanc C., Cloutier A., McDonald P.P., Ilangumaran S. IL-6, in synergy with IL-7 or IL-15, stimulates TCR-independent proliferation and functional differentiation of CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2008; 180(12): 7958–68.
10. Grohmann U., Belladonna M.L., Vacca C., Bianchi R., Fallarino F., Orabona C., et al. Positive Regulatory Role of IL-12 in Macrophages and Modulation by IFN- γ . *J Immunol.* 2001; 167(1): 221–7.
11. Harrel M.I., Iritani B.M., Ruddell A. Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *Am. J. Pathol.* 2007; 170(2): 774–86.

References

1. Kabakov A.V., Lykov A.P., Morozov D.V., Kazakov O.V., Poveshchenko A.F., Rajter T.V., Strunkin D.N., Kononkov V.I. Phenotypic characteristic of a chemically induced breast tumor. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2017; 163(4): 490–93. (In Russian)
2. Kazakov O.V., Rajter T.V., Poveshchenko A.F., Orlov N.B., Poveshchenko O.V., Kabakov A.V., et al. Correlation analysis of morphological changes of structural and functional zones of mesenteric lymph nodes with cytokines of the lymph of the thoracic lymphatic duct in experimental breast cancer. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2019; 168(10): 501–5. (In Russian)
3. Poveshchenko A.F., Kazakov O.V., Orlov N.B., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Bondarenko N.A., et al. Cytokines of lymph as markers of cancer progression and effectiveness of therapy in experimental breast tumors of rats Wistar. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2016; 60(3): 68–75. (in Russian).
4. Sosnina A.V., Velikaya N.V., Autenshlyus A.I. *The role of cytokines in the pathogenesis of malignant neoplasms. [Rol' tsitokinov v patogeneze zlokachestvennykh novoobrazovaniy].* Novosibirsk: Vektor-Best, 2013. (in Russian)
5. Shipilov M.V., Ivanov V.V. Th17 response of an organism in acute respiratory viral infections of various origins. *Tsitokiny i vospalenie.* 2012; 11(1): 109–13. (in Russian).
12. Kita M., Ohmoto Y., Hirai Y., Yamaguchi N., Imanishi J. Induction of cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by mycoplasmas. *Microbiol. Immunol.* 1992; 36: 507–16.
13. Merendino R.A., Gangemi S, Ruello A, Bene A, Losi E, Lonbardo G, Purello-Dambrosio G. Serum levels of interleukin-18 and sICAM-1 in patients affected by breast cancer: preliminary considerations. *Int J Biol Markers.* 2001; 16(2): 126–9.
14. Molloy A. P., Martin F. T., Dwyer R. M., Griffin T. P., Murphy M., Barry F. P., et al. Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their potential role in mediating interactions with breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2009; 124(2): 326–32.
15. Sugama S., Conti B. Interleukin-18 and stress. *Brain research reviews.* 2008; 58(1): 85–95.
16. Takatsu K. Interleukin 5 and B cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9: 25–35.
17. Yokota T., Arai N., J. De Vries, Spits H., Banchemreau J., Zlotnik A., et al. Molecular biology of interleukin 4 and interleukin 5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells, and hemopoietic cells. *Immunol Rev.* 1988; 102: 137–87.

Сведения об авторах:

КазакOV Олег Васильевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: kazakoff_oleg@mail.ru;

Повещенко Александр Федорович, доктор мед. наук, руководитель лаб. физиологии протективной системы «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru;

Орлов Николай Борисович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической иммуногенетики, «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: nbo@ngs.ru;

Райтер Татьяна Владимировна, мл. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: reitert@mail.ru;

Повещенко Ольга Владимировна, доктор мед. наук, руководитель лаб. клеточных технологий «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: PoveschenkoOV@yandex.ru

Кабакوف Алексей Васильевич, мл. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: kabakov_av85@mail.ru

Стрункин Дмитрий Николаевич, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: Strunkind@mail.ru;

Лыков Александр Петрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточных технологий «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: aplykov2@mail.ru;

Коненков Владимир Иосифович, доктор мед. наук, акад. РАН, науч. руководитель филиала «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: vikonenkov@gmail.com

© Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., 2020

УДК 616-092

Маклакова И.Ю.^{1,2}, Гребнев Д.Ю.^{1,2}

Коррекция морфофункционального состояния печени при остром гепатите с помощью стволовых клеток

¹ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3;

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

Цель работы – изучение влияния сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию печени в физиологических условиях и в условиях токсического гепатита. **Методика.** Эксперименты выполнены на 84 белых лабораторных мышах-самцах, возраст 7-8 мес. Токсический гепатит вызывали внутрибрюшинным введением четыреххлористого углерода (CCl₄ в дозе 50 мкг/кг. Животным опытной группы в хвостовую вену вводили мультипотентные мезенхимальные стромальные (ММСК, 4 млн клеток/кг) и гемопоэтические стволовые клетки (ГСК, 330 тыс. клеток/кг). Для инъекции полученные клетки суспендировали в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Животным контрольной группы внутривенно вводили 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Внутривенные введения осуществляли через 1 ч после введения четыреххлористого углерода однократно. Для трансплантации использовали ММСК третьего пассажа, а ГСК не подвергались культивированию. Изучали влияние сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на биохимические показатели периферической крови и морфометрические показатели печени в физиологических условиях и после введения CCl₄ на 1-е, 3-и, 7-е сут. **Результаты.** Показано, что проведение сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток при токсическом гепатите приводило к снижению активности ферментов цитолиза, активации белоксинтезирующей функции печени. Также отмечалось увеличение количества гепатоцитов, повышение митотической активности, что указывает на активацию внутриклеточной регенерации. Обнаруженное увеличение числа двуядерных гепатоцитов, размеров ядра, ядерно-цитоплазматического соотношения говорит об усилении процесса внутриклеточной регенерации в печени.

Ключевые слова: токсический гепатит; регенерация печени; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; гемопоэтические стволовые клетки.

Для цитирования: Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю. Коррекция морфофункционального состояния печени при остром гепатите с помощью стволовых клеток. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 46-53. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.46-53

Для корреспонденции: Маклакова Ирина Юрьевна, e-mail: makliu@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста – Маклакова И.Ю.; концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование – Гребнев Д.Ю.

Поступила 17.12.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Maklakova I.Yu.^{1,2}, Grebnev D.Yu.^{1,2}

Correction of the the liver morpo-functional state with stem cells in acute hepatitis

¹Ural State Medical University, Repina Str. 3, Ekaterinburg 620028, Russia;

²Institute of Medical Cell Technologies, Karla Marksa St. 22 A, Ekaterinburg 620026, Russia

The **aim** of the work was studying the effect of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and hematopoietic stem cells on regeneration of the liver under the physiological conditions and in toxic hepatitis. **Methods.** Experiments were performed on 84 white laboratory male mice aged 7-8 months. Toxic hepatitis was induced by administration of carbon tetrachloride (CCl₄) at a dose of 50 µg/kg, i.p. Mice were divided into experimental and control groups. The experimental group received caudal vein injections of multipotent mesenchymal stromal (MMSC) and hematopoietic stem cells (HSC) derived from the placenta chorion of female mice at respective doses of 4M cells/kg and 330K cells/kg suspended in 0.2 ml of 0.9% NaCl. Control animals

were given 0.2 ml of 0.9 % NaCl, i.v. Intravenous injections were performed once 1 hour following the administration of carbon tetrachloride. MMSCs of the third passage were used for transplantation, while transplanted HSCs were not cultured. Effects of the combined MMSC and HSC transplantation on blood biochemistry and liver morphometry were studied under the physiological conditions and at 1, 3, and 7 days after administration of CCl₄. **Results.** In toxic hepatitis, the combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and hematopoietic stem cells resulted in decreased activity of cytolytic enzymes, activation of hepatic protein synthesis, increased number of hepatocytes, and increased mitotic activity indicative of activation of intracellular regeneration. Increases in the number of binuclear hepatocytes, nucleus size, and the nuclear-cytoplasmic ratio suggested an enhancement of intracellular regeneration in the liver.

Keywords: toxic hepatitis; liver regeneration; multipotent mesenchymal stromal cells; hematopoietic stem cells.

For citation: Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu. Correction of the the liver morpho-functional state with stem cells in acute hepatitis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 46-53. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.46-53

For correspondence: *Maklakova Irina Yurevna*, associate Professor of pathological physiology of the USMU is conducted by the Ministry of health of Russia, senior researcher «Institute of medical cell technologies», laboratory of anti-aging technology, e-mail: makliu@mail.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Contribution: the concept and design of the study, collection and processing of material, writing a text — Maklakova I.Yu. ; the concept and design of the study, writing a text, editing — Grebnev D.Yu.

Information about the authors:

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

Received 17.12.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Введение

Печень представляет собой важнейший орган, обеспечивающий постоянство внутренней среды организма. Воздействие гепатотропных ядов вызывает разрушение гепатоцитов с последующим развитием печеночной недостаточности. Ежегодно от печеночной недостаточности на Земле погибает около 2 млн человек. Летальность при печеночной недостаточности достигает 80 %, а в случае развития печеночной комы — 80–90% [1]. Это свидетельствует о том, что существующие на сегодняшний день терапевтические подходы к лечению печеночной недостаточности не эффективны, что диктует необходимость поиска новых методов лечения токсического гепатита. Обращает на себя внимание рост в последние годы количества публикаций, связанных с использованием биомедицинских клеточных продуктов. Так, в ряде работ показана эффективность использования мультипатентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) с целью восстановления биохимических параметров периферической крови при токсическом гепатите [2, 3]. Появились работы об участии ММСК и ГСК в активации репаративных процессов в органах при различных видах повреждения (токсическом, облучении, травме) [4–6]. Учитывая биологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических ство-

ловых клеток, представляется перспективным использование сочетанной трансплантации этих видов клеток для активации регенерации печени при токсическом повреждении [7, 8]. В последние годы в зарубежной и отечественной литературе увеличивается количество публикаций, свидетельствующих о вовлеченности в репаративную регенерацию печени ГСК и ММСК при ее токсическом повреждении [9, 10]. Известно, что ММСК обладают способностью к миграции в ткани, подвергшиеся наибольшему повреждению, выработки противовоспалительных цитокинов (TGF-β, ИЛ-10) и факторов роста (SCF-stem cell factor, HGF-hepatocyte grow factor) [2, 9]. Также ММСК синтезируют хемоаттрактант для ГСК (SDF-1- stromal cell-derived factor-1), который приводит к усилению хоуминга аллогенных и аутологичных ГСК в поврежденную печень [11–13]. ММСК и ГСК способны активировать регенерацию гепатоцитов, сливаясь с гепатоцитами — fusion-effect [14–16]. Источниками ГСК являются костный мозг, периферическая кровь, фетальные ткани. Установлено, что ткань зрелой плаценты содержит большее количество ГСК по сравнению с костным мозгом [17]. Также доказано, что плацентарные стволовые клетки обладают большим пролиферативным потенциалом, способностью к дифферен-

цировке, синтезу биологически активных веществ, обладают более выраженной иммуномодулирующей активностью [9, 17]. Кроме того, большим преимуществом является возможность получения клеток плаценты неоперативным путем.

Цель исследования — изучение процесса регенерации печени в условиях токсического гепатита на фоне сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток.

Методика

Эксперименты выполнены на 84 белых лабораторных беспородных мышах-самцах из питомника «White giver» г. Уфа. Возраст животных 7-8 мес, масса 25-27 г. Все эксперименты, уход и содержание осуществлялись в соответствии с Директивой № 63 от 22 сентября 2010 г. Президиума и Парламента Европы «О защите животных, используемых для научных исследований» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Протокол исследований одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» протокол № 8 от 20.10.2017. Токсический гепатит воспроизводили внутрибрюшинным введением четыреххлористого углерода (CCl₄) (50 мг/кг). Животным экспериментальной группы внутривенно вводили суспендированные в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl ММСК и ГСК соответственно в дозе 4 млн клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг. Животным контрольной группы в хвостовую вену вводили 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Инъекции осуществляли через 1 ч после введения CCl₄. Исследовали влияние сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на биохимические показатели периферической крови и морфометрические параметры печени в физиологических условиях и после введения CCl₄ на 1-е, 3-е, 7-е сут. Из опыта животных выводили декапитацией под легким эфирным наркозом.

Культуры ММСК и ГСК получали из хориона плаценты 5-ти мышей-самок (возраст 3–4 мес, срок гестации 18 сут). В исследовании использовано 32 плаценты. Мононуклеарную фракцию клеток получали последовательной механической и ферментативной (раствор аккутазы (Millipore, США)) обработкой ткани плаценты. Выделение ГСК осуществляли методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 (StemCell Technologies, США) и CD 117 (StemCell Technologies, США) (X. Munira и соавт., 2009). Трансплантированные ГСК не подвергались культивированию.

Культивирование ММСК проводили в условиях CO₂ – инкубатора (Termo Scientific, США) при температуре

37 °С с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Состав среды культивирования: MesenCult MSC Basal Medium Mouse («StemCell Technologies», Канада) и MesenCult™ Proliferation Supplements Mouse («StemCell Technologies», Канада) в соотношении 4:1. Также в состав данной среды входило 2 ммоль раствора L-глутамина («StemCell Technologies», Канада) и антибиотика – пенициллин (50 ед/мл) и стрептомицин (50 мкг/мл) «StemCell Technologies», Канада. При формировании монослоя осуществляли пересев клеток. Для этого после удаления специализированной среды для культивирования к клеткам добавляли раствор аккутазы (StemCell Technologies, США), позволяющий разрушать межклеточные контакты и отделять клетки от дна чашки Петри, не нарушая при этом целостность мембраны клетки. Для нейтрализации фермента добавляли эквивалентный объем среды DMEM («StemCell Technologies», Канада), содержащей 10 % по объему фетальной бычьей сыворотки (FBS, fetal bovine serum) («StemCell Technologies», Канада). В дальнейшем, клетки были суспендированы в специализированной среде для культивирования ММСК и подсчитаны в камере Горяева. Минимальное количество клеток, снимаемых после нулевого пассажа – 1,0 x 10⁴ клеток/см². Для трансплантации лабораторным животным были использованы ММСК третьего пассажа. Иммунофенотип ММСК характеризуется: CD105+, Sca1+, CD29+, CD45- [2]. Иммунофенотипирование суспензии ММСК проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами (Becton Dickinson, США). В фракции трансплантируемых клеток оценивали содержание ММСК с иммунофенотипом положительных по CD105, CD29, Sca-1 и отрицательных по CD45 на проточном цитометре Beckman Coulter Navios с помощью набора Mouse Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit (Bio-Techne, США). Количество жизнеспособных клеток с фенотипом CD45-CD105+Sca1+CD29+ составляло 93,5 % (рис. 1).

Иммунофенотип ГСК мыши характеризуется: Sca1+, CD38+, CD117+, Lin-, CD34-. Идентификацию ГСК проводили на проточном цитометре Beckman Coulter Navios. В суспензии трансплантируемых клеток оценивали содержание ГСК с иммунофенотипом положительных по CD117, Sca-1 и отрицательных по Lin- (CD45, C3e, Ly-6G, M1/70, Ter-119). Содержание жизнеспособных клеток после иммуномагнитной сепарации с иммунофенотипом CD117+, Sca-1+, Lin- составляло 90-96% (рис. 2).

Гистологические срезы печени 3-5 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином. Для морфометриче-

ского анализа данных использовали компьютерную программу анализа изображений (Biovision, Россия). С этой целью производили микрофотосъемку случайных полей зрения гистологических препаратов циф-

ровой камерой OLYMPUS XC30 на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (OLYMPUS, Япония) при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 600$, $\times 1000$ (не менее 10 полей зрения в каждом гистологическом срезе).

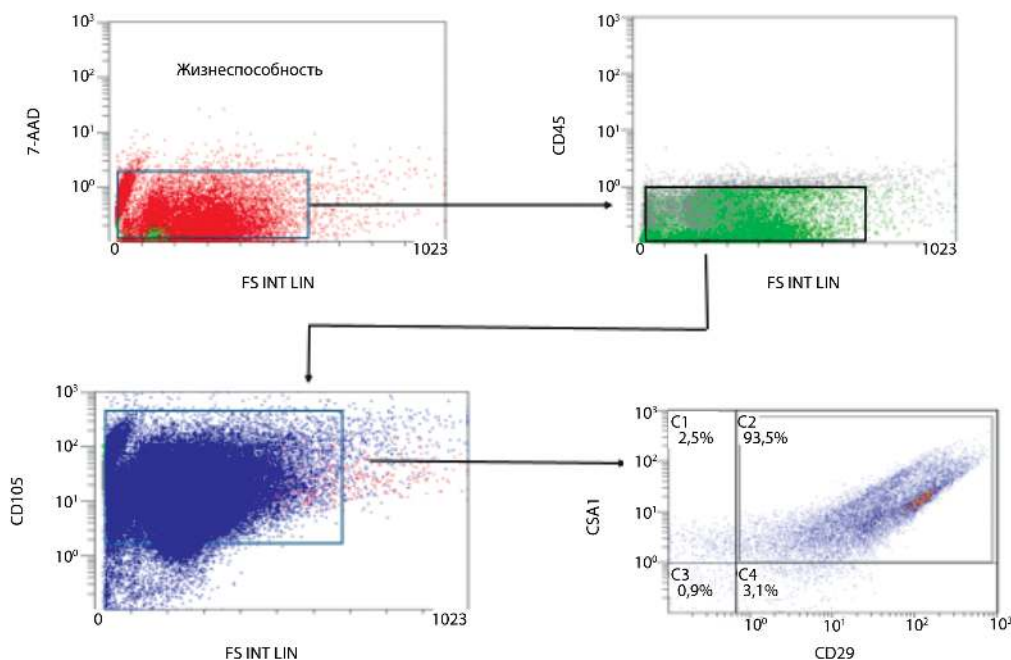


Рис. 1. Идентификация ММСК методом проточной цитофлуориметрии.

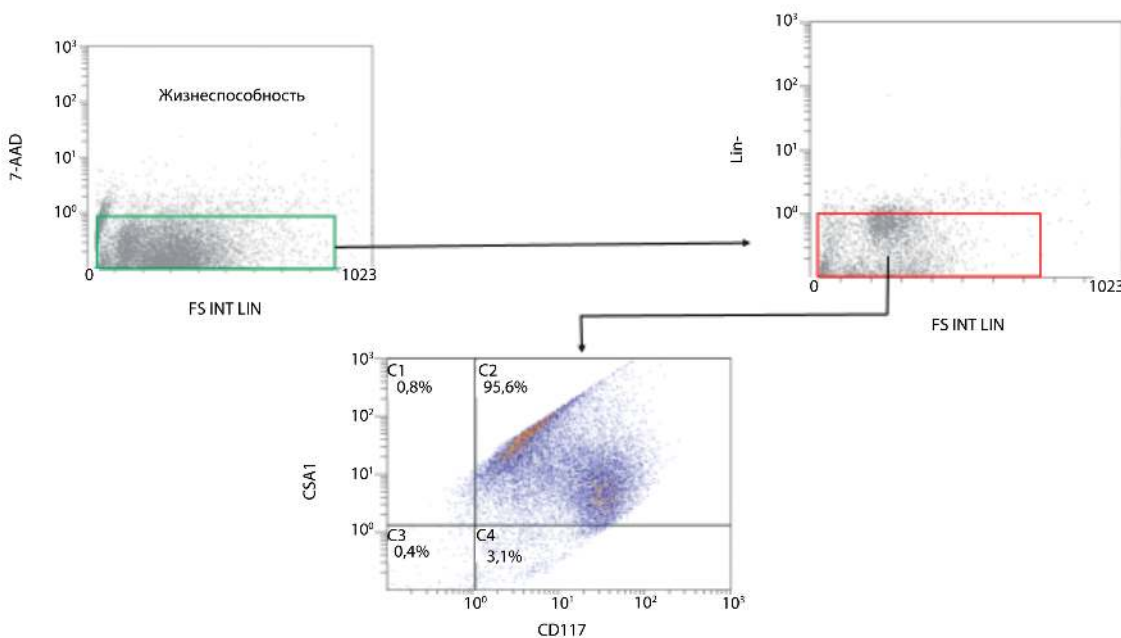


Рис. 2. Идентификация ГСК методом проточной цитофлуориметрии.

Производили оценку следующих морфометрических показателей: количество гепатоцитов на 1 мм², площадь гепатоцитов, среднюю площадь ядра гепатоцита, площадь цитоплазмы гепатоцита, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм², митотический индекс (МИ), апоптотический индекс (АИ). Ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ) определяли, как отношение площади ядра и цитоплазмы клетки. Митотический, апоптотический индексы выражали в промилле (‰). Митотический индекс определяли, как отношение числа клеток в состоянии митоза к общему числу подсчитанных гепатоцитов. Верификация выраженности апоптоза осуществлялась с использованием метода AporTag® Peroxidase In Situ Oligo Ligation (ISOL) (Millipore, США). Апоптотический индекс определялся как отношение числа клеток в состоянии апоптоза к общему числу подсчитанных гепатоцитов.

Оценку биохимических показателей периферической крови производили на автоматическом биохимическом анализаторе Chem Well 2910 (Combi). Изучали следующие биохимические показатели: уровень обще-

го белка, альбумина, мочевины, глюкозы, общего билирубина, активность аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ). При определении биохимических показателей использовали наборы компании «Ольвекс Диагностикум», Россия. Определение концентрации фибриногена проводили на анализаторе показателей гемостаза АПГ2-02-П с помощью набора Тех-Фибриноген тест (Технология Стандарт, Россия).

Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17,0). Значимость различий в сравниваемых выборках рассчитывали с применением непараметрического (рангового) метода Манна-Уитни.

Результаты

Сочетанная трансплантация ММСК и ГСК лабораторным животным без токсического гепатита (физиологические условия) не сопровождалось статистически значимыми изменениями биохимических показателей периферической крови и морфометрических параметров печени.

Таблица 1

Биохимические показатели крови при ССІ₄ –гепатите на фоне сочетанного введения мультипатентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток

Показатели	Значение						
	Интактные мыши	1-е сут		3-и сут		7-е сут	
		NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Общий белок, г/л	69,37±3,20	60,15±5,68	66,79±4,53	48,96±3,39*	52,78±5,05*	51,18±4,58*	64,80±5,0°
Альбумин, г/л	30,03±2,83	25,71±2,19	26,73±2,86	20,51±1,59*	23,43±2,21*	22,74±1,86*	28,04±2,20°
Мочевина, ммоль/л	5,76±1,28	5,11±0,34	5,26±0,54	5,33±0,48	5,66±0,45	6,41±0,49	6,05±0,58
Глюкоза, ммоль/л	6,10±0,57	4,28±0,40*	4,53±0,40*	4,25±0,36 *	5,30±0,43* °	5,90±0,50	6,31±0,56
Общий билирубин, мкмоль/л	9,76±1,15	15,14±1,09*	14,56±0,71*	11,85±0,90 *	11,31±0,83*	11,89±0,67 *	11,39±0,76*
АСТ, Ед/л	98,53±8,42	215,37±11,66*	171,39±13,16*°	170,55±11,13 *	132,91±12,21* °	138,45±9,29 *	102,26±9,51°
АЛТ, Ед/л	82,80±5,11	210,13±12,34*	159,08±12,98* °	166,46±10,36 *	124,99±11,16* °	154,50±9,85 *	116,30±10,95* °
Щел. Фосфатаза, Ед/л	67,37±4,03	122,89±9,21*	95,64±7,51* °	106,73±9,58 *	84,88±7,13* °	91,20±7,98 *	68,06±6,21°
Фибриноген, г/л	3,20±0,23	2,87±0,20	2,93±0,23	2,34±0,18 *	2,59±0,24*	2,37±0,20 *	2,93±0,19°

Примечание. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$ —с показателями интактной группы; ° $p < 0,05$ с показателями контрольной группы.

При изучении биохимических показателей крови на 1-е сут после введения CCl_4 на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК обнаружено снижение активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы. На 3-и сут отмечено снижение активности ферментов цитолиза гепатоцитов: АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы, а также повышение уровня глюкозы по сравнению с данными контроля. При анализе биохимических показателей на 7-е сут после введения CCl_4 на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК отмечено снижение активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы. Также на фоне введения ММСК обнаружено повышение уровня фибриногена, общего белка, альбуминов, что говорит о восстановлении белоксинтетической функции печени (табл. 1).

На 1-е сут после введения CCl_4 на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК обнаружено увеличение количества двуядерных гепатоцитов и повышение митотического индекса по сравнению с данными контрольной подгруппы. Как показали результаты исследова-

ований начиная с 3-х сут проявляется отчетливое влияние сочетанного введения ММСК и ГСК на процессы регенерации: статистически значимо увеличивалось количество гепатоцитов на 1 мм^2 , средняя площадь ядер гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, количество двуядерных гепатоцитов, митотический индекс по сравнению с контролем. Такая же динамика прослеживается и на 7-е сут. Положительный эффект сочетанного введения ММСК и ГСК подтверждается также снижением в динамике величины апоптотического индекса (табл. 2).

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о способности сочетанной трансплантации ММСК и ГСК увеличивать количество гепатоцитов, о чем свидетельствует активация митотической активности и ингибирование запрограммированной клеточной гибели. Повышение митотической активности гепатоцитов, можно объяснить способностью ММСК к выработке гепато-

Таблица 2

Морфометрические параметры при CCl_4 – гепатите на фоне сочетанного введения мультипатентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток

Показатели	Значение						
	Интактные мыши	1 сут		3 сут		7 суток	
		NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК	NaCl	ММСК+ГСК
Количество гепатоцитов на 1 мм^2	1567,57±55,92	2060,71±92,53*	2151±171,55*	1902,86±82,69*	2397,0±114,86* °	2048,86±64,73*	2538,0±102,0* °
Площадь гепатоцитов, мкм^2	264,90±6,60	186,43±9,38*	193,00±12,94*	203,60±8,46*	210,64±11,31*	204,71±10,84*	227,47±12,08
Площадь ядра гепатоцитов, мкм^2	50,57±3,80	53,60±3,60	57,23±4,98	53,27±2,32	64,17±4,48* °	60,94±4,68	79,86±4,53* °
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм^2	214,33±10,33	132,83±8,85*	138,30±11,80*	150,33±10,60*	146,47±9,53*	143,77±12,86*	147,61±7,62*
ЯЦИ	0,24±0,03	0,41±0,04*	0,41±0,02*	0,36±0,04*	0,44±0,03* °	0,43±0,06*	0,54±0,02* °
Количество двуядерных гепатоцитов на мм^2	233,43±12,2	830,43±52,65*	1017,57±60,78* °	474,43±46,08*	621,14±58,98* °	388,57±15,22*	486,0±24,29* °
МИ, %	0,48±0,07	17,74±2,13*	22,04±1,53* °	15,20±1,20*	20,40±1,60* °	17,06±1,64*	23,56±1,85* °
АИ, %	0,41±0,05	4,87±0,36*	4,34±0,36	3,7±0,31*	2,67±0,23* °	3,74±0,31*	2,87±0,26* °

Примечание. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$ —с показателями интактной группы; ° $p < 0,05$ с показателями контрольной группы.

цитарного фактора роста — фактора стволовой клетки. Увеличение размеров ядра, количества двуядерных клеток свидетельствуют об активации процессов внутриклеточной регенерации. Эти изменения можно объяснить слиянием трансплантированных и аутологических ГСК с гепатоцитами. При анализе данных периферической крови выявлено снижение активности АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы. Снижение активности ферментов цитолиза определяется способностью ММСК через формирование межклеточных контактов индуцировать в клетках образование белков теплового шока (70 кД). Белки теплового шока с данной молекулярной массой, стабилизируя цитоскелет клетки, увеличивают их устойчивость к повреждению. В настоящем исследовании также показано, что сочетанная трансплантация ММСК и ГСК обеспечивает активацию белоксинтетической функции печени. Таким образом, результаты исследования продемонстрировали способность сочетанной трансплантации ММСК и ГСК активировать процессы регенерации печени в условиях ее токсического повреждения.

В современной литературе широко обсуждаются эффекты использования фармацевтических средств при токсическом гепатите. Сюда можно отнести препараты природного происхождения на основе фосфолипидов и триацилглицеринов и другие соединения, нормализующие метаболические процессы в печени и восстанавливающие целостность мембран гепатоцитов [18–20]. Однако трансплантируемые ММСК и ГСК имеют более разнообразные механизмы действия (противовоспалительное действие, ингибирование запрограммированной клеточной гибели, активация митотической активности). Это делает перспективным дальнейшее изучение влияния стволовых клеток на структуру и функцию печени в условиях ее токсического повреждения.

Литература

(п.п. 2-4; 7-9; 12-20 см. References)

1. *Российский статистический ежегодник*. 2018: Стат. сб./Росстат. Р 76 М., 2018.
5. Дешевой Ю.Б., Мороз Б.Б., Насонова Т.А., Лебедев В.Г., Добрынина О.А., Лыршикова А.В. Влияние мультипатентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на восстановление кожи при местных лучевых поражениях. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4): 62-6. <https://doi.org/10.25557/IGPP.2017.4.8524>
6. Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А., Карнаухов В.Н. Изучение регенеративного потенциала стволовых клеток костного мозга для лечения механических травм кожи в модельных экспериментах на мы-

шах. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(1): 31-8.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.31-38

10. Онищенко Н.А., Люндуп А.В., Газизов И.М. и др. Двухфазная динамика воздействия мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК) костного мозга на печень при моделировании фиброзирующего гепатита. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2011; том XIII(3): 51-8.
11. Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П. Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 59(4): 82-6.

References

1. *Russian statistical yearbook. [Rossiyskiy statisticheskiy ezhegodnik]*. Stat. sb./Rosstat, P 76. Moscow: 2018. (in Russian)
2. Prockop D.J., Oh J.Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.* 2012; 20(1): 14-20.
3. Maria P. de Miguel, I. Prieto, A. Moratilla, J. Arias, M. A. Aller. *Mesenchymal Stem Cells for Liver Regeneration in Liver Failure: From Experimental Models to Clinical Trials*. Hindawi Stem Cells International Volume 2019, Article ID 3945672, P. — 12. <https://doi.org/10.1155/2019/3945672>
4. Danilova I, Medvedeva S, Bulavintseva T, Mukhlynnina E. The role of stem cell factor in the regeneration after toxic Liver injury World Congress on Hepatitis. *J Liver*. 2015; Volume 4, Issue 3.
5. Deshevoy Yu.B., Moroz B.B., Nasonova T.A., Lebedev V.G., Dobrynnina O.A., Lirshikova A.V. Effect of cultivated multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue to restore skin with local radiation lesions. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(4): 62-6. <https://doi.org/10.25557/IGPP.2017.4.8524>. (in Russian)
6. Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova L.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*. 2020; 64(1): 31-8. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.31-38. (in Russian)
7. Thawley V. Acute Liver Injury and Failure Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. May 2017; 47(3): 617-30.
8. Michalopoulos G.K. Liver regeneration. *J. Cell Physiol*. 2007; 213(2): 286–300.
9. Jung J., Choi J., Lee Y., Park J., Il-Hoan Oh, Seong-Gyu et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells promote hepatic regeneration in CCl4-Injured rat liver model via increased autophagic mechanism. *STEM CELLS*. 2013; 31: 1584–96.
10. Onishchenko N.A., Lyundup A.V., Gazizov I.M. Two-phase dynamics of the impact of mesenchymal multipotent stromal cells (MMSCs) of bone marrow on the liver in the simulation of fibrosing hepatitis. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2011, Vol. XIII(3): 51-8. (in Russian)
11. Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Yastrebov A.P. Influence of extreme factors on the homing of multipotent mesenchymal stromal cells *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59(4): 82-6. (in Russian)
12. Maklakova I.Y., Grebnev D.Y. Effects of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and hemopoietic stem cell on regeneration of the hemopoietic tissue. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017; 163(1): 61-4.

13. Brilliant A.A., Brilliant Yu.M., Sazonov S.V. Characteristics of the relation between epithelial-mesenchymal transition and proliferative activity in breast carcinomas. *European Journal of Cancer*. 2013; 49(S2): 216.
14. Samsonraj, R.M., Raghunath, M., Nurcombe, V., et al., Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem Cells Transl. Med.* 2017; 6(12): 2173.
15. Marfy-Smith SJ, Clarkin CE. Are mesenchymal stem cells so bloody great after all? *Stem Cells Translational Medicine*. 2017; 6: 3–6.
16. Pilat N., Unger L., Berlakovich G. A. Implication for Bone Marrow Derived Stem Cells in Hepatocyte Regeneration after Orthotopic Liver Transplantation/ Hindawi Publishing Corporation. *International Journal of Hepatology*. Vol. 2013, Article ID 310612, P. 7 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/310612>
17. Jason A. Meierhenry, Volodymyr Ryzhuk, Maricel G et al. Placenta as a Source of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Curr Pathobiol Rep*. 2015; 3: 9–16. DOI 10.1007/s40139-015-0070-6
18. Guo, Q., Zhang Q.-Q., Chen J., Xu F.-G. Liver metabolomics study reveals protective function of *Phyllanthus urinaria* against CCl₄-induced liver injury. *Chinese journal of natural medicines*. 2017; 15(7): 525–33.
19. Kuriakose, J., Lal H.R., Vysakh A., Eldhose B., Latha M.S. Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb. fruit mitigates CCl₄ induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Biomedicine and pharmacotherapy*. 2017; 93: 327–33.
20. Mbarki, S., Alimi H., Bouzenna H., Elfeki A., Hfaiedh N. Phytochemical study and protective effect of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek seeds) against carbon tetrachloride-induced toxicity in liver and kidney of male rat. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 2017; 88: 19–26.

Сведения об авторах:

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

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

© Савилов П.Н., 2020

УДК 6616-005.2

Савилов П.Н.

Кровоток и напряжение кислорода в печени при различных способах её повреждения и гипероксии

ТОГБУЗ «Тамбовская ЦРБ»,

392524, Россия, Тамбовская обл., Тамбовский р-н, с. Покрово-Пригородное, ул. Полевая, д. 4;

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко»,

39400, Воронеж, ул. Студенческая, д. 1

Цель исследования – изучение кровотока и напряжения кислорода в печени при механическом, химическом и комбинированном поражении и курсовом воздействии гипербарической оксигенации (ГБО). **Методика.** Опыты выполнены на 143 белых крысах-самках массой 180–220 г. Механическое повреждение печени моделировали частичной гепатэктомией (ЧГЭ), удаляя часть левой доли печени (15–20% массы органа), химическое поражение – подкожным введением 50% раствора CCl_4 на оливковом масле (0,1 мл/100 г). Инъекции делали через день на протяжении 65 сут. Для комбинированного поражения на 65-е (последние) сут введения CCl_4 проводили ЧГЭ с последующей ГБО (3 ата, 50 мин, трёхкратно, через 4–8, 24 и 48 ч после ЧГЭ). Печёночный кровоток в оперируемой левой (ЛДП) и одной из неоперируемых (средней, СДП) доле печени исследовали методом водородного клиренса. Напряжение кислорода (pO_2) в печёночной ткани исследовали полярографически с платиновым электродом с поправкой на температурный коэффициент. Исследования проводили на 3-и, 7-е и 14-е сут послеоперационного (1-е, 4-е и 11-е сут постгипероксического) периода. **Результаты.** ЧГЭ у здоровых животных, стимулируя кровоток в обеих исследуемых долях печени, снижает pO_2 только в остатке ЛДП на 3-и и 7-е сутки послеоперационного периода. На 65-е сут введения CCl_4 наблюдается снижение кровотока в остатке ЛДП и СДП, соответственно, на 42% и 39%, а pO_2 на 50%. Эти показатели не нормализуются к 14-м сут после отмены токсина. Применение ЧГЭ на 65-е сут введения CCl_4 вызывает увеличение кровотока на 3-и и 7-е сут послеоперационного периода только в СДП, однако на 14-е сут он снижается до уровня конца затравки. Это сопровождается кратковременной нормализацией сниженного pO_2 на 7-е сутки послеоперационного периода. В остатке ЛДП у животных с хроническим CCl_4 -гепатитом и ЧГЭ величина кровотока и pO_2 не изменяется, оставаясь ниже нормы к 14-м сут после ЧГЭ. Применение ГБО у здоровых крыс с ЧГЭ устраняет стимулирующее влияние операции на кровоток в обеих исследуемых долях органа, нормализуя pO_2 в остатке ЛДП и снижая его в СДП на 3-и и 7-е сут, которое устраняется к 14-м сут после ЧГЭ на фоне отсроченного стимулирующего влияния гипероксии на кровоток в этой доле печени. У животных с комбинированным поражением печени применение ГБО стимулирует увеличение кровотока в обеих исследуемых долях органа, что способствует увеличению pO_2 относительно предоперационного уровня, но полной его нормализации не происходит. Стимулирующее влияние ГБО на кровоток у животных с комбинированным поражением печени сохраняется к 11-м сут постгипероксического периода. **Заключение.** Длительное действие на организм CCl_4 снижает чувствительность печёночного кровотока к стимулирующему влиянию ЧГЭ, способствуя стойкому развитию гипоксии в повреждённой и неповреждённой при операции долях печени. Реакция кровотока и тканевого pO_2 оперированной печени на ГБО находится в прямой зависимости от состояния данного органа на момент гипероксического воздействия.

Ключевые слова: печень; кровоток; напряжение кислорода; гипероксия; гепатит; частичная гепатэктомия.

Для цитирования: Савилов П.Н. Кровоток и напряжение кислорода в печени при различных способах её повреждения и гипероксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 54–62.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.54-62

Для корреспонденции: Савилов Павел Николаевич, e-mail: p_savilov@rambler.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 11.11.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Savilov P.N.

Hepatic blood flow and oxygen tension in different types of liver damage and hyperoxia

Tambov Central Regional Hospital,

Polevaya 4, Pokrov-Prigorodnoe Village, Tambov Region, Tambov Oblast 392524, Russia;

N.N. Burdenko Voronezh State Medical University,

Studencheskaya Str. 1, Voronezh 39400, Russia

The aim of study was to investigate hepatic blood flow and oxygen tension in mechanical, chemical, and combined injury of the liver and during a course of hyperbaric oxygenation (HBO). **Methods.** Experiments were performed on 143 white female rats weighing 180-220 g. Mechanical injury of the liver was modeled with partial hepatectomy (PHE) by removing a part of the left hepatic lobe (HL) (15-20% of liver weight). Chemical injury was modeled by subcutaneous injection of 50% CCl_4 in olive oil (0.1 ml/100 g). Injections were performed every second day for 65 days. For the combined injury, PHE followed by HBO (3 ATA, 50 min) was performed on day 65 (last day) of CCl_4 administration. HBO was applied three times, at 4-8, 24, and 48 hours after PHE. Hepatic blood flow was studied using hydrogen clearance in the operated, left HL (LHL) and in one of unoperated, middle HL (MHL). Hepatic oxygen tension (pO_2) was evaluated by polarography with a platinum electrode; data were corrected for the temperature coefficient. Studies were performed on postoperative days 3, 7 and 14 (posthyperoxia days 1, 4, and 11). **Results.** In normal animals, PHE stimulated blood flow in both studied hepatic lobes and decreased pO_2 only in the remaining LHL on postoperative days 3 and 7. On day 65 of CCl_4 administration, blood flow was reduced by 42% and 39%, respectively, in remaining LHL and MHL while pO_2 was reduced by 50%. These changes were not reversed by day 14 following the toxin withdrawal. PHE performed on day 65 of CCl_4 administration caused an increase in blood flow on postoperative days 3 and 7 only in MHL; however, on day 14, the blood flow decreased to the level of the end of toxin administration. This was associated with a brief normalization of the reduced pO_2 on postoperative day 7. In the remaining LHL of animals with chronic CCl_4 -induced hepatitis and PHE, values of blood flow and pO_2 did not change and remained below the normal level at 14 days after PHE. The HBO exposure of healthy rats with PHE abolished the stimulating effect of surgery on blood flow in both studied hepatic lobes, thereby normalizing pO_2 in the remaining LHL and decreasing pO_2 in MHL on days 3 and 7. This was reversed by postoperative day 14 due to the stimulating effect of hyperoxia on blood flow in this HL. In animals with combined injury of the liver, HBO stimulated blood flow in both studied HLs, thereby increasing pO_2 above the preoperative level; however, a complete recovery did not occur. The stimulating effect of HBO on blood flow in animals with combined injury remained by day 11 of the posthyperoxic period. **Conclusion.** A prolonged exposure to CCl_4 reduced the sensitivity of hepatic blood flow to the stimulating effect of PHE, which facilitated development of persistent hypoxia in both injured and uninjured HLs. Responses to HBO of blood flow and tissue pO_2 in operated liver directly depend on the state of liver at the moment of hyperoxia exposure.

Keywords: liver; blood flow; oxygen tension; hyperoxia; hepatitis; partial hepatectomy.

For citation: Savilov P.N. Hepatic blood flow and oxygen tension in different types of liver damage and hyperoxia. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimentalnaya Terapiya (Patologucal and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 54-62. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.54-62

For correspondence: Pavel N. Savilov, Doctor of medical Sciences, Professor, anesthesiologist, offices «Operating unit with the chamber of reanimatology and intensive therapy», Tambov Regional State Institution «Tambopovskaya CRH», 4 ul. Polevaya, v. P.-Prigorodnoye, Tambov region, 393524, Russian Federation, e-mail: p_savilov@rambler.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about the authors:

Savilov P.N.; <http://orcid.org/0000-0003-0506-8939>

Received 11.11.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Введение

Необходимым условием функционирования любого органа является оптимальное соотношение между потребностью в кислороде и его потреблением клетками в конкретных условиях [1, 2]. Важным показателем, характеризующим кислородный режим ткани является напряжение кислорода (pO_2) «который отражает подачу кислорода к местам утилизации и скорость потребления кислорода, которая при несоответствии кислородному запросу характеризует степень гипоксии ткани» [3]. Другим показателем, характеризующим степень кислородного обеспечения клетки, является тканевой кровоток [2, 3], нарушение которого является одним из ведущих звеньев в патогенезе тканевой гипоксии [4]. К методам устранения гипоксии относится гипербарическая оксигенация (ГБО) [5]. Однако ан-

тигипоксическое действие ГБО, основанное на повышении содержания в плазме крови растворённого кислорода, проявляется только в условиях барокамеры [4]. Между тем, возникает вопрос, как изменяется кислородный режим оксигенированной ткани в постгипероксическом периоде и как сочетается это с функциональной активностью её клеток.

Цель работы — изучение напряжения кислорода и кровотока в печени при её механическом, химическом, комбинированном поражении и применении на этом фоне ГБО.

Методика

Опыты проведены на 143 беспородных белых крысах (самках) массой 180–220г, разводимых в

виварии Воронежской государственной медицинской академии (потомство животных из питомника лабораторных РАМН(или РАН?) «Белый Мох»). Для эксперимента отбирали животных, прошедших 10-дневный карантин. Механическое повреждение печени вызывали частичной гепатэктомией (ЧГЭ), удаляя электроножом часть левой доли печени (15–20% от массы органа). Хронический тетрахлорметановый (CCl_4) гепатит моделировали подкожным (п/к) введением 0,1 мл 50% раствора CCl_4 на оливковом масле на 100г массы тела, через день в течение 65 сут с двумя двухнедельными перерывами между 6–7- и 13–14-й инъекциями [6]. Сразу после последней инъекции токсина одним животным делали лапаротомию («ложнооперированные» животные), другим – ЧГЭ в том же объёме, что и здоровым животным. ГБО проводили медицинским кислородом в режиме 3 ата, 50 мин, через 4–8, 24 и 48 ч после ЧГЭ соответственно. Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными Приказом МЗ СССР от 12.08.77 г. (№ 755). Оперативные вмешательства (лапаротомия и частичная гепатэктомия) проводили под эфирным наркозом. Выведение животных из опыта осуществляли декапитацией под этаминаловым наркозом (40 мг/кг).

Объектом исследования служили оперируемая левая (ЛДП) и одна из неоперированных средняя (СДП) доля печени. Определяли печёночный кровоток (мл/с *кг) методом водородного клиренса [7] и напряжение кислорода (pO_2 , кПа) полярографическим методом [8] с поправкой на температурный коэффициент [9].

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ «Statistica 5.5» и «Microsoft Exel XP». Использовали параметрический t-критерий Стьюдента с коэффициентом Ньюмана-Кейлса для множественных сравнений [10]. Различия результатов считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Лапаротомия у здоровых крыс не выявила статистически значимых изменений кровотока и pO_2 что позволило в качестве контроля влияния ЧГЭ у здоровых крыс использовать интактных животных на 3-и и 7-е сут после ЧГЭ отмечено достоверное увеличение кровотока в СДП (на 27% и 35% соответственно), тогда как в ЛДП увеличение кровотока (на 35%) отмечено только на 3-и сут после операции (табл. 1). Поскольку ЧГЭ у здоровых крыс вызывает увеличение притока к оперированному органу артериальной крови [11], то

полученные результаты указывают на развитие артериальной гиперемии в исследуемых долях печени, длительность которой зависит от наличия в них очага механической деструкции ткани.

С патофизиологической точки зрения, артериальная гиперемия есть защитно-приспособительная реакция организма, направленная на обеспечение дополнительным количеством кислорода повреждённой ткани при его повышенном потреблении её клетками. Если скорость потребления кислорода клетками преобладает над скоростью его доставки, то развивается гипоксия ткани [2], одним из признаков которой является снижение тканевого pO_2 [2.8]. Как показали наши исследования (табл. 1), увеличение кровотока в СДП не сопровождалось изменениями pO_2 артериальной крови к 14-м сут послеоперационного периода, тогда как в остатке ЛДП его величина на 3-и и 7-е сут после ЧГЭ была ниже нормы, соответственно, на 39% и 18% (табл. 1), т. е. имела место гипоксия данного участка оперированной печени. Причинами её развития в остатке ЛДП на фоне артериальной гиперемии являются активация в исследуемые сроки после ЧГЭ репаративных процессов в печени [12], фибробластов, включающихся в процесс заживления раневой поверхности [13] и купферовских клеток, которые, наряду с нейтрофилами и моноцитами [14], обеспечивают фагоцитоз и переваривание частей клеток ткани, погибших при коагуляционной деструкции.

Применение трёхдневного курса ГБО после ЧГЭ у здоровых крыс предотвращало увеличение ПКТ в обеих исследуемых долях печени в 1-ю нед послеоперационного периода, стабилизируя его в пределах нормы (табл. 1). Учитывая α -адреномиметические и β -адреноблокирующие свойства гипербарического кислорода [4], есть основания говорить о вазоконстрикторном эффекте гипероксии, как причине отсутствия увеличения кровотока в исследуемых долях печени в 1-ю нед послеоперационного периода.

Если вазоконстрикторное влияние ГБО на печёночный кровоток не зависело от расстояния до очага механической деструкции, то реакция pO_2 в остатке ЛДП и СДП на гипероксию была различной. В первом случае его величина на 3-и и 7-е сут послеоперационного периода, превышала аналогичный показатель неоксигенированных животных с ЧГЭ соответственно, на 40% и 28%, не отличаясь от нормы (табл. 1). С одной стороны, это связано со способностью гипероксии устранять отёк околораневой поверхности [15], облегчая диффузию кислорода из крови в ткань [13]. С другой, гипероксическая стимуляция фагоцитарной активности моноцитов и нейтрофилов [15], что созда-

ёт условия для быстрой элиминации погибших клеток и продуктов их распада.

В СДП оксигенированных крыс с ЧГЭ на 3-и и 7-е сут после операции обнаружено снижение тканевого pO_2 на 22% и 18% относительно нормы (табл. 1). Полученные результаты свидетельствуют о формировании в СДП здоровых крыс после сочетанного применения ЧГЭ и ГБО постгипероксической гипоксии в результате преобладания в клетках этой доли скорости потребления кислорода над скоростью его доставки. Такое несоответствие связано не только с усилением репаративных процессов в оперированном органе под действием ГБО [4, 13, 15], но и сохранением на протяжении 11 сут постгипероксического периода стимулирующего влияния ГБО на функциональную активность гепатоцитов [17]. Поэтому, постгипероксическую гипоксию в СДП здоровых крыс при сочетанном применении ЧГЭ и ГБО следует рассматривать как гипоксию нагрузки, которая развивается при тяжёлой физической работе и у спортсменов [1, 3].

Постгипероксическая гипоксия может запускать новые адаптационные механизмы, направленные на повышение саногенного потенциала больного организма [18]. Поэтому нельзя исключить, что её сохра-

нение в СДП к 4-м сут постгипероксического периода (табл. 1) вызовет стимуляцию образования вазодилататоров в СДП, что объясняет отсроченное (на 35%) увеличение кровотока в СДП к 11-м сут постгипероксического периода на фоне нормализации в ней тканевого pO_2 (табл. 1).

В отличие от механического, длительное токсическое поражение печени CCl_4 приводило на 65-е сут введения гепатотоксина к снижению кровотока в ЛДП и СДП, соответственно, на 42% и 39. Это сопровождалось снижением в них pO_2 на 50% (табл. 2). Аналогичные результаты получены и другими исследователями [19]. Прекращение введения CCl_4 и контрольная лапаротомия (для визуальной оценки состояния печени в конце заправки) показало неоднозначные изменения кровотока и pO_2 в исследуемых долях печени в восстановительном периоде. Так к 14-м сут после отмены CCl_4 кровотока и pO_2 в ЛДП оставался статистически значимо ниже нормы (табл. 2). В СДП имело место кратковременное (на 3-и сут) после отмены токсина восстановление кровотока, не приводящее к нормализации в ней pO_2 , величина которого оставалась ниже нормы к 14-м сут восстановительного периода (табл. 2). Из этого следует, что помимо гемоди-

Таблица 1

Напряжение кислорода и кровотока в левой (ЛДП) и средней (СДП) долях печени крыс после частичной гепатэктомии (ЧГЭ) и гипербарической оксигенации (ГБО) (M ± m)

Показатели		Норма (10)	Фактор воздействия	Сутки после ЧГЭ / ГБО		
				3/1	7/4	14/11
pO_2	ЛДП	1,84±0,16	ЧГЭ	1,31 ± 0,25* (9)	1,50 ± 0,12* (9)	1,85 ± 0,21 (8)
			ЧГЭ+ГБО	1,84 ± 0,19* (8)	1,92 ± 0,18* (8)	1,88 ± 0,17 (8)
	СДП	1,84 ± 0,11	ЧГЭ	1,60 ± 0,18 (9)	2,01 ± 0,23 (9)	1,80 ± 0,16 (8)
			ЧГЭ+ГБО	1,44 ± 0,14* (8)	1,51 ± 0,11* (8)	1,88 ± 0,17 (8)
ПКТ	ЛДП	21,30±1,81	ЧГЭ	28,80 ± 1,68* (9)	25,60±1,56 (9)	21,80±1,75 (8)
			ЧГЭ+ГБО	20,40±1,65* (8)	19,80±1,78* (8)	23,40±1,84 (8)
	СДП	18,10±1,21	ЧГЭ	23,00±1,25* (9)	25,30±1,56* (9)	22,40±1,98 (8)
			ЧГЭ+ГБО	17,20±1,25* (8)	16,50±1,77* (8)	24,30±1,68* (8)

Примечание. * $p < 0,05$ – статистическая значимость различий с показателями нормы; * – с соответствующими показателями неоксигенированных животных с ЧГЭ. В скобках – количество животных по сериям опытов. pO_2 – напряжение кислорода (кПа); ПКТ (мл/с/кг) – кровотока в печени.

намических нарушений, в развитии гипоксии печени при хроническом CCl_4 – гепатите могут быть и другие причины, например, гипохромная анемия [20]. В свою очередь, снижение числа функционирующих синусоидов, включение шунтирующих сосудов и появление порто-печёчных анастомозов, выявленное при данной патологии [21], объясняет стойкое снижение кровотока в исследуемых долях печени после отмены CCl_4 (табл. 2).

Что касается кратковременной избирательной нормализации кровотока в СДП на 7-е сут после отмены CCl_4 (табл. 2), то оно может объясняться несколькими причинами. Во-первых, различной чувствительностью рецепторов сосудистого русла к метаболитам CCl_4 , которые, как известно, [22] вызывают спазм печёчных артериол и венул, а также отёк сфинктеров печёчных синусоидов. Во-вторых, следует отметить особенность портального кровоснабжения левой доли печени у крыс, получающей преимущественно кровь оттекающую от селезёнки [23], которая вовлекается в адаптивные процессы при поражении печени CCl_4 [24]. Гипоксия, развивающаяся в печени при хроническом CCl_4 -гепатите, нарушает аммиакдетоксикационную функцию гепатоцитов, которая не восстанавливается к 14-м сут после отмены CCl_4 [25].

После ЧГЭ на фоне хронического CCl_4 -гепатита кровотока в остатке ЛДП статистически значимо не отличался от уровня показателей конца затравки, ухудшаясь к 14-м сут послеоперационного периода до уровня 47% ниже нормы (табл. 2). В СДП животных с хро-

ническим CCl_4 -гепатитом кровотока на 3-и и 7-е сут после ЧГЭ превышал показатель конца затравки, соответственно, на 39% и 95%, находясь в пределах нормы, однако к 14-м сут послеоперационного периода он снижался до предоперационного уровня (табл. 2). Из этого следует, что при хроническом CCl_4 -гепатите чувствительность сосудистого русла печени к стимулирующему влиянию ЧГЭ сохраняется только в неповреждаемой при операции доле органа. Однако, это не предотвращает снижение кровотока к 14-м сут послеоперационного периода. Одной из причин этого является формирование при хроническом CCl_4 -гепатите обходных внепечёчных портокавальных анастомозов [21], что предотвращает увеличение притока портальной крови к печени на 14-е сут после ЧГЭ, которое наблюдается в аналогичные сроки после ЧГЭ у здоровых животных [11].

Как видно из табл. 2, у крыс с хроническим CCl_4 -гепатитом и ЧГЭ показатель pO_2 в остатке ЛДП к 14-м сут после операции статистически значимо не отличался от предоперационного уровня (конец затравки), оставаясь значимо ниже нормы. В СДП на 3-и и 7-е сут послеоперационного периода показатель pO_2 статистически значимо превышал аналогичный показатель как конца затравки, так и соответствующий показатель «ложнооперированных» животных; его нормализация отмечена только на 7-е сут послеоперационного периода (табл. 2). На 14-е сут после ЧГЭ величина тканевого pO_2 в СДП была на 30% ниже нормы, превышая на 40% аналогичный показатель конца затравки (табл.

Таблица 2

Напряжение кислорода и кровотока в левой и средней долях печени крыс с хроническим CCl_4 -гепатитом после частичной гепатэктомии, ($M \pm m$)

Показатели		Норма (10)	Конец затравки (8)		Сутки послеоперационного периода		
					3	7	14
pO_2	ЛДП	1,54±0,09	0,77±0,09*	ЛО	0,79±0,14* (8)	0,74 ±0,05* (8)	0,94±0,06* (8)
				ЧГЭ	0,98 ±0,15* (9)	0,92 ±0,19* (9)	0,94±0,06* (9)
	СДП	1,65 ±0,07	0,82±0,10*	ЛО	0,77±0,08* (8)	0,81±0,10* (8)	1,02±0,08* (8)
				ЧГЭ	1,11±0,11* (9)	1,68±0,11 (9)	1,15±0,10* (9)
ПКТ	ЛДП	22,30 ±1,91	12,90±2,22*	ЛО	16,50±1,90* (8)	13,01±1,06* (8)	14,10±1,53* (8)
				ЧГЭ	16,80±1,79* (9)	14,20±3,89* (9)	11,90±1,42* (9)
	СДП	19,50±0,81	11,80±0,34*	ЛО	17,30±1,50* (8)	12,60±1,47* (8)	12,10±1,99* (8)
				ЧГЭ	16,40±1,46* (9)	23,01±3,40* (9)	12,30±1,17* (9)

Примечание. Статистическая значимость ($p<0,05$) различий: * – по отношению к норме;

^ – по отношению к концу затравки; * – по отношению к ложнооперированным животным; ЛО- «ложнооперированные» животные; остальные обозначения те же что в табл. 1.

2). Сопоставление полученных результатов, позволяет говорить о том, что кратковременное отсутствие гипоксии в СДП вызвано снижением потребления кислорода, которое усугубляется к 14-м сут послеоперационного периода. Неслучайно, снижение к этому сроку кровотока в СДП до уровня конца затравки не приводит к аналогичным изменениям pO_2 (табл. 2). Сохранение гипоксии в оставшейся после ЧГЭ части печени животных с хроническим CCl_4 -гепатитом объясняет нарушение аммиакдетоксикационной функции гепатоцитов [26] и прогрессирование эндогенной аммиачной интоксикации [27].

Если у животных с хроническим CCl_4 -гепатитом после ЧГЭ применялся трёхдневный курс ГБО, то в 1-е сут постгипероксического периода (3-и сут после ЧГЭ) кровотока в остатке ЛДП увеличивался на 39%, в СДП на 25% относительно контроля (рис. А). По сравнению с концом затравки кровотока увеличивался в остатке ЛДП на 80%, в СДП на 75 %, достигая уровня показателей нормы (табл. 3). К 4-м сут постгипероксического периода стимулирующее влияние ГБО на скорость кровотока в остатке ЛДП сохранялось (рис. Б), благодаря чему он существенно не отличался от нормы, превышая аналогичный показатель конца затравки на 42% (табл. 3). В СДП к этому сроку проявлялось отсроченное (как у здоровых крыс с ЧГЭ) ингибирующее действие ГБО на кровотока (рис. Б), который снижался до уровня конца затравки, становясь на 32% ниже нормы (табл. 3). На 11-е сут постгипероксического периода у оксигенированных крыс с комбинированным поражением печени кровотока в остатке ЛДП и СДП превышал аналогичный показатель животных контрольной серии, соответственно, на 86% и 25% (рис. В). Относи-

тельно конца затравки его увеличение составило, соответственно, 78% и 33%. Но если в ЛДП он был пределах нормы, то в СДП оставался ниже на 19% (табл. 3).

Сопоставление полученных результатов позволяет говорить о том, что комбинированное поражение печени (CCl_4 +ЧГЭ) изменяют реакцию печёночной гемодинамики на ГБО. Это проявляется гипероксической стимуляцией кровотока в оперированной печени в раннем (3-и сут) послеоперационном периоде, независимо от расстояния до очага механической деструкции ткани. Можно полагать, что в основе стимуляции кровотока лежит гипероксическая вазодилатация печёночных артериол, например, через стимуляцию образования NO. Что касается ослабления вазодилатационного эффекта ГБО в СДП животных с комбинированным поражением печени на 4-е сут постгипероксического периода, то это можно связать с активацией образования гепатоцитами мочевины [28], для которой субстратом, как и для NO, является аргинин. Неслучайно снижение повышенной аргиназной активности в гепатоцитах этих животных к 11-м сут постгипероксического периода [28] совпадает по срокам с восстановлением стимулирующего влияния ГБО на кровотока в СДП (рис. В).

Как видно из рис. А, в 1-е сут постгипероксического периода у оксигенированных крыс с комбинированным поражением печени величина pO_2 в остатке ЛДП и в СДП достоверно не отличалась от аналогичного показателя контрольной серии, тогда как по сравнению с концом затравки была увеличена только в СДП на 24%; по сравнению с нормой она была снижена в обеих исследуемых долях (табл. 3). На 4-е сут постгипероксического периода величина pO_2 в остатке ЛДП

Таблица 3

Напряжение кислорода и кровотока в печени оксигенированных крыс с частичной гепатэктомией на фоне хронического CCl_4 -гепатита, ($M \pm m$)

	Норма $n=10$	Конец затравки $n=8$	Сутки после операционного (постгипероксического) периода		
			3 (1) $n=8$	7 (4) $n=8$	14 (11) $n=8$
Оперируемая левая доля печени					
pO_2	1,54 ± 0,10	0,77 ± 0,09*	0,86 ± 0,06*	1,29 ± 0,16*	0,99 ± 0,10*
ПКТ	22,30 ± 1,91	12,90 ± 2,22*	23,30 ± 2,37*	18,30 ± 0,81*	23,01 ± 2,56*
Неоперируемая (средняя) доля печени					
pO_2	1,61 ± 0,07	0,82 ± 0,09*	1,02 ± 0,09**	1,23 ± 0,11**	1,29 ± 0,11**
ПКТ	19,50 ± 0,81	11,80 ± 0,40*	20,70 ± 0,98*	13,30 ± 0,86*	15,80 ± 1,48*

Примечание. Статистическая значимость различий ($p < 0,05$): * – по сравнению с нормой; * – по сравнению с концом затравки; n – количество животных по сериям опытов. Остальные обозначения те же, что в табл. 1.

превышала контроль на 40%, тогда как в СДП была снижена на 23% (рис. Б). Относительно конца затравки её увеличение в остатке ЛДП и в СДП составило, соответственно, на 68% и 50%; но, если по сравнению с нормой величина pO_2 в остатке ЛДП достоверно не изменялась, в СДП была снижена на 24% (табл. 3). На 11-е сут постгипероксического периода у крыс с комбинированным поражением печени величина pO_2 в остатке ЛДП и СДП значимо не отличалась от аналогичного показателя контрольной серии (рис. В). По сравнению с концом затравки она была увеличена только в СДП на 57%, тогда как относительно нормы была снижена в остатке ЛДП и СДП, соответственно, на 36% и 20% (табл. 3).

Анализ результатов показал, что ГБО у крыс с комбинированным поражением печени, улучшая кровоснабжение повреждаемой и неповреждаемой долей печени не приводит к полному устранению в них гипоксии. Сопоставление динамики кровотока и pO_2 в постгипероксическом периоде позволяет говорить о значительном увеличении потребления кислорода гепатоцитами, в частности, в результате стимулирующего влияния ГБО на аммиакобевреживающую функцию гепатоцитов при комбинированном поражении печени [28]. Поэтому постгипероксическую гипоксию у ок-

сигенированных крыс с комбинированным поражением печени, можно также трактовать как гипоксию напряжения.

Таким образом, реакция кровотока и pO_2 печени на ЧГЭ зависит от функционального состояния органа на момент операционного воздействия. Длительное действие CCl_4 на организм снижает чувствительность печёночного кровотока к стимулирующему влиянию ЧГЭ на 65-е сут введения гепатотоксина. Это проявляется неспособностью ЧГЭ восстанавливать сниженный кровоток в оставшейся после резекции части ЛДП и неповреждаемой при операции СДП после кратковременной (на 7-е сут после операции) нормализации в ней кровотока. При хроническом поражении печени CCl_4 снижение кровотока в обеих изучаемых долях печени детерминирует снижение в них тканевого pO_2 . Применение ЧГЭ на фоне хронического CCl_4 -гепатита вызывает лишь кратковременное улучшение сниженного кровотока в неповреждаемой при операции СДП, способствуя ухудшению кровотока в остатке ЛДП, не устраняя гипоксию поражённой CCl_4 печени.

ГБО, применённая после ЧГЭ, выступает в роли адаптогенного регулятора реакции печёночного кровотока в ответ на механическое повреждение печени. При этом гипероксическое влияние на гемодинамику

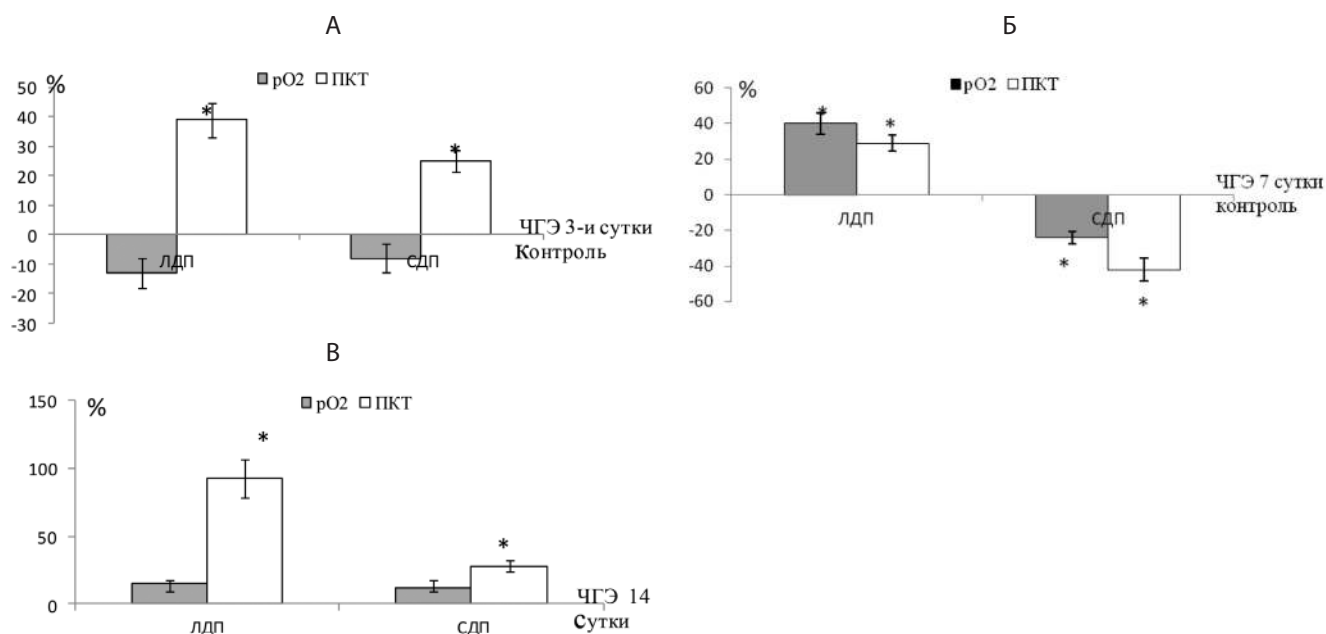


Рис. Изменения кровотока (КТ) и напряжения кислорода (pO_2) в левой (ЛДП) и средней (СДП) долях печени оксигенированных животных с частичной гепатэктомией (ЧГЭ) на фоне хронического CCl_4 -гепатита на 1-е (А), 4-е (Б) и 11-е (В) сут постгипероксического периода. * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$) по отношению к соответствующему контролю: неоксигенированные животные с хроническим CCl_4 -гепатитом на 3-и, 7-е и 14-е сут после ЧГЭ.

оперированной печени находится в прямой зависимости от того на каком фоне осуществляется оперативное воздействие. Предотвращая увеличение кровотока в оперированной печени здоровых крыс, ГБО устраняет развитие гипоксии в остатке ЛДП, но при этом содействует формированию постгипероксического гипоксии в первые 4 сут постгипероксического периода в СДП. У животных с комбинированным поражением печени гипербарический кислород проявляет стимулирующее влияние на печёночный кровоток. Оно наиболее выражено в остатке ЛДП и сохраняется к 11-м сут постгипероксического периода. ГБО при комбинированном поражении печени не устраняет имеющуюся на момент её применения гипоксию, но содействует улучшению кислородного режима печени по сравнению с предоперационным уровнем.

Благодарность. Считаю своим долгом выразить глубокую признательность моему учителю заслуженному деятелю науки РСФСР **Аполлинарию Николаевичу Леонову** за возможность проведения, описанных в данной статье исследований в лаборатории его кафедры патологической физиологии Воронежской государственной медицинской академии и ценные советы при обсуждении полученных результатов.

Литература

- Колчинская А.З. О классификации гипоксических состояний *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1981; 4: 3-10.
- Лябах Е.Г. *Кислородные режимы и их регулирование в работающей мышце*. Киев: ин-т Кибернетики АН УССР, 1990.
- Rotter E., Groom A. The Krogh cylinder geometry is not appropriate for modelling O₂ transport in contracting skeletal muscle *Oxygen Transport to tissue: Proc. 5th Intern. Symp. Detroit-N.Y.* 1983: 253-8.
- Леонов А.Н. *Гипероксия. Адаптация. Саногенез*. Воронеж: ВГМА, 2006.
- Руководство по гипербарической оксигенации*. (Ред. С.А. Байдин, А.Б. Граменецкий, Б.А. Рубинчик). М.: Медицина, 2008.
- Саркисов Д.С., Рубецкой Л.С. *Пути восстановления цирротически изменённой печени*. М.: Медицина, 1965.
- Гречин В.В. Изучение локального кровотока в глубоких структурах головного мозга. В кн. *Методы клинической физиологии*. Л.: Наука, 1977.
- Березовский В.А. *Напряжение кислорода в тканях животных и человека*. Киев: Наукова Думка, 1975.
- Прохончуков А.А., Логинова А.А., Жилина Н.А. *Функциональная диагностика в стоматологической практике*. М.: Медицина, 1980.
- Гланц С.А. *Медико-биологическая статистика*. (Пер. с англ.). М.: Медицина, 1999.
- Ungvary J., Bars T., Hunda P.A. Regeneration of the hepatic arterial system after partial hepatectomy. *Acta. Morf. Hung.* 1977; 23(3-4): 275-82.
- Солопаев Б.П. *Регенерация нормальной и патологически изменённой печени*. Горький: Верхне-Волжское из-во, 1980.
- Hunt T.K., Zederfeldt B., Goldstick T.R. Oxygen and healing. *Am. J. Surg.* 1969; 118: 521-5.
- Маянский Д.Н., Щербаков В.И., Колягина Т.Г. Зависимость моноцитарной инфильтрации печени от пролиферации гепатоцитов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1984; 5: 621-3.
- Niinikoski J., Henghan G., Hunt T.K. Oxygen tensions in human wounds. *J. Surg. Res.* 1972; 12: 77-82.
- Савилов П.Н. Влияние гипербарической оксигенации на фагоцитозстимулирующую функцию оперированной печени. *Общая реаниматология*. 2008; 4(5): 40-4.
- Савилов П.Н. Гипербарическая кислородная терапия нарушения обезвреживания аммиака в оперированной печени. *Анестезиология и реаниматология*. 1996; 5: 64-7.
- Савилов П.Н. Эффекты гипероксического последствия и постгипероксическое состояние организм. *Бюллетень гипербарической биологии и медицины*. 2006; 14(1-4): 21-51.
- Broelch Ch., Hopper J., Kessler M. *Oxygen supply to the cirrhotic Liver following varicus porta caval shunt proceeds*. Oxygen transport tissue III Plenum N.Y. and London, 1977: 633-41.
- Ульямов М.И., Слета И.В., Ступин И. Картина крови после криодеструкции и при экспериментальном циррозе печени. В кн: *Экспериментальное и клиническое обоснование методов криомедицины*. Харьков, 1988: 49-53.
- Гранов А.А., Мазо М.И., Вешетина С.М., Петровичев Н.Н. Изменение микроциркуляции и функциональной способности купферовских клеток печени при экспериментальном гепатите *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1977; 1: 29-31.
- Koo A., Liang I.S., Cheng K.K. Adrenergic mechanism in the hepatic microcirculation in the rat *Quart. J. Exp. Physiol.* 1977; 62(8): 199-208.
- Фишер А. *Физиология и экспериментальная патология печени*. Будапешт, 1961.
- Савилов П.Н. Азотистый метаболизм в селезёнке при хроническом тетрахлорметановом гепатите. *Биологический журнал Армении*. 2015; 67(4): 58-64.
- Савилов П.Н. Состояние аммиакобезвреживающей функции печени при хроническом активном гепатите. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2004; 1: 24-6.
- Савилов П.Н. Влияние частичной гепатэктомии на аммиакдетоксикационную функцию печени при хроническом тетрахлорметановом гепатите. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(2): 61-6. (in Russian)
- Савилов П.Н., Молчанов Д.В. Резекция печени изменяет механизмы выведения аммиака почками у крыс с хроническим тетрахлорметановым гепатитом *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(3): 72-9.
- Савилов П.Н., Яковлев В.Н., Леонов А.Н. Роль гипербарической оксигенации в механизмах детоксикации аммиака при резекции печени на фоне хронического гепатита *Анестезиология и реаниматология*. 1994; 6: 31-4.

References

- Kolchinskaya A.Z. On classification of hypoxic *Patologicheskaya Fiziolgiya I Experimentalnaya Terapiya*. 1981; 4: 3-10. (in Russian)
- Lyabakh E.G. *Oxygen regimes and their regulation in working muscl. [Kislorodnye rezhimy i ikh regulirovanie v rabotayutshey mishtse]*. Ky-

- iv: Institute of Cybernetics of the USSR Academy of Sciences 1990. (in Ukrainian)
3. Rotter E., Groom A. *The Krogh cylinder geometry is not appropriate for modelling O₂ transport in contracting skeletal muscle*. Oxygen Transport to tissue: Proc. 5th Intern. Symp. Detroit-N.Y. 1983: 253-8.
 4. Leonov A.N. *Hyperoxia. Adaptation. Sanogenesis. [Ghiperoxiya. Adaptatsiya. Sanogenes]*. Voronezh: VSMA, 2006. (in Russian)
 5. *Manual of hyperbaric medicine. [Rukovodstvo po giperbaricheskoy meditsine]* (Ed. S.A. Baydin, A.B. Gramenetskiy, B.A. Rubinchik), Moscow: Meditsina, 2008. (in Russian)
 6. Sarkisov D.S. Rubetskiy L.S. *Recovery path cirrhotically changed liver. [Puti vosstanovleniya tsirroticheskoy izmenyonnoy pecheni]*. Moscow: Meditsina, 1965. (in Russian)
 7. Grechin V.V. Study of local blood flow in deep structures and cerebral cortex. In the book "Methods of clinical neurophysiol". [Izucheniye lokal'nogo krovotoka v glubokikh strukturakh golovnogo mozga. V kn. Metody klinicheskoy fiziologii]. Leningrad: Science, 1977: 163-76. (in Russian)
 8. Berezovsky V.A. Oxygen Tension in animal and human tissues. [Napryazheniye kisloroda v tkanyakh zhivotnykh i cheloveka]. Kyiv: Naukova Dumka, 1975. (in Ukrainian)
 9. Prokhonchukov A.A., Loginova N.K., Zhilina N.Ah. Functional diagnostics in dental practice [Funktionalnaya diagnostika v stomatologicheskoy praktike]. Moscow: Meditsina, 1980. (in Russian)
 10. Glantz St.A. *Primer of Biostatistics N.Y.*: McGraw-Hill Inc, 1994.
 11. Ungvary J., Bars T., Hunda P.A. Regeneration of the hepatic arterial system after partial hepatectomy. *Acta. Morf. Hung.* 1977; 23(3-4): 275-82.
 12. Solopaev B.P. *Regeneration of normal and pathologically changed liver. [Regeneratsiya normalnoy i patologicheskoy izmenyonnoy pecheni]*. Gorkiy: Verkhne-Voljskoye isdatelstvo. 1980. (in Russian)
 13. Hunt T.K., Zederfeldt B., Goldstick T.R. Oxygen and healing. *Am. J. Surg.* 1969; 118: 521-5.
 14. Mayansky D.N., Shcherbakov V.I., Kolyaghina T.G. Dependence of monocyte infiltration of the liver from the proliferation of hepatocytes. *Bulleten Eksperimentalnoy Biologii i Meditsiny.* 1984; 5: 621-3. (in Russian)
 15. Niinikoski J., Henghan G., Hunt T.K. Oxygen tensions in human wounds. *J. Surg. Res.* 1972; 12: 77-82.
 16. Savilov P.N. Effect of hyperbaric oxyation on phagocytosis-stimulating function of the operated rat liver. *Obshchaya Reanimatologiya.* 2008; 4(5): 40-4.
 17. Savilov P.N. Hyperbaric oxygen therapy disorders of ammonia neutralization in the operated liver. *Anesteziologya i reanimatologiya.* 1996; 5: 64-7. (in Russian)
 18. Savilov P.N. Effects of hyperoxic aftereffect and the posthyperoxique condition of the body. *Bulleten giperbaricheskoy biologii i meditsiny.* Voronezh, 2006; 14(1-4): 21-51.
 19. Broelch Ch., Hopper J., Kessler M. *Oxygen supply to the cirrhotic Liver following varicus porta caval shunt proceeds*. Oxygen transport tissue III Plenum N.Y. and London, 1977: 633-41.
 20. Ulyamov M.I., Sleta I.V., Stupin I.N. Picture of blood after cryoablation and in experimental liver cirrhosis In the book *Experimental and clinical justification of methods cryomedicine. [Experimentalnoye i klinicheskoye obosnovanie metodov kriomeditsiny]*. Kharkov. 1988: 49-53. (in Ukrainian)
 21. Granov A.A., Maso M.I., Veshetina S.M., Petrovichev N.N. Changes in microcirculation and functional ability of Kupfer liver cells in experimental hepatitis. *Patologicheskaya Fiziologiya I Experimentalnaya Terapiya.* 1977; 1: 29-31. (in Russian)
 22. Koo A., Liang I.S., Cheng K.K. Adrenergie mechanism in the hepatic microcirculation in the rat *Quart. J. Exp. Physiol.* 1977; 62(8): 199-208.
 23. Fisher A. *Physiology and experimental pathology of the liver*. Budapest, 1961. (in Hungary)
 24. Savilov P.N. The impact of liver resection on the nitrogen metabolism of the spleen in chronic tetrachlorcarbon hepatitis. *Biological journal of Armenia.* 2015; 67(4): 58-64.
 25. Savilov P. N. State ammonium-detoxications function of liver in chronic active hepatitis *Patologicheskaya Fiziologiya I Experimentalnaya Terapiya.* 2004; 1: 24-6. (in Russian)
 26. Savilov P.N. Influence of partial hepatectomie on liver on ammonium-detoxications function of liver in chronic tetrachlorcarbon hepatitis *Patologicheskaya Fiziologiya I Experimentalnaya Terapiya.* 2017; 61(2): 61-6. (in Russian)
 27. Savilov P.N. Molchanov D.V. Liver resection transforms mechanisms of renalammonia excretion in rats with chronic tetrachlormethane-induced hepatitis *Patologicheskaya Fiziologiya I Experimentalnaya Terapiya.* 2018; 62(3): 72-9. (in Russian)
 28. Savilov P.N., Yakovlev V.N., Leonov A.N. The role of hyperbaric oxygenation in the mechanisms of detoxification of ammonia in liver resection on the background of chronic hepatitis. *Anesteziologya i reanimatologiya.* 1994; 6: 31-4. (in Russian)

Сведения об авторе:

Савилов Павел Николаевич, доктор мед. наук, проф., врач анестезиолог-реаниматолог отделения «анестезиологии- реанимации» ТОГБУЗ «Тамбовская ЦРБ», e-mail: p_savilov@rambler.ru

© Демяшкин Г.А., 2020

УДК 591.463.1

Демяшкин Г.А.

Иммунофенотипическая характеристика сперматогенеза при идиопатической форме мужского бесплодия

ФГБУ «9 Лечебно-диагностический центр» Минобороны России,

119146, г. Москва, Россия, Комсомольский проспект, д. 13а;

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет)

Минздрава России,

119434, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8

За последнее время бесплодие стало одной из распространенных причин для обращения к урологу-андрологу мужчин молодого репродуктивного возраста. Однако без понимания патогенеза нарушения сперматогенеза невозможно проводить диагностику и лечение бесплодия. **Цель исследования** – оценка сперматогенеза при идиопатической форме мужского бесплодия (иммуногистохимический аспект). **Методы.** Проводили анализ биоптатов яичек пациентов ($n=53$) с идиопатическим бесплодием. У всех пациентов оценивали гормональный статус, анализировали спермограммы, проводили цитогенетическую и молекулярно-генетическую диагностику (исследование кариотипа, анализ крови на наличие микроделеций AZF локуса Y-хромосомы). Биоптаты яичек мужчин с бесплодием (возраст 22 – 35 лет, $n=10$) и в качестве морфологического контроля аутопсийный материал семенников мужчин 22 – 35 лет ($n=10$, в анамнезе 1-2 деторождения) изучали иммуногистохимическим методом. Использовали первичные антитела Ki-67, Bcl-2, p53, caspase-9, PLAP, CD117, IGF-I, VEGF-A. **Результаты.** Показано, что при бесплодии митотическая активность сперматогоний была ниже ($12.0\pm 0.1\%$), чем в норме ($42.0\pm 0.34\%$) на фоне повышения активности каспазы-9 при фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома ($72.0\pm 0.41\%$) по сравнению с нормальным сперматогенезом ($39.5\pm 0.33\%$). При бесплодии уровни проапоптотических белков (p53) были выше ($40,0\pm 0.44\%$), чем антиапоптотических (Bcl-2) – $1.0\pm 0.1\%$. Факторы дифференцировки гамет (CD117) при бесплодии не обнаружены, в отличие от PLAP ($10.2\pm 0.13\%$). При гипосперматогенезе отмечалось снижение в 8,8 раза интенсивности окрашивания на IGF-I в сперматогониях ($7.0\pm 0.22\%$). При бесплодии было выявлено снижение уровней VEGF, что опосредованно приводит к активации проапоптотических факторов. **Заключение.** Комплексный анализ патологического сперматогенеза и его микроокружения при идиопатической форме мужского бесплодия может свидетельствовать о персонифицированных нарушениях чувствительности и специфичности половых клеток к биологически активным веществам, обеспечивающим их пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Морфологический анализ биоптатов яичек с использованием иммуногистохимических методов является одним из необходимых исследований в алгоритме диагностики и прогноза мужского бесплодия.

Ключевые слова: сперматогенез; пролиферация; апоптоз; факторы роста; мужское бесплодие.

Для цитирования: Демяшкин Г.А. Иммунофенотипическая характеристика сперматогенеза при идиопатической форме мужского бесплодия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 63-73.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.63-73

Для корреспонденции: Демяшкин Григорий Александрович, e-mail: doc.dga76@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 10.08.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Demyashkin G.A.

Immunophenotypic characteristics of spermatogenesis in idiopathic male infertility

The 9th Therapeutic and Diagnostic Center of the Ministry of Defense of the Russian Federation,

Komsomolsky Prospekt 13a, Moscow 119146, Russia,

Department of Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,

Trubetskaya Str. 8, Moscow 119048, Russia

In recent years, infertility has become a common complaint of approximately 8% of men of young, reproductive age in the everyday practice of urologists/andrologists. However, diagnostics and treatment of infertility are impossible without understanding the pathogenesis of spermatogenesis disorder. **Aim:** Evaluating the immunohistochemical aspect of spermatogenesis in the idiopathic form of male infertility. **Methods:** Analysis of testicular biopsy samples from patients aged 22-35 ($n=53$) with idiopathic

male infertility. Evaluation of the hormonal status, analysis of spermogram, and pathogenetic and molecular genetic diagnostics (karyotype study and a blood test for the presence of microdeletions in the Y-chromosome AZF locus) were performed for all patients. Testicular biopsy samples from men with infertility and autoptical testicular samples from men aged 22-35 (n=10, 1-2 children in history) as a morphological control were studied using an immunohistochemical method. Primary antibodies to Ki-67, p53, Bcl-2, caspase-9, CD117, PLAP, IGF-I, and VEGF-A were used. **Results.** Mitotic activity of spermatogonia in infertility ($12.0 \pm 0.1\%$) was lower than normal ($42.0 \pm 0.34\%$), which was associated with increased activity of caspase-9 in the focal variant of Sertoli-cell-only syndrome ($72.0 \pm 0.41\%$) compared to normal spermatogenesis ($39.5 \pm 0.33\%$). In infertility, levels of proapoptotic proteins (p53) were considerably higher ($40.0 \pm 0.44\%$) than levels of anti-apoptotic proteins (Bcl-2), 1.0 ± 0.1 . Factors of gamete differentiation (CD117) were not detected in infertility while PLAP was ($10.2 \pm 0.13\%$). In hypospermatogenesis, the IGF-I staining in spermatogonia was decreased 8.8 times ($7.0 \pm 0.22\%$). Infertility was associated with decreased levels of VEGF, which indirectly results in activation of proapoptotic factors. **Conclusion.** The comprehensive analysis of pathological spermatogenesis in idiopathic male infertility suggested individual impairment of sensitivity and specificity of germ cells to biologically active substances, which provide their proliferation, differentiation, and apoptosis. The immunohistochemical morphological study of testicular biopsy samples is a required test in the diagnostic algorithm for male infertility.

Keywords: spermatogenesis; proliferation; apoptosis; growth factors; male infertility.

For citation: Demyashkin G.A. Immunophenotypic characteristics of spermatogenesis in idiopathic male infertility. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 63-73. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02. 63-73

For correspondence: Grigory Demyashkin, PhD, MD; histologist-embryologist, pathologist; ass. professor of the Department of Pathology of the Sechenov University (Moscow, Russia); member of the European Association of Urology, Section of Andrological Urology (ESAU). E-mail: doc.dga76@gmail.com

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about the author:

Demyashkin G., <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

Received 10.08.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Введение

3 последнее время бесплодие стало одной из распространенных причин обращения к урологу-андрологу. Эпидемиология затрагивает около 8% мужчин зрелого репродуктивного возраста (20 – 40 лет) и только у 10% из них удается достичь полного излечения. При этом, следует учитывать факторы риска: возраст (>45 лет), отягощенный урогенитальный анамнез, рак, крипторхизм, врикоцеле, орхит, воздействие гондотоксинов, генитальные инфекции и др. (табл. 1) [1, 2].

Существенно недавно были достигнуты значительные успехи в диагностике и лечении некоторых форм мужского бесплодия. Генетические тесты позволили правильно классифицировать случаи необструктивной зооспермии (НОА), которые ранее считались идиопатическими. Микрохирургические вмешательства увеличили положительные показатели успешного восстановления репродуктивной функции мужчин (TESE, MESE, ICSI и др.). С появлением микроинипуляций с мужскими гаметами ранее считавшихся бесплодными мужчин, с тяжелой олигозооспермией или зооспермией, появились шансы на отцовство.

Уролог-андролог отвечает за диагностику, консультации и лечение основной причины бесплодия. Однако только совместная работа андрологов с генетиками и морфологами позволяет достичь максимально положительного результата.

Морфологическая картина в поврежденном яичке при идиопатической форме мужского бесплодия чаще предстает Сертולי-клеточным синдромом (СКС) [3, 4]. Характерной гистопатологической особенностью СКС является отсутствие половых клеток в извитых семенных канальцах [3, 4]. Многие из этих пациентов с нормальным кариотипом и вторичными мужскими половыми признаками по данным спермограммы (зооспермия или тяжелая форма олигозооспермии) оказываются бесплодными. В последние десятилетия минувшего века в андрологическую практику был введен интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов (ИКСИ, ICSI), которая сделала возможным применение биопсии яичек, превратив ее в терапевтическую, а также диагностическую процедуру. Тем самым были обнаружены новые гистопатологические признаки у мужчин с СКС, коррелирующие с успеш-

ными процедурами ИКСИ. Главным образом, это касается обструктивных факторов: стерилизованных семенных канальцев, содержащих единичные созревающие половые клетки (смешанная тестикулярная атрофия). Однако, по-прежнему, недостаточно изучены внутриорганные механизмы патогенеза идиопатической формы мужского бесплодия, особенно протективные нарушения сперматогенеза (табл. 2). В контексте обозначенной проблемы в значительной мере отводится изучению белков-регуляторов в развитии Сертоли-клеточного синдрома и его форм. Необходимо также прогнозировать возможные осложнения, вплоть до мелигнизации, при этом ключевую роль принадлежит иммуногистохимическому анализу [4].

Цель исследования – оценка сперматогенеза при идиопатической форме мужского бесплодия (иммуногистохимический спектр).

Методика

Ретроспективное исследование проводили в Национальном клиническом центре ОАО «РЖД» и в клинике патологической анатомии им. академика А.И. Струков Сеченовского университета (май 2015 – январь 2017 г.).

Пациенты и материалы. В качестве материала для исследования в работе использовались биопсийный мате-

риал яичек мужчин, страдающих идиопатическим бесплодием (клинически подтвержденная необструктивная азооспермия). Для морфологического контро-

Таблица 1

Нозологические категории в группе мужского бесплодия

категория	количество	%
Вярикоцеле	629	26.4
Инфекции	72	3.0
Гормональные нарушения	54	2.3
Эякуляторная дисфункция	28	1.2
Системные заболевания	11	0.4
Идиопатическая форма	289	12.1
Иммунологические нарушения	54	2.3
Обструкция семявыносящих путей	359	15.1
Крипторхизм (орхит)	11	0.5
Крипторхизм	342	14.3
Генетические нарушения	189	7.9
Тестикулярная дисфункция	345	14.5
ВСЕГО:	2,383	100.0

Таблица 2

Белки-регуляторы сперматогенеза (протективники сперматогенеза)

Коллаген IV	Виментин	Ингибин	IGF
Коллаген II	Ингибин	Активин	FGF
Лейдин	Факторы роста	Фолликулостимулирующий	EGF
Фибулины	Колретинин		TGF α/β
	Фактор стволовой клетки	Другие химические группы:	NGF
	Цитокины	PLAP (97%)*	VEGF
	Факторы сертолиевых коммуникаций	ОСТ 3/4*	HepGF
	Множественный 6-фосфорный (рецептор)	CD 117*	Антимюллеров гормон
	Цистатины	SALL 4*	
	WT1*	MAGE-A	
	CD10*	VASA	
	CD99*	GAGE	
	AE1 – AE3*		
	SMA*		
	CAM5,2*		
клетки Лейдига и перитубулярные клетки		Inhibin* ; CD99*; CD10*; AE1 – AE3*; CAM5,2*; SMA*	
Маркеры (другие)		PAS; p-53; ki-67, bcl	

Примечание. * – маркеры иммуногистотипирования.

ля были исследованы уопт ты норм льных яичек без м крокопических призна ков н личия/отсутствия восп лительного и/или опухолевого процесс . М тери л для исследов ния получ ли не позднее 6 ч после конст т ции биологической смерти.

Р бот выполнен в двух групп х: 1-я – (утопсийный м тери л, $n=10$) групп с условным контролем физиологического течения сперм тогенез , в семейном н мнеше – одно и более деторождений, мужчины 22–35 лет; 2-я – мужчины 22 – 35 лет с верифициров нной идиоп тической зооспермией ($n=53$ биопт т), бесплодие в бр ке более 2 лет.

Все обследуемые п циенты д в ли письменное информиров нное согл сие н исследов ние. Критерии исключения из исследов ния – отягощённый лек р ственный н мнеше ($n=8$); ндрогены или нти-эстрогены ($n=4$), гипогон дотропный гипогон дизм ($n=9$), системные з болов ния ($n=11$), хромосомные тр нс локации ($n=4$).

Физик льные д нные. Все п циенты, стр д ющие бесплодием, были сом тически здоровыми, без вредных привычек молодыми людьми в возр сте 22 – 35 лет;; инфекционные з болов ния, влияющие н сперм тогенез (в том числе, эпидемический п ротит в н мнеше), т кже врожденные ном лии р звития яичек у п циентов отсутствов ли.

Гормон льный ст тус мужчин, стр д ющих бесплодием. Кровь для н лиз бр ли строго н тощ к из локтевой вены. Количественное содерж ние гормонов определяли после тестиров ния по методик м, утвержденным для д нной биохимической л бор тории протокол м. У всех мужчин уровни ФСГ, ЛГ гормонов и тестостерон в сыворотке крови были в предел х возр стной физиологической нормы.

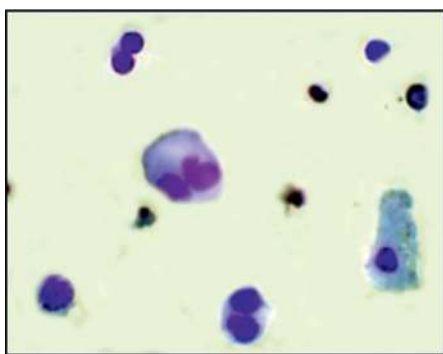


Рис. 1. Яичко (в норме).

Отпечаток, окраска по G. Giemsa. Увеличение $\times 400$. Половые клетки на разных стадиях сперматогенеза, справа – клетка Сертоли.

Спермогр мм . Пок з тели эякулят оценив ли согл сно протоколу Всемирной орг низ ции здр воох р нения [5]. В группе с норм льным сперм тогенезом (1) для верифик ции мужских половых клеток (идентифик ции ст дий мейоз) и клеток Сертоли в изви тых семенных к н лъц х использов ли метод цитологических отпеч тков (**рис. 1**)

Л бор торн я цитогенетическ я и молекулярно-генетическ я ди гностик (исследов ние к риотип , н лиз крови н н личие микроделений AZF локус Y-хромосомы). К риотип: 46, XY; Y-микроделении отсутствуют.

Тестикулярн я оценк (биопсия). Биопсия яичк был выполнен с целью выявления причины зооспермии, определения степени пор жения сперм тогенез и исключения обструкции выводящих семенных протоков. Биопт ты оценив ли с использов нием критериев S. Johnsen, J. Aafjes и со вт. и Г.А. Демяшкин [3, 4].

Морфологическое исследование

Для гистологического исследов ния биопт тов и утопт тов яичек использов ли ст нд ртный метод (фикс ция форм лином, з ливк в п р фин, окр ск гем токсилином и эозином).

Иммуногистохимический метод (ИГХ). После деп р финиз ции и регидр т ции п р финовых срезов проводили ИГХ-исследов ние по ст нд ртному протоколу в втом тическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max («Leica», Герм ния). Используемые первичные н тител , их р зведение и фирм производитель предст влены в **табл. 3**. Вторичные н тител – универ сальные (HiDef Detectiontm HRP Polymer system, «Cell Marque», США), позволяющие выявлять мышинные и кроличьи первичные н тител , конъюгиров нные с ферментным комплексом н основе пероксид зы хрен . Результ ты иммуногистохимических ре кций оценив ли количественными и полуколичественными метод ми. Ядр клеток докр шив ли гем токсилином М йер ; срезы промыв ли под проточной водой; дегидр тиров ли и з ключ ли в б лъз м.

Учитыв я специфику исследуемого объект (яички), где половые клетки при световой микроскопии «перекрывают» друг друг , т кже особенность р с-пределения внутриклеточных белков проводили подсчёт числ иммунопозитивных клеток. Подсчет (в%) проводили в 100 клетк х в 10 полях зрения светового микроскоп (при увеличении объектив $\times 40$). Оценив ли степень экспрессии (в б лл х, ve +/-) [4, 6]. Ан лиз утопсийного и биопсийного м тери лов выполняли с помощью светооптического микроскоп «Carl

Zeiss Lab.A1» (Carl Zeiss, Германия), совмещённого с видеокamerой «AxioCam ERc5s» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и программным обеспечением ZEN Lite.

Статистический анализ. Полученные в результате подсчёта данные образцы были использованы компьютерной программой SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). Оценено соответствие полученных результатов нормальному распределению с применением критерия Колмогорова – Смирнов. При статистической обработке для оценки значимости различий между группами использованы непараметрические критерии: U-критерий Манна –

Уитни, H-критерий Краскелла – Уоллеса. При отсутствии нормального распределения данных использован непараметрический критерий F. Wilcoxon (Statistical methods for research workers) с уровнем значимости $p < 0.05$.

Результаты

Микроскопическое описание яичек мужчин 1-й группы (с нормальным сперматогенезом). Стенки семенных канальцев образованы клетками Сертоли и половыми клетками, находящимися на различных стадиях сперматогенеза. Во всех исследуемых образцах выявляются морфологические признаки нормального сперм-

Таблица 3

Характеристики первичных антител, используемых для иммуногистохимического исследования

Антитело (фирменное название)	Исходитель (фирма)	Специфичность и характеристики
БЕЛКИ – МАРКЕРЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА КЛЕТКИ		
Mouse Monoclonal Antibody Ki-67 Antigen	Clone MM1 IgG1 Novocastra™ 1:100	Ядерный антиген; выявляется во всех пролиферирующих клетках в G1 (поздней), S, M и G2 фазах клеточного цикла
Mouse Monoclonal Antibody p53 Protein	Clone DO-7 IgG2b Novocastra™ 1:100	Ядерный антиген; определяется при остром повреждении генома в точке G1 – клеточный рост и целостность повреждённой ДНК до деления клетки или репарация в клетке механизмом апоптоза.
Mouse Monoclonal Antibody Bcl-2 Oncoprotein	Clone bcl-2/100/D5 IgG1 Novocastra™ 1:100	Цитоплазматический антиген; белок внутренней митохондриальной мембраны, который действует в качестве ингибитора апоптоза.
Rabbit polyclonal Antibody caspasa-9	IgG Abcam 1:100	Цитоплазматический антиген внутреннего пути апоптоза; активирует гибель ядра и протеолитические процессы в клетке.
ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ (МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК)		
Primary Antibody Placental alkaline phosphatase (PLAP)	Clone 8A9 IgG1 Bond™ 1:100	Цитолеммальный антиген; в норме – визуализируется в мембране синцитиотрофобластического ворсинчатого хориона и плаценте и в гонадотрофобластах/гоноциитах.
Mouse Monoclonal Antibody c-kit Oncoprotein (CD117)	Clone T595 IgG1 Novocastra™ 1:100	Цитоплазматический стволовой антиген; в норме – обнаруживается в гонадотрофобластах/гоноциитах, тучных клетках, меланоцитах и эпителии молочной железы. Служебные окисленные тучные клетки выявлены в собирательных трубочках почек, иногда в эпителии предстательной железы и в коллоиде щитовидной и паращитовидных желез.
ФАКТОРЫ РОСТА		
Rabbit polyclonal Antibody Insulin-like Growth Factors-I	IgG1 Santa Cruz Biotechnology 1:100	Цитоплазматический антиген; способствует пролиферативной митотической активности клеток; утробный/предварительный стимулятор роста.
Mouse Monoclonal Antibody Vascular Endothelial Growth Factor	Clone pAb IgG1 Novocastra™ 1:100	Цитоплазматический антиген ангиогенный; способствует ангиогенезу – стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов.

тогенез (8 – 10 б ллов по шк ле S. Johnsen). Сперм - тогонии лок лизуются н б з льной мембр не, обр зую б з льные отсеки семенных к н льцев, клетки последующих ст дий – в длюмин льном отсеке, сперм - тозоиды – в просвет х. В большинстве семенных к - н льцев г меты обр зуют отдельную функцион льную «колонку», в которой все они н ходятся н одной из шести ст дий сперм тогенного цикл . Сперм тогонии, которые ещё не вступили в мейоз, несут функцию сперм тогонии льных стволовых клеток (SSC), пополняющих сперм тогонии льный пул (рис. 2, а).

Микроскопическое опис ние яичек мужчин 2-й групп (идиоп тическ я форм бесплодия (n=53)). В 11-и обр р зц х выявлены призн ки гипосперм тогенез (в семенных к н льц х р спол г ются сперм тогонии и р зрушенные первичные сперм тоциты), оценк сперм тогенез по шк ле S. Johnson (JS) – 4 б л ; в 1 – блок созрев ния с фокус ми субтот льной пл зии г мет (единичные сперм тогонии), JS=3 б лл (рис. 2, б); у 12-ти – Сертоли-клеточный синдром, JS=2 б лл ; у 3-х – тубулярн я трофия к н льцев, JS=1 б лл (рис. 2, в). Т кже, во всех исследуемых случ ях выявлен гиперпл зия клеток Лейдиг .

Результ ты иммуногистохимического исследов - ния предст влены в т блиц х 4 и 5, т кже н рис. 3.

Ан лиз м ркеро в клеточного цикл . Белок Ki-67 был обн ружен во всех половых клетк х, к к при норм льном, т к и п тологическом сперм тогенезе. Клетки Сертоли и Лейдиг , миоидные клетки были иммунонег тивны. Индекс пролифер ции (Ki-67) сперм тогоний мужчин 22 – 35 лет контрольной группы р вен $42.0 \pm 0.34\%$, что в 3,5 р з выше чем при идиоп тическом бесплодии ($12.0 \pm 0.1\%$).

Про поптотический индекс (p53) сперм тогоний в контрольной группе ($57.2 \pm 0.66\%$) выше, чему у спер-

м тоцитов I в 2,0 р з ($28.5 \pm 0.5\%$) и в 3,9 р з у сперм тоцитов II ($14.5 \pm 0.33\%$). Количество окр шенных н р53 сперм тогоний при необструктивной зооспермии в 2,6 р з у мужчин 22 – 35 лет выше, чем в контроле.

Степень м ркиров ния н caspase-9, ктив ция которой происходит при ре лиз ции митохондрии льного пути поптоз , в сперм тогониях с норм льным сперм тогенезом н ходится примерно н одном уровне (доля меченых сперм тогоний сост вляет у молодых мужчин – $39.5 \pm 0.33\%$) и снижен при идиоп тической форме мужского бесплодия н ст дии гипосперм тогенез ($22.0 \pm 0.22\%$). При фок льном в ри нте Сертоли-клеточного синдром этот пок з тель сост вляет $72.0 \pm 0.41\%$. Ни в одной из гистологических форм идиоп тического бесплодия в клетк х Лейдиг и в миоидных клетк х caspase-9 не выявлено (ve-). Ан лиз м ркиров ния н Bcl-2 пок зыв ет, что нти поптотическ я ктивность прев лирует в половых клетк х у мужчин 22 – 35 лет ($43.2 \pm 0.44\%$) и пр ктически исчез ет н всех ст диях н рушенного сперм тогенез ($1.0 \pm 0.1\%$).

Учитыв яд нные пролифер ции и поптоз , т кже про- и нти поптотической ктивности сперм тогоний при бесплодии можно говорить о выр женном дисб л нсе – преобл д нии поптоз н д пролифер - цией. При этом причин иницииров ния поптоз в сперм тогониях вероятнее всего связ н с утокринными н рушениями либо повреждениями митохондрий, т кже с возр ст нием уровня окислительного стресс .

Ан лиз ф кторов дифференцировки половых клеток. У мужчин среднего возр ст CD117 выявляется уже в сперм тогониях. Исследуемый м ркёр в сперм тогониях при идиоп тическом бесплодии не выявляется,

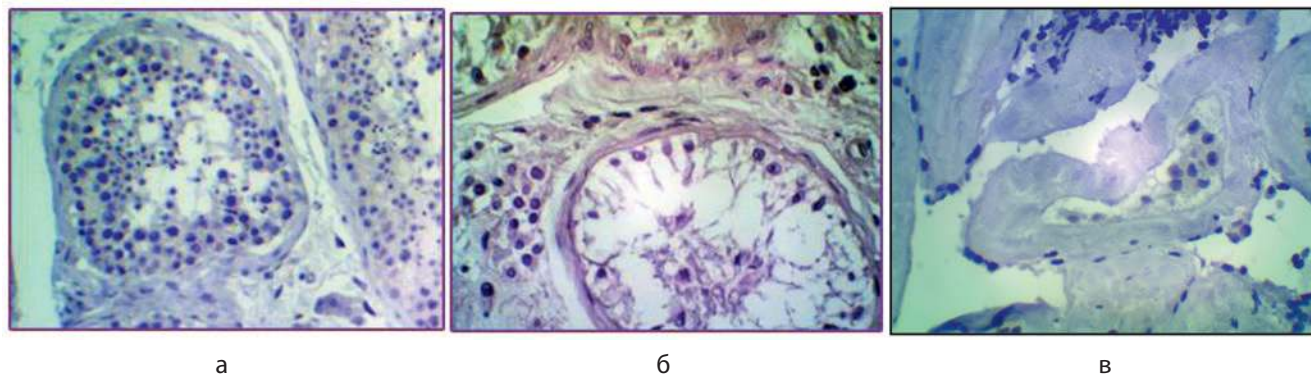


Рис. 2. Семенные каналцы. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение $\times 200$. а – нормальный сперматогенез, б – блок созревания (слущенные единичные сперматогонии, клетки Сертоли), в – СКС и тубулярная атрофия.

то есть, сперматогонияльные клетки (SSC) в семенных канальцах отсутствуют, присутствуют клетки, обладающие унипотентными свойствами и обновляющиеся популяции половых клеток. Один из факторов эмбриональной дифференцировки мужских гамет (PLAP) у мужчин молодого возраста в норме не обнаружен, в то время, как в сохранившихся сперматогониях при гипосперматогенезе отмечается (в $10.2 \pm 0.13\%$) положительная мембранная ИГХ-реакция с антителом к PLAP, что не исключает наличие в семенных канальцах единичных мидифференцированных клеток. А также, учитывая, что PLAP является маркером тестикулярной интродифференциальной неоплазии, нельзя исключить, что бесплодие попадает в группу риска по мелигнизации.

Антифакторов роста. В контрольной группе наиболее ярко экспрессируются половые и в меньшей степени соматические клетки семенных канальцев и их микроокружения. Выявленность иммунологической реакции с антителом к IGF-I в мужских гамет снижается в процессе сперматогенеза: от сперматогоний («ve+/3») до сперматозоидов («ve+/2»). Окружающие IGF-I в половых клетках и клетках Сертоли подтверждают функциональную необходимость данного фактора роста в региональном механизме ауто- и паракринной регуляции текущих процессов в яичке и семенных канальцах в частности. Отсутствие специфического маркирования стромальных компонентов свидетельствует о её вспомогательной роли в этих процессах. В то время, как при идиопатическом бесплодии отмечается слабое окружение IGF-I в

сперматогониях и снижение его количества в 8,8 раз по сравнению с возрастной группой в контроле. Более вероятно, что существует нарушение паракринной регуляции синтеза инсулиноподобного фактора роста-1 при бесплодии.

В контрольной группе ИГХ-реакцию с антителом к VEGF отметили во всех половых клетках и в различных стадиях сперматогенеза («ve+/2»), также в клетках Сертоли («ve+/1») и Лейдига («ve+/2»). При бесплодии наблюдается следующая ИГХ-реакция: зрелые клетки Сертоли («ve+/2»); цитоплазма некоторых сохранившихся сперматогоний («ve+/1»); клетки Лейдига («ve+/3»). При этом, следует отметить, окружение в многочисленных популяциях клеток Лейдига, которые располагались вблизи кровеносных сосудов и семенных канальцев. Как известно, сосудистый эндотелиальный фактор роста влияет не только между прочими паракринными белками: понижает уровни p-53 и повышает уровни Bcl-2 [7]. При бесплодии нами выявлено снижение показателя VEGF.

Обсуждение

Яички являются уникальным органом. В них заключено колоссальное количество структур, занимающих при этом мизерный объем – множество извитых семенных канальцев (длина одного семенного канальца составляет 80 см, общая – 300 – 400 м). Несмотря на малые размеры органа, яички несут огромную функциональную нагрузку, вырабатывая сперматозоиды количеством до 200 млн в 1 мл (размер одного сперматозоида в пределах 5 мкм без жгутика). При этом жизнен-

Таблица 4

Доля ИГХ-позитивных сперматогоний в семенных канальцах (на исследуемые маркеры) при нормальном сперматогенезе и идиопатическом бесплодии (%)

Антител	нормальный сперматогенез (22 – 35 лет)	идиопатическое бесплодие (22 – 35 лет)		
		гипосперматогенез	блок созревания	фокальный вариант СКС
Ki-67	42.0±0.34	15.0±0.1*	12.0±0.1**	9.0±0.2*
p53	57.2±0.66	40.0±0.44*	64.3±0.39**	72.0±0.41*
Bcl-2	7.5±0.44	1.0±0.1*	0	0
caspase-9	39.5±0.33	22.0±0.22*	64.3±0.39*	72.0±0.41*
PLAP	0	10.2±0.13%*	0	0
CD117	10.0±0.33	0	0	0
IGF-I	39.5±0.33	7.0±0.1*	5.3±0.6*	1.0±0.2*
VEGF-A	34.3±0.21	6.0±0.2*	4.2±0.4*	1.2±0.11*

Примечание. * – статистически значимые различия (при $p < 0.05$) между контрольной группой и группой лиц, страдающих бесплодием.

Иммуногистохимическая характеристика семенных канальцев и их микроокружения в норме и при идиопатическом бесплодии

Белок	Природ клетки	Локализация (target sites)	Функции в сперматогенезе:		Примечание
			в норме	при бесплодии	
Ki-67	половые	ядро; сперматогонии («ve+/3»), первичные сперматоциты («ve+/1»), вторичные сперматоциты («ve+/2»), округлые сперматиды («ve±»)	пролиферация	положительная ИГХ-реакция отмечена в ядрах единичных сперматогоний («ve+/2»)	снижение пролиферации при бесплодии
p53	половые	ядро; сперматогонии («ve+/2»), первичные сперматоциты («ve+/1»), вторичные сперматоциты («ve±»)	поптоз	положительная ИГХ-реакция отмечена в ядрах сперматогоний («ve+/2»); клетки Сертоли («ve+/3»)	увеличение апоптоза при бесплодии
Bcl-2	половые	цитоплазма; единичные сперматогонии («ve±»), первичные сперматоциты («ve+/1»), вторичные сперматоциты («ve+/3»), сперматиды («ve+/2»)	анти-апоптозный (митохондриальный)	сперматогонии («ve-»); зрелые клетки Сертоли («ve+/1») и незрелые клетки Сертоли («ve+/1»)	снижение анти-апоптозной активности при бесплодии
caspase-9	половые	цитоплазма; сперматогонии («ve+/2»), единичные первичные и вторичные сперматоциты и сперматиды («ve+/2»), также клетки Лейдига («ve+/2»)	апоптоз, инициация	ядро сперматогоний при гипосперматогенезе, блоке созревания и при фолликулярном вриенте Сертоли-клеточного синдрома («ve+/3»); клетки Сертоли («ve+/2») – в ядрах клеток Сертоли при клиническом вриенте с переходом в тубулярную трофию	увеличение апоптотической активности при идиопатическом бесплодии
PLAP	половые	только в раннем эмбриогенезе – в единичных сперматогониях («ve+/3»)	дифференцировка	ИГХ-реакция визуализируется в цитолемме сперматогоний («ve+/2») до трети от общего их числа	риск мелигнизации
CD117	половые	цитолемма; в эмбриогенезе – примордиальные, гоноциты («ve+/2») и промежуточные («ve+/2»), фетальные сперматогонии («ve+/1»); у взрослых – единичные сперматогонии («ve+/1»), некоторые первичные сперматоциты («ve+/1»), вторичные сперматоциты («ve+/3»), ранние сперматиды («ve+/2»); единичные клетки Лейдига («ve+/2»)	дифференцировка	ИГХ окрашивание не обнаружено («ve-»)	отсутствие плюрипотентных свойств у половых клеток при бесплодии; увеличение стволовых свойств в гаметных поздних стадиях сперматогенеза
IGF-1	соматическая	цитоплазма; все мужские половые клетки интерстициальной ткани («ve+/2») и соматические клетки интерстициальной ткани («ve+/1»), также эндотелий кровеносных сосудов («ve+/1»)	паракринное воздействие IGF1R и клетки Сертоли, что стимулирует размножение и рост гамет	утокринный митогенный путь с экспрессией IGF-1 в клетках Сертоли; высокий уровень экспрессии в единичных клетках Сертоли («ve+/1») и в цитоплазме некоторых сохранившихся сперматогоний («ve±»)	снижение уровня контролируется связывающими протеинами – рс-сцепление IGFBP3, что снижает рост клеток при бесплодии
VEGF	соматическая	цитоплазма; сперматогонии («ve+/2»), сперматоциты I («ve+/2»); клетки Сертоли («ve+/1»); клетки Лейдига («ve+/2»); эндотелиальные клетки («ve+/3»)	влияние гамет не известно; ангиогенез.	зрелые клетки Сертоли («ve+/2»); цитоплазма некоторых сохранившихся сперматогоний («ve+/1»); клетки Лейдига («ve+/3»)	метастатическое распространение опухоли под влиянием использования анти-VEGF ингибитора

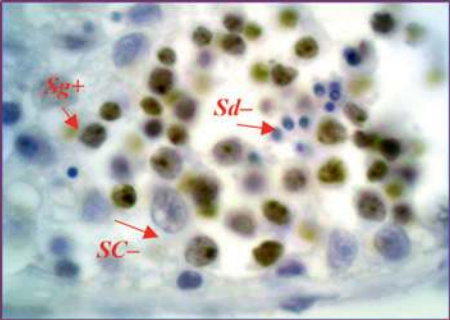
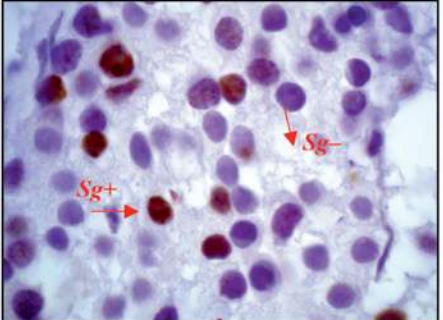
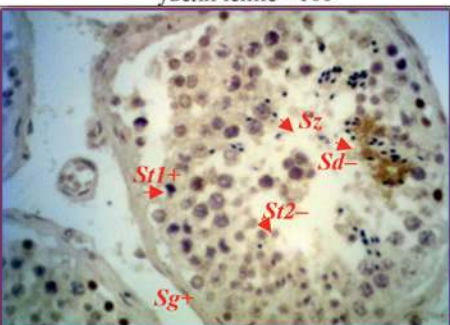
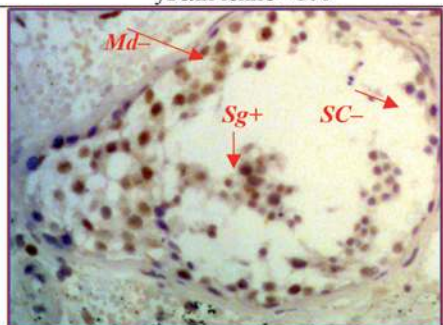
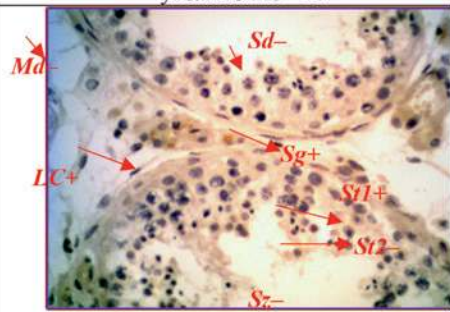
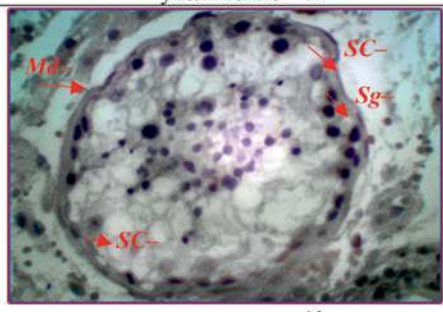
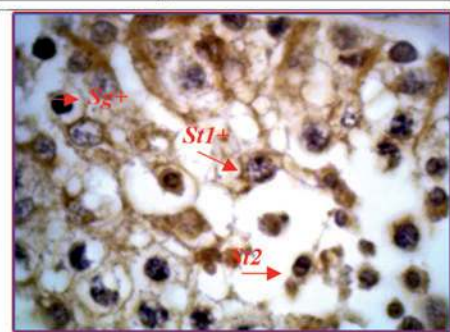
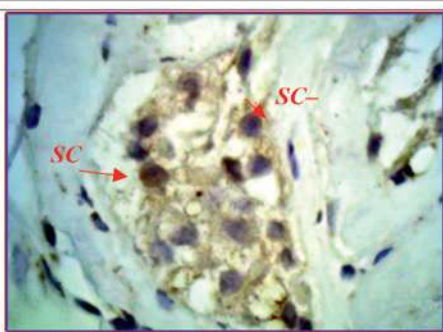
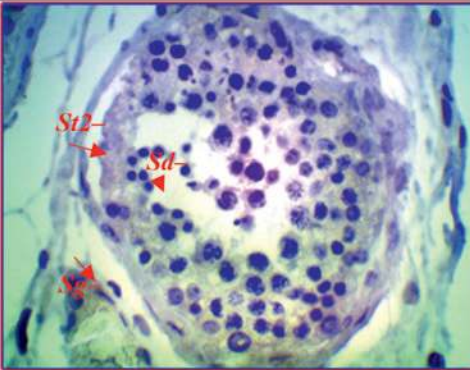
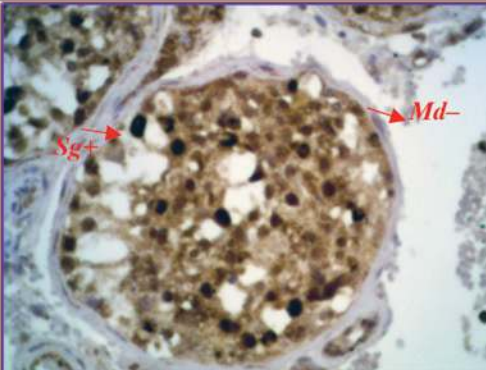
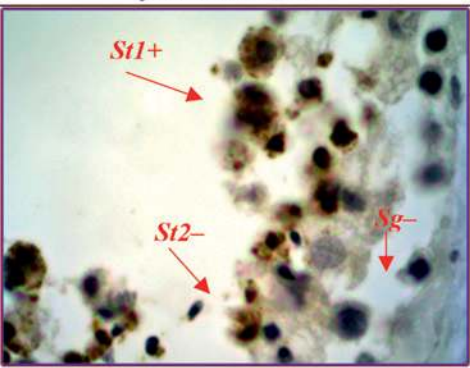
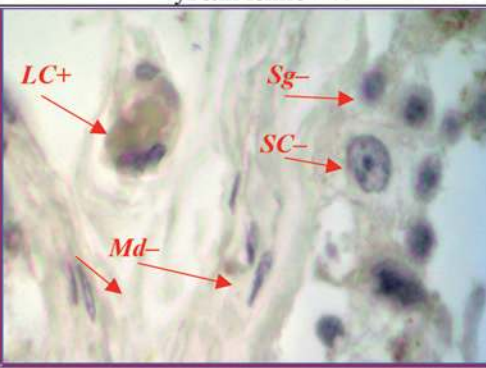
БЕЛКИ	нормальный сперматогенез (мужчины 22 – 35 лет, I группа)	идиопатическое бесплодие (мужчины 22 – 35 лет, II группа)
A – БЕЛКИ-МАРКЕРЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА КЛЕТКИ		
<p>Ki-67 В норме сперматогонии обладают более выраженной митотической активностью по сравнению с идиопатическим бесплодием</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×100</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×100</p>
<p>p53 Индекс готовности к апоптозу сперматогоний в норме выше чем в других гаметах, но в 2,6 раза ниже у лиц, страдающих бесплодием</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×40</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×40</p>
<p>Bcl-2 Показатели антиапоптоза преобладают в половых клетках у мужчин 22 – 35 лет и исчезает при идиопатическом бесплодии</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×40</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×40</p>
<p>caspase-9 в сперматогониях значения маркера иннициации апоптоза повышены при блоке созревания по сравнению с нормой</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×100</p>	 <p style="text-align: center;">SCO-s; увеличение ×100</p>

Рис. 3 А.

Б – ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ (МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК)

<p>PLAP Один из факторов эмбриональной дифференцировки в нормальном сперматогенезе не обнаружен. При бесплодии – $10.2 \pm 0.13\%$ среди сохранившихся сперматогоний</p>	 <p>увеличение $\times 40$</p>	 <p>увеличение $\times 40$</p>
<p>CD117 У молодых мужчин в норме показатели фактора дифференцировки преобладают в сперматогониях, первичных сперматоцитах, а при бесплодии отсутствуют</p>	 <p>увеличение $\times 100$</p>	 <p>увеличение $\times 100$</p>

В – ФАКТОРЫ РОСТА

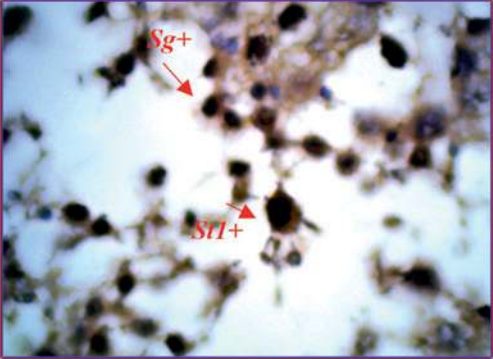
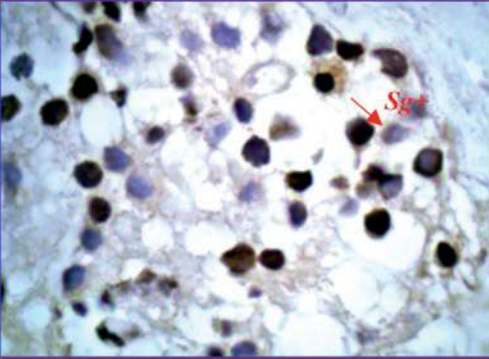
<p>IGF-I При бесплодии отмечается слабое окрашивание в сперматогониях ($7.0 \pm 0.22\%$) по сравнению с таковой возрастной группой в норме ($62.0 \pm 0.33\%$)</p>	 <p>увеличение $\times 100$</p>	 <p>увеличение $\times 100$</p>
---	---	--

Рис. 3. Иммуногистохимическая характеристика семенных канальцев и их микроокружения в норме и при идиопатическом бесплодии.

А – БЕЛКИ – МАРКЕРЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА КЛЕТКИ; Б – ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК; В – ФАКТОРЫ РОСТА.

но в жные процессы в орг не проходят при относительно небольшом количестве соединительной тк ни, тем с мым огр ничив я его з щитные функции. Яички р спол г ются н периферии орг низм , к к бы « втономно». Подобное «отд ленное» р сположение яи-

чек не способствует з щите от химических, биологических и физических (мех нических, температурных), в том числе р ди ционных воздействий [3, 4, 6]. Возможно, поэтому в них сформиров ны плотные волокнистые оболочки (*tunica albuginea*) и многоструктурные гем то-

тестикулярные барьеры. Учитывая вышеперечисленные оргносpezifические особенности, остаётся весьма труднительной диагностика и прогноз к развитию изменений, так и нарушений эндокринной функции сперматогенез (бесплодие).

Преимущество биопсии яичка состоит в том, что исследование неинвазивных половых клеток повышает качество прижизненной диагностики, даёт более объективную морфологическую картину интраорганных молекулярных взаимоотношений и обеспечивает наибольшую информативность, в отличие от аутопсийного материала.

Проведённое ретроспективное исследование выявило выраженный дисбаланс между пролиферацией и апоптозом мужских половых клеток, также возможное нарушение нейроэндокринной регуляции, что является одним из ключевых звеньев патогенеза идиопатической формы мужского бесплодия.

Заключение

Комплексный анализ патологического сперматогенеза и его микроокружения при идиопатической форме мужского бесплодия может свидетельствовать о персонализированных нарушениях чувствительности и специфичности половых клеток к биологически активным веществам, обеспечивающим их пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Морфологическое исследование биоптатов яичек с использованием иммуногистохимических реакций является одним из необходимых пунктов в алгоритме диагностики и прогноз мужского бесплодия.

Литература

1. Esteves S.C., Miyaoka R., Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*. 2011; 66(4): 691-700.

Сведения об авторе:

Демяшкин Григорий Александрович, гистолог-эмбриолог, врач-патолог, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии им. к.д. А.И. Струков Первого МГМУ им. И.М. Сеченов (Сеченовский Университет); член European Association of Urology, Section of Andrological. Urology (ESAU).

2. Божедомов В.А., Громенко Д.С., Ушаков И.В., Тропцев М.В., Галимов Ш.Н., Александров Л.А. и др. Оксидативный стресс сперматозоидов в патогенезе мужского бесплодия. *Урология*. 2009; 2: 51-5.
3. Bostwick D.G. *Urologic Surgical Pathology*, 3rd Edition. 2014; P. 976.
4. Демяшкин Г.А. Апоптоз в семенных канальцах человека в норме и при идиопатическом бесплодии. *Цитология*. 2018; 60(3): 208-18.
5. *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5th edition, Geneva, 2010.
6. Демяшкин Г.А. Пролиферация и апоптоз мужских половых клеток в сперматогенном эпителии в норме и при необструктивной азооспермии. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2016; (2):19-32.
7. Caires K.C., de Avila J., McLean D.J. Vascular endothelial growth factor regulates germ cell survival during establishment of spermatogenesis in the bovine testis. *Reproduction*. 2009; 138: 667-77.

References

1. Esteves S.C., Miyaoka R., Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*. 2011; 66(4): 691-700.
2. Bozhedomov V.A., Gromenko D.S., Ushakova I.V., Troptseva M.V., Galimov Sh.N., Aleksandrova L.A. et al. Oxidative stress sperm in the pathogenesis of male infertility. *Urologiya*. 2009; 2: 51-5. (in Russian)
3. Bostwick D.G. *Urologic Surgical Pathology*, 3rd Edition. 2014; P. 97
4. Demyashkin G.A. Apoptosis in seminiferous tubules of human in normal and in idiopathic infertility. *Tsitologiya*. 2018; 60(3): 208-18. (In Russian)
5. *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5th edition, Geneva, 2010.
6. Demyashkin G.A. Proliferation and apoptosis of male germ cells in the seminiferous epithelium in normal and nonobstructive azoospermia. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny*. 2016; (2):19-32. (In Russian)
7. Caires K.C., de Avila J., McLean D.J. Vascular endothelial growth factor regulates germ cell survival during establishment of spermatogenesis in the bovine testis. *Reproduction*. 2009; 138: 667-77.

© Воронков А.В., Геращенко А.Д., 2020

УДК 611.018.74/547.978.4/615.32

Воронков А.В., Геращенко А.Д.

Эндотелиопротекторные свойства АТАСЛ и катехин гидрата в условиях истощающих нагрузок крыс

Пятигорский медико-фармацевтический институт филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, 357532, г. Пятигорск, Россия, пр. Калинина, д. 11

Цель исследования – изучение эндотелиопротекторных свойств АТАСЛ и катехин гидрата в сравнении с известным лекарственным препаратом Сулодексид в условиях истощающих нагрузок крыс. **Методика.** Истощающие нагрузки воспроизводили методом Порсолта – принудительного плавания животных с нагрузкой до полного истощения и борьбы за жизнь. Эксперименты выполнены на 50 крысах-самцах Wistar (200-220 г), разделенных на 5 групп ($n=10$). Вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга оценивали методом доплерографии с использованием программного комплекса «Minimax Doppler», производства компании «Минимакс» (Санкт-Петербург, Россия). **Результаты.** Показано, что на фоне истощающих нагрузок наблюдалось значительное ухудшение вазодилатирующей и антитромботической функций эндотелия мозговых сосудов, что проявлялось снижением реакции сосудов в ответ на введение анализаторов (АЦХ и L-NAME), развитием «феномена L-аргининового парадокса», повышением как степени, так и агрегационной способности (скорости) тромбоцитов. Исследуемые соединения АТАСЛ и катехин гидрат способствовали коррекции эндотелиальной дисфункции, что выражалось в статистически значимом увеличении скорости кровотока при внутривенном введении АЦХ у животных групп, получавших АТАСЛ на 26,1%, катехин гидрат – на 24,5%, относительно исходной скорости кровотока. АТАСЛ (4-гидрокси-3,5-ди-tert-бутилкоричная кислота) оказывал выраженное влияние на антитромботическую функцию, при этом статистически значимо снижалась степень агрегации тромбоцитов на 99,3% и скорости агрегации – на 136,6%, относительно аналогичных показателей группы крыс негативного контроля. **Заключение.** Соединение АТАСЛ представляет интерес для дальнейшего изучения в качестве актопротекторного средства, обладающего эндотелиопротекторной активностью.

Ключевые слова: 4-гидрокси-3,5-ди-tert-бутилкоричная кислота (АТАСЛ), эндотелиопротекторы; актопротектор; катехин гидрат; истощающие физические нагрузки

Для цитирования: Воронков А.В., Геращенко А.Д. Эндотелиопротекторные свойства АТАСЛ и катехин гидрата в условиях истощающих нагрузок крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 74-79.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.74-79

Для корреспонденции: Геращенко Анастасия Дмитриевна, e-mail: anastasia_gerashchenko@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Воронков А.В., Геращенко А.Д.; сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста – Геращенко А.Д.; редактирование – Воронков А.В.

Поступила 18.10.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Voronkov A.V., Gerashchenko A.D.

Endothelium-protective properties of ATACL and catechin hydrate in exhaustive exercise of rat

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Affiliate of the Volgograd State Medical University, Prospekt Kalinina 11, Pyatigorsk 357532 Russia

Aim. To study possible endothelium-protective properties of catechin hydrate and ATACL in comparison with a well-known drug Sulodexide in exhaustive physical exercise of rats. **Methods.** Exhaustive exercise was produced by forced swimming of rats with a load until exhaustion and struggle for life. Experiments were performed on 50 Wistar male rats (200-220 g) divided into 5 groups ($n=10$ in each group). The endothelial vasodilatory function of cerebral blood vessels was evaluated with the Doppler method using Minimax Doppler equipment and software (Minimax, St. Petersburg, Russia). **Results.** Exhaustive exercise induced a significant impairment of vasodilatory and antithrombotic endothelial functions, which was evident as decreased response of cerebral blood vessels to acetylcholine (ACH) and L-NAME, development of the L-arginine paradox, and increases in both platelet aggregation degree and rate. ATACL (4-hydroxy-3,5-di-tert-butyl cinnamic acid) and catechin hydrate provided correction of the endothelial dysfunction, which was evident from increased blood flow velocity in response to intravenous administration of ACH by 26.1%

in the ATACL group ($p < 0.05$) and by 24.5% in the catechin hydrate group ($p < 0.05$) compared to the baseline blood flow velocity. ATACL exerted a pronounced effect on the endothelial antithrombotic function evident as decreases in aggregation degree by 99.3% ($p < 0.05$) and aggregation rate by 136.6% ($p < 0.05$) compared to the group of negative control. **Conclusion.** ATACL is of interest for further studies as an actoprotector with endothelium-protective activity.

Keywords: 4-hydroxy-3,5-di-tert-butyl cinnamic acid (ATACL); endothelium protectors; actoprotector; catechin hydrate; exhaustive physical exercise

For citation: Voronkov A.V., Gerashchenko A.D. Endothelium-protective properties of ATACL and catechin hydrate in exhaustive exercise of rat. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 74-79. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.74-79

For correspondence: Anastasia D. Gerashchenko; lecture of the department of pharmacology with a course of clinical pharmacology Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –affiliate of the FSBEI HE «The Volgograd State Medical University» Ministry of Health of Russia

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Contribution: the concept and design of the study – Voronkov A.V., Gerashchenko A.D.; collection and processing of material, statistical processing, writing a text – Gerashchenko A.D.; editing – Voronkov A.V.

Information about the authors:

Voronkov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-6638-6223>

Gerashchenko A.D., <https://orcid.org/0000-0003-0294-2926>

Received 18.10.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Введение

Эндотелий сосудов – является уникальным по своей природе и функциям орган ответственный за гомеостаз [1]. Известно, что на фоне истощающих физических нагрузок в организме возникают нарушения в регуляции сердечно-сосудистой системы [2–4], отмечается активация центральной симпатической системы, повышается частота сердечных сокращений, в результате чего ускоряется ламинарный ток крови и возрастает его повреждающее действие на эндотелий сосудов. Особенно страдают участки в местах разветвления сосудистого русла, что провоцирует развитие воспалительного процесса [5].

Развитие эндотелиальной дисфункции [2] в дальнейшем приводит к изменениям реологии крови, ухудшению эндотелий-зависимой дилатации, усугублению процесса воспаления сосудистой стенки и активации апоптоза [6–9]. Все это может способствовать нарушению микроциркуляторного кровотока в скелетной мышце, такого рода изменения снижают функциональный резерв [8, 9]. Поэтому поиск актопротекторных веществ [10 – 13], обладающих эндотелиопротекторным действием [4, 9, 14], является актуальной проблемой спортивной медицины и фармакологии.

Цель исследования – изучение эндотелиопротекторных свойств АТАСЛ и катехин гидрата в сравнении с известным лекарственным препаратом Сулодексид в условиях истощающих нагрузок у крыс.

Методика

Эксперимент выполнен на 50 крысах-самцах Wistar (200–220 г). Было сформировано 5 групп по 10 животных в каждой. Все производимые манипуляции с животными выполнялись в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (GLP) [15] и в соответствии с международными нормами экспериментальной этики (Strasbourg, 22 June, 1998). Работа одобрена этическим комитетом филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ. Крысы содержались в пластиковых клетках при естественном освещении и температуре 20–22 °С, с свободным доступом к корму и воде. Истощающую физическую нагрузку воспроизводили по известной методике – тест Порсолта (тест «отчаяния») в течение 10 сут [16]. Животных группы положительного контроля (ПК) подвергали физическим нагрузкам (ФН) по $n=3$, $n=3$ и $n=4$ животных ежедневно. Крысам экспериментальных групп вводили эндотелийпротекторные средства: 1) АТАСЛ (4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота, 100 мг/кг); 2) катехин гидрат (100 мг/кг) [17]; 3) препарат сравнения Сулодексид (30 единиц высвобождения липопропротеинлипазы – ЕВЛ) [8, 9]. Животных экспериментальных групп подвергали истощающим физическим нагрузкам ежедневно в течение 10 сут Группа негативного контроля (НК, без фармакологической коррекции) получала на всем протяжении эксперимента 0,9% раствор хлористого натрия в эквивалентном количестве. По истечении 10 сут оценивали вазоделяти-

рующую функцию эндотелия сосудов головного мозга методом доплерографии с использованием программного комплекса «Minimax Doppler» (1.7.), производства компании «Минимакс» (Санкт–Петербург, Россия). Оценку гемодинамики производили в проекции средней мозговой артерии в теменной области головного мозга животных. Правую теменную кость животного трепанировали, периодически охлаждая поверхность раствором 0,9% натрия хлорида. В качестве контактной среды использовали гель «Унигель».

Модификацию выброса эндогенного NO осуществляли посредством внутривенного введения соответствующих анализаторов: ацетилхолина (АЦХ), нитро-L-аргинина, метилового эфира (L-NAME) и L-аргинина. Агрегационную активность тромбоцитов оценивали на агрегометре «АЛАТ-2», методом G. Vogt в модификации Габбасова [18].

Для статистической обработки результатов использовали пакет программ «StatPlus 2009». Межгрупповые различия анализировали параметрическими и непараметрическими методами в зависимости от типа распределения. В качестве параметрического критерия использовали критерий Стьюдента, непараметрического – U-критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Влияние изучаемых соединений на скорость кровотока в условиях длительных истощающих физических нагрузок. Группу животных положительного контроля под-

вергали дозированным ФН (без наступления истощения). Исходная скорость кровотока у крыс составляла $4,099 \pm 0,235$ см/с. У крыс, получавших Сулодексид, АТАСЛ и катехин гидрат: $3,892 \pm 0,367$ см/с, $4,217 \pm 0,165$ см/с, $3,953 \pm 0,391$ см/с соответственно. В ответ на введение АЦХ имело место статистически значимое изменение скорости кровотока (СК): в группе крыс положительного контроля на +42%; у животных, получавших Сулодексид, АТАСЛ и катехин гидрат — на +28%, +26,1%, +24,5% соответственно относительно исходного контроля. Введение АЦХ группе крыс НК значительно не изменяло скорость кровотока по отношению к исходным значениям (рис. 1).

Внутривенное введение L-NAME способствовало повышению скорости кровотока в группе ПК на 36,2% относительно исходного значения. На фоне применения Сулодексида, АТАСЛ и катехин гидрата наблюдалось снижение СК на 22,6%, 23,5% и 13,3% относительно первоначальной скорости кровотока у животных получавших соответственно Сулодексид, АТАСЛ и катехин гидрат. В группе животных негативного контроля СК при внутривенном введении L-NAME значительно не изменилась по отношению к первоначальным значениям. При этом реакция сосудов в ответ на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинин метилового эфира у группы животных негативного контроля была слабее, чем в группе крыс положительного контроля на 296,2% и 168,1% соответственно.

В группе ПК на фоне введения L-аргинина СК статистически значимо не изменилась по сравнению

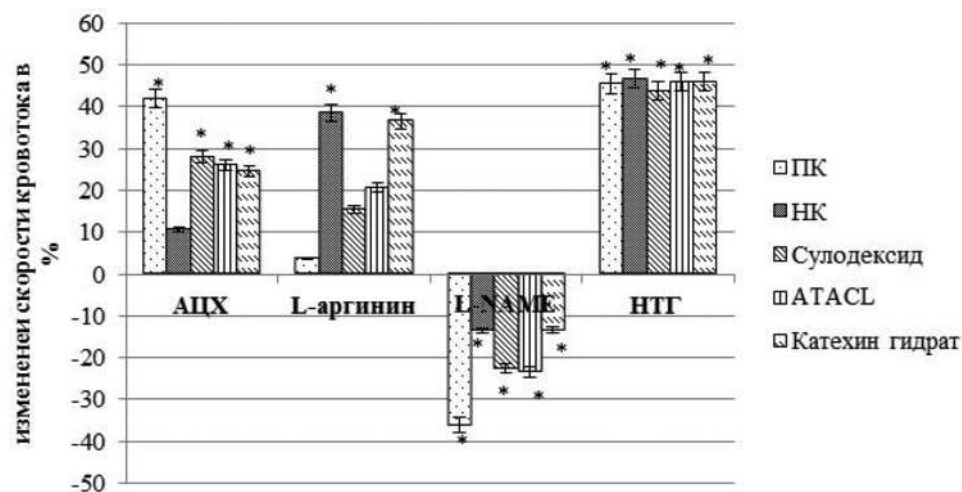


Рис. 1. Влияние АЦХ, L-аргинина, L-NAME, HTG на изменение вазодилатирующей функции эндотелия сосудов крыс в условиях длительных истощающих физических нагрузок. * $p < 0,05$ - статистически значимые различия относительно фоновой скорости кровотока (критерий Крускал–Уоллиса).

с ее фоновым значением, в то время как в группе НК L-аргинин увеличивал СК на 38,5%, что может свидетельствовать о развитии у данной группы крыс «феномена L-аргининового парадокса». При внутривенном введении L-аргинина животным, которым вводили Сулодексид, СК увеличилась лишь на 15,4%, что было на 149,5% меньше аналогичного показателя в группе крыс НК. При введении L-аргинина животным, которые получали соединения АТАСЛ и катехин гидрат, СК увеличилась на 20,6% и на 36,7% соответственно по сравнению с первоначальной скоростью кровотока данных групп крыс.

Стоит отметить, что скорость кровотока при введении НТГ статистически значимо не различалась во всех группах крыс, подверженных длительным истощающим нагрузкам, а также значимо не отличалась от аналогичного показателя группы ПК (рис. 1).

Влияние изучаемых соединений на изменение агрегационной активности тромбоцитов в условиях длительных истощающих физических нагрузок у крыс. У группы животных ПК степень и скорость агрегации тромбоцитов составляли $12,08 \pm 1,18$ и $20,07 \pm 0,43$ отн. ед. соответственно. В условиях истощающих физических нагрузок у группы крыс негативного контроля наблюдалось увеличение степени агрегации и скорости агрегации тромбоцитов относительно группы ПК на 250% и 170,4% соответственно (рис. 2).

Степень агрегации тромбоцитов была ниже, относительно группы НК на 93% на фоне введения Сулодексида, на 99,3% и 80,3% при применении соединения АТАСЛ и катехин гидрата соответственно. Полученные данные свидетельствуют о стойких негативных изменениях в стенках сосудов у животных, что согласуется с данными литературы [14, 19]. Что касается скорости агрегации, она также снижалась у крыс, получавших Сулодексид, относительно аналогичного показателя группы негативного контроля на 165,5%. Это подтверждает полученные нами ранее данные [19]. У крыс, получавших АТАСЛ скорость агрегации снижалась на 136,6%, у крыс, получавших катехин гидрат, на 116,1%.

Заключение

После завершения цикла истощающих нагрузок у крыс развивалась эндотелиальная дисфункция с изменением антитромботического потенциала. Применение АТАСЛ и катехин гидрата способствовало восстановлению эндотелиальной функции у крыс. Наиболее выраженный эндотелиопротекторный эффект наблюдался в группе, получавшей АТАСЛ (100 мг/кг). Результат был сопоставим с аналогичным эффектом препарата Сулодексид. Соединение АТАСЛ представляет интерес для дальнейшего изучения в качестве актопротекторного средства, обладающего эндотелиопротекторной активностью.

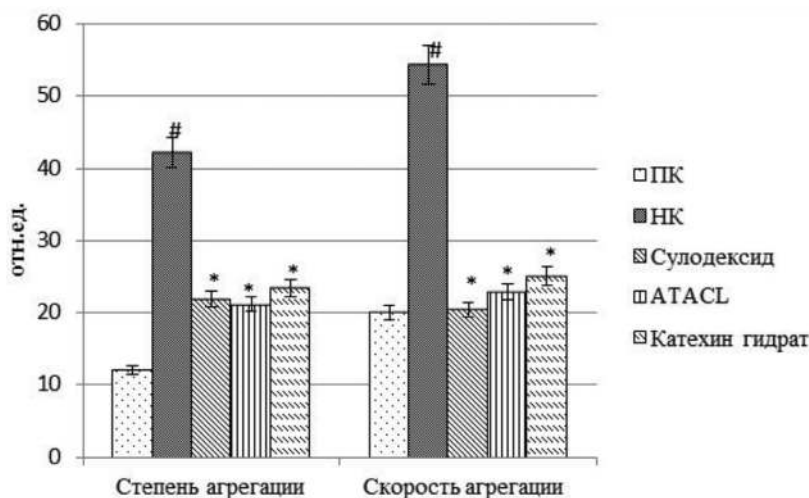


Рис. 2. Влияние АЦХ, L-аргинина, L-NAME, НТГ на изменение агрегационной активности тромбоцитов в условиях длительных истощающих физических нагрузок. # $p < 0,05$ – статистически значимые различия относительно показателей группы животных ПК (критерий Крускала–Уоллиса). * $p < 0,05$ – относительно животных НК группы (критерий Крускала–Уоллиса).

Литература

1. Rajendran P., Rengarajan T., Thangavel J., Nishigaki Y., Sakthisekaran D., Sethi G. et al. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *International Journal of Biological Sciences*. 2013; 9(10): 1057-69.
2. Тюренков И.Н. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008; 71(1): 49-51.
3. Кулининков О.С. *Фармакология спорта в таблицах и схемах*. М.: Советский спорт; 2011: 37.
4. Дзугкоев С.Г., Можаяева И.В., Такоева Е.А., Дзугкоева Ф.С., Маргиева О.И. Механизмы развития эндотелиальной дисфункции и перспективы коррекции. *Фундаментальные исследования*. 2014; 1(4): 198-204.
5. Duerrschmidt N., Stielow C., Muller G., Pagano P.J., Morawietz H. NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells. *J Physiol*. 2006; 15,576(Pt 2): 557-67.
6. Чубуков Ю. А. Фактор Виллебранда и эндотелиальная дисфункция при стрессе. *Проблемы здоровья и экологии*. 2012; 2(32): 40-5.
7. Воронков А.В., Тюренков И.Н., Слиецанс А.А., Муравьева Н.А. Влияние геспередина на скорость восстановления работоспособности и поведенческий статус животных на фоне интенсивных физических и психоэмоциональных нагрузок. *Научные ведомости БелГУ*. 2012; 20(22 (141)): 88-93.
8. Воронков А.В., Муравьева Н.А. Исследование вазодилатирующей функции эндотелия в условиях экстремальных физических и психоэмоциональных нагрузок. *Вестник ВолГМУ*. 2013; 3(47): 100-2.
9. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Рыбалко А.Е. Влияние геспередина и нарингенина на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов на фоне ишемии головного мозга. *Успехи современной науки*. 2016; 2(7): 172-4.
10. Серёгина Е.К., Фатихов И.М., Неволин Ю.С. Оценка фармакологической активности новых фармацевтических композиций, содержащих адаптогены, в условиях эксперимента. *Биомедицина*. 2011; 1(4): 126-8.
11. Студенцов Е.П., Рамш С.М., Казурова Н.Г., Непорожнева О.В., Гарабаджиу А.В., Кочина Т.А. и др. Адаптогены и родственные группы лекарственных препаратов-50 лет поисков. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2013; 11(4): 3-43.
12. Малахов В. А. Актопротекторы. *Новости медицины и фармации*. 2011; 1: 39-42.
13. Oliynyk S., Oh S. Actoprotective effect of ginseng: improving mental and physical performance. *Journal of Ginseng Research*. 2013; 37(2): 144-66.
14. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Мамлеев А.В. Нарингин и апи-генин улучшают вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга экспериментальных животных на фоне его фокальной ишемии. *Вестник ВолГМУ*. 2016; 2(58): 111-4.
15. Миронов А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть первая: М.: Гриф и К. 2012.
16. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. *Europ. J Pharmacol*. 1978; 47: 379-91.
17. Воронков А. В., Абаев В. Т., Оганесян Э. Т., Поздняков Д.И. Изучение влияния субстанции АТАСЛ на физическое и психическое состояние животных в условиях длительных истощающих нагрузок. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 3: 628-35.
18. Габбасов З. А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. *Лабораторное дело*; 1989; 10: 15-18.
19. Воронков А.В., Геращенко А.Д., Воронкова М.П. Изучение вазодилатирующей и антитромботической функции комбинации соединений (atacl+катехин гидрат) на фоне истощающих физических нагрузок крыс. *Дневник казанской медицинской школы*. 2019; 1(23): 7-10.

References

1. Rajendran P., Rengarajan T., Thangavel J., et al. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *International Journal of Biological Sciences*. 2013; 9(10): 1057-69.
2. Tyurenkov I.N. Methodical approach to the assessment of endothelial dysfunction in the experiment. *Ekspieriment'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2008; 71(1): 49-51. (In Russian)
3. Kulinenkov O.S. *Sports pharmacology in tables and diagrams. [Farmakologiya sporta v tablitsakh i skhemakh]*. Moscow: Sovetskiy sport. 2011: 37. (In Russian)
4. Dzugkoev S.G, Mozhaeva I.W, Takoyev E.A, Dzugkoeva F.S, Margieva O.I. Mechanisms of development of endothelial dysfunction and prospects for correction. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 1(4): 198-204. (In Russian)
5. Duerrschmidt N., Stielow C., Muller G., Pagano P.J., Morawietz H. NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells. *J Physiol*. 2006; 15,576(Pt 2): 557-67.
6. Chubukov J.A. Willebrand factor and endothelial dysfunction under stress. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2012; 2(32): 40-5. (In Russian)
7. Voronkov A.V., Tyurenkov I.N., Slyetsans A.A., Muravyova N.A. The influence of hesperidin on the speed of recovery and the behavioral status of animals against the background of intense physical and psycho-emotional stress. *Nauchnye vedomosti BelGU*. 2012; 22(141): 88-93. (In Russian)
8. Voronkov A.V., Muravyova N.A. Study of the vasodilating function of the endothelium under conditions of extreme physical and psycho-emotional stress. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* 2013; 3(47): 100-2. (In Russian)
9. Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Rybalko A.E. Vliyanie gesperetina i naringenina na vazodilatorushchuyu funkciyu endoteliya sosudov na fone ishemii golovnoogo mozga. *Uspekhi sovremennoy nauki*. 2016; 2(7): 172-4. (In Russian)
10. Seregina E.K, Fatihov I.M, Nevolin Yu. S. Evaluation of new pharmacological activity of a pharmaceutical composition comprising an adaptogen, in the experiment. *Biomeditsina*. 2011; 1(4): 126-8. (In Russian)
11. Studentsov E.P., Ramsh S.M., Kazurova N.G., Neporozhneva O.V., Garabadzhiu A.V., Kochina T.A. et al. Adaptogens and related groups of drugs - 50 years of searching. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2013; 11(4): 3-43. (In Russian)
12. Malakhov V.A., Romeshvili E.S. Actoprotectors. *Novosti meditsiny i farmatsii*. 2011; 1: 39-42. (In Russian)
13. Oliynyk S., Oh S. Actoprotective effect of ginseng: improving mental and physical performance. *Journal of Ginseng Research*. 2013; 37(2): 144-66.
14. Voronkov A.V. Pozdnyakov D.I., Mamleev A.V. Narinigin and apigenin improve the vasodilating function of the endothelium of the cerebral vessels of experimental animals against the background of its

- focal ischemia. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2016; 2(58): 111-4. (In Russian)
15. Mironov A.N. *Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. Chast' pervaya: Moskva. Grif i K. 2012: 15. (In Russian)
 16. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. *Europ. J Pharmacol.* 1978; 47: 379-91.
 17. Voronkov A.V., Abaev V.T., Oganessian E.T., Pozdnyakov D.I. The study of the effect of ATACL substance on the physical and mental state of animals in conditions of prolonged exhausting loads. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 3: 628-30. (In Russian)
 18. Gabbasov Z.A. New highly sensitive method for analyzing platelet aggregation. *Laboratornoye delo*. 1989; 10: 15-8. (In Russian)
 19. Voronkov A.V., Gerashchenko A.D., Voronkova M.P. Study of vasodilating and antithrombotic function of a combination of compounds (atacl+catechin hydrate) against the background of debilitating physical exertion in rats. *Dnevnik kazanskoy meditsinskoy shkoly*. 2019; 1(23): 7-10. (In Russian)

Сведения об авторах:

Воронков Андрей Владиславович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. фармакологии с курсом клинической фармакологии;
Герашченко Анастасия Дмитриевна, преподаватель каф. фармакологии с курсом клинической фармакологии, e-mail: anastasia_gerashchenko@mail.ru

Краткие сообщения

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.115.064

Успенская М.С., Ляпина М.Г., Майстренко Е.С.

Гепариноид из корней пиона (*Paeonia anomala*): воздействие на полимеризацию и растворение фибрина при тромбообразовании

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
119234, г. Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1/12

Исследование гепаринов и гепариноидов в качестве антитромботических агентов актуально для физиологии и медицины. Многие растения включают гепариноподобные компоненты (гепариноиды), которые препятствуют тромбообразованию. **Цель** – установление влияния экстракта из корней пиона «Марьин корень» (*Paeonia anomala*), содержащего гепариноид, на полимеризацию фибрина при процессах тромбообразования *ex vivo* и определение возможных механизмов его антитромботического действия. **Методика.** Исследовано влияние гепариноида из пиона (*Paeonia anomala*) на процессы растворения фибрина в условиях тромбообразования *ex vivo*. Разработана модель тромбоза (МТ) *ex vivo*. К плазме крови крыс (объем 0,2 мл) добавляли 2 НИН ед. тромбина (0,05 мл), фибриновый сгусток образовывался в течение 2–3 мин. Экстракт гепариноида из пиона (0,1 мл 0.5%-й) добавляли к преобразованному сгустку через 12 мин после моделирования тромбоза (опыт А), или одновременно с добавлением тромбина к плазме крови (опыт Б). Использовали венозную (из *v. jugularis*) кровь крыс-самцов Wistar. Полимеризацию фибрина выявляли по тесту фибриндеполимеризационной активности (ФДПА) плазмы крови на нестабилизированном фибрине. В продуктах растворения фибрина под влиянием гепариноида оценивали активность тромбина (по тесту тромбинового времени), свертывающего фактора XIIIa (по определению активности фактора XIIIa) и ФДПА. **Результаты.** В опыте А спустя 10 мин после добавления гепариноида к преобразованному сгустку отмечалось появление в нем жидкой фазы, что свидетельствовало о способности исследуемого гепариноида растворять фибрин. В опыте Б сгусток или не образовывался, или же был рыхлым. Полученные данные свидетельствовали об ингибировании процесса полимеризации фибрина под влиянием гепариноида. Выявлены антитромбиновые и антифибринстабилизирующие эффекты гепариноида из пиона при добавлении к фибриновому сгустку. Рассматриваются возможные механизмы действия гепариноида на блокаду полимеризации фибрина. **Заключение.** Растительный гепариноид препятствовал процессам полимеризации фибрина или растворял образующиеся фибриновые сгустки, что связано с его антитромбиновым и антифибринстабилизирующим действием.

Ключевые слова: экстракт пиона; фибринолиз; тромбоз; антикоагулянт; гепариноид.

Для цитирования: Успенская М.С., Ляпина М.Г., Майстренко Е.С. Гепариноид из корней пиона (*Paeonia anomala*): воздействие на полимеризацию и растворение фибрина при тромбообразовании. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 80–84.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.80-84

Для корреспонденции: Ляпина Маргарита Григорьевна, e-mail: lyapinal@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования; сбор и обработка материала – Успенская М.С.; написание текста – Ляпина М.Г.; редактирование – Майстренко Е.С. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Поступила 16.10.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Uspenskaya M.S., Lyapina M.G., Maistrenko E.S.

A heparinoid from peony roots (*Paeonia anomala*): effects on polymerization and dissolution of fibrin in thrombosisSchool of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gory 1/12, Moscow 119234, Russia

Studying heparins and heparinoids as antithrombotic agents is relevant for physiology and medicine. Many plants contain heparin-like components (heparinoids) that prevent thrombosis. **The aim** of the study was to identify effects of a heparinoid obtained from peony (*Maryin* root, *P. anomala*) roots on polymerization of fibrin and fibrinolytic activity of blood plasma and to suggest possible mechanisms of these effects in experimentally induced *ex vivo* thrombosis in rats. **Methods.** The effect of peony (*Paeonia anomala*) root heparinoid on fibrin dissolution was studied in the *ex vivo* conditions of thrombosis. For *ex vivo* modeling of thrombosis (MT), 2 NIH units of thrombin (0.05 ml) were added to 0.2 ml of rat plasma. A fibrin clot formed within 2-3 minutes. The peony heparinoid extract (0.5%, 0.1 ml) was added either to the pre-formed clot at 12 min after MT induction (experiment A) or simultaneously with the addition of thrombin to plasma (experiment B). Jugular vein blood from Wistar male rats was used. Fibrin polymerization was detected using a plasma fibrin-depolymerization activity (FDPA) test on non-stabilized fibrin. Thrombin activity (thrombin time test), coagulation factor XIIIa activity, and FDPA were evaluated in products of fibrin dissolution induced by the heparinoid. **Results.** In experiment A, at 10 min after the addition of heparinoid to the pre-formed clot, a liquid phase emerged, which indicated an ability of the peony heparinoid to dissolve fibrin. In experiment B, the clot either did not form or was liquid. These results indicated inhibition of fibrin polymerization under the action of the heparinoid. Therefore, the peony heparinoid added to the fibrin clot antagonized thrombin and fibrin stabilization. The article addresses possible mechanisms of the heparinoid inhibition of fibrin polymerization. **Conclusion.** The studied plant heparinoid prevented processes of fibrin polymerization or dissolved formed fibrin clots due to depression of thrombin activity and fibrin stabilization.

Keywords: peony extract; fibrinolysis; thrombosis; anticoagulant; heparinoid.**For citation:** Uspenskaya M.S., Lyapina M.G., Maistrenko E.S. A heparinoid from peony roots (*Paeonia anomala*): effects on polymerization and dissolution of fibrin in thrombosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 80-84. (in Russian).**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.02.80-84**For correspondence** Lyapina Margarita Grigoryevna, leading specialist of laboratory of protective systems of blood by named Prof. B.A. Kudryashov, e-mail: lyapinal@mail.ru**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.**Contribution:** the concept and design of the study — Uspenskaya M.S.; collection and processing of material — Uspenskaya M.S.; statistical processing — Maistrenko E.S., Lyapina M.G.; writing a text — Lyapina M.G.; editing — Maistrenko E.S. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article — all authors.**Information about the authors:**Uspenskaya M.S., <https://orcid.org/0000-0002-5368-4026>Lyapina M.G., <https://orcid.org/0000-0001-6039-5161>Maistrenko E.S., <https://orcid.org/0000-0003-3227-1465>

Received 16.10.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Известно, что во многих растениях (бурые морские водоросли, кора березы, разные виды пионов и др.) содержится гепариноподобный сульфатированный гликозаминогликан [1-5]. Механизм антикоагулянтного действия гепариноподобных компонентов растений известен и заключается в ингибировании как фактора Ха, так и тромбина в зависимости от их молекулярной массы [6, 7]. По антикоагулянтному действию в организме компоненты корня пионов (древовидного, молочноцветкового, желтого, «Марьяна корня») подобны низкомолекулярным гепаринам (НМГ) животно-

го или синтетического происхождения [8]. Препараты НМГ сохраняют свое действие в течение 1 сут, не проявляя побочных отрицательных эффектов в виде повышенной кровоточивости. НМГ являются препаратами выбора для профилактики и лечения тромбозов [3]. Применяемый в клинике препарат Сулодексид (СЛД) животного происхождения также включает НМГ, но в отличие от него может вводиться перорально [10]. Установлено, что растения могут служить источником лекарственного сырья не только антикоагулянтов, но и фибринолитиков, и тромболитиков [11-

13]. Ранее было показано, что экстракты из корней пиона «Марьин корень» проявляют антикоагулянтное (по тесту активированного частичного тромбопластинного времени) действие как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, и оказывают гипополипидемическое действие при нарушениях функционирования гемостатической системы и метаболических процессов в организме, в частности, при нарушении жирового обмена [14, 15].

Цель исследования -- установление влияния экстракта из корней пиона «Марьин корень» (*Paeonia anomala*), содержащего гепариноид, на полимеризацию фибрина при процессах тромбообразования *ex vivo* и определение возможных механизмов его антитромботического действия.

Методика

In vitro с помощью коагулологических тестов исследованы растворимые продукты нестабилизированного фибрина, образующиеся под действием экстракта из корней «Марьин корень».

В исследованиях применяли экстракт корней пиона «Марьин корень» (*P. anomala*), содержащий гепариноподобное вещество, наличие которого определяли фотоэлектроколориметрическим методом с использованием Азура А (красителя на гепарин) и протаминсульфата (ингибитора гепарина). Гепариноид в количестве 1,0 мг, растворенный в 0,5 мл физиологического раствора, содержал 30,0 МЕ гепарина (метод В.А. Шестакова и соавт.) [16].

Эксперименты на животных проводили в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, март, 1986), Базельской и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова, биологический факультет. Кровь у животных брали из яремной вены, в качестве консерванта использовали цитрат натрия (3,8%) в соотношении 9:1. Для получения бедной тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали при 3000g в течение 10–12 мин. Разработана модель тромбоза (МТ) *ex vivo*. В пробирки к 0,2 мл плазмы крови крыс добавляли 2 НИН ед. тромбина (0,05 мл), фибриновый сгусток образовывался в течение 2–3 мин. Одновременно с добавлением тромбина (опыт Б) или через 12 мин после добавления тромбина (опыт А) добавляли 0,1 мл 0,2%-ного раствора гепариноида из пиона. Полимеризацию фибрина выявляли по тесту фибриндеполимеризационной активности (ФДПА) плазмы крови на нестабилизиро-

ванном фибрине. Оценивали влияние гепариноида на активность образующихся в условиях *in vitro* продуктов растворения фибрина, в которых измеряли активность тромбина (по тесту тромбинового времени), свертывающего фактора XIIIa (по определению активности фактора XIIIa) и ФДПА [17].

Для характеристики параметров фибринолитического звена противосвертывающей системы (ПСС) крови готовили фибриновые нестабилизированные фактором XIIIa пластины, характеризующиеся наличием водородных связей в растворимом фибрин-полимере. Определяли суммарную фибринолитическую активность (СФА), включающую активность комплексов гепарина с компонентами плазмы крови и активность плазмина, а также ФДПА, отражающую процесс деполимеризации фибрина [17].

Все данные обработаны статистически с помощью пакета программ Statistica7. Использовали непараметрический критерий Вилкоксона и t-критерий Стьюдента.

Результаты

Полученный нами гепариноид, содержащийся в экстракте из корней пиона «Марьин корень», обладал антикоагулянтным действием и антифибринстабилизирующей активностью. По сравнению с контролем гепариноид повышал активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) на 43% (контроль – 100%), и снижал активность фактора XIIIa на 25% (контроль – 100%).

В опыте А, на модели тромбообразования через 10 мин после добавления к преобразованному фибриновому сгустку 0,1 мл 0,2%-го гепариноида, установлено появление жидкой фазы, которую мы анализировали на наличие противосвертывающих свойств. В жидкой фазе содержались продукты растворения фибрина (ПРФ). Контролем служила нормальная плазма крови. ПРФ обладали антитромбиновой активностью (по тесту ТВ) и ФДПА, увеличивая их по сравнению с контролем на 11,1 и 32,0 % соответственно. Кроме того, ПРФ снижали активность фактора XIIIa на 12,0 ед/мл (т.е. на 14,2%) по сравнению с контролем (табл.).

В опыте Б в жидкой фазе, содержащей ПРФ, через 20 мин после образования фибринового сгустка установлено повышение антикоагулянтной активности по тесту ТВ на 36%, ФДПА – на 76% и антифибринстабилизирующей активности на 24% по сравнению с контролем.

Обсуждение

На основании проведенного исследования в жидких фазах, представляющих собой продукты раство-

Таблица

Антитромбиновая, фибриндеполимеризационная и антифибринстабилизирующая активности продуктов растворения фибрина на модели тромбообразования после добавления гепариноида

Условия опытов	Активности продуктов растворения фибрина		
	Тромбиновое время, с (%)	Фибриндеполимеризационная активность, мм ² (%)	Анти свертывающий фактора XIIIa, ед/мл (%)
Опыт А	33,1 ± 0,6 (111,1%)*	15,8 ± 0,9 (132%)**	73,0 ± 5,1 (85,8%)*
Опыт Б	40,8 ± 0,6 (135%)**	21,2 ± 1,1 (176%)**	65,0 ± 3,5 (76%)**
Контроль	30,0 ± 0,4 (100%)	12,0 ± 1,3 (100%)	85,0 ± 5,1 (100%)

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятого за 100%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

рения фибрина под влиянием гепариноида из пиона, было показано повышение фибриндеполимеризующей активности на 32% (опыта А) и 76% (опыт Б) по сравнению с показателями в крови здоровых крыс. Эти эксперименты свидетельствуют, что гепариноид из пиона способен препятствовать процессам тромбообразования, что доказывает опыт Б, когда гепариноид добавляли к плазме крови предварительно до формирования фибринового сгустка. Последующее добавление тромбина в систему уже содержащую гепариноид, предотвращало процессы его полимеризации. Поэтому можно говорить о механизме антиполимеризационного действия гепариноида в процессе полимеризации фибрина, обусловленном, с одной стороны, его ингибированием активности тромбина, участвующего в начальной стадии полимеризации [6], а с другой стороны, о блокаде активности фактора XIII [18], участвующего в заключительной стадии полимеризационного процесса [3, 8]. Впервые выявлено, что при моделировании экспериментального тромбоза *ex vivo* добавление к кровяному сгустку 0,2 мл 0,2%-го гепариноида приводило к возрастанию ФДПА крови.

Анализируя полученные результаты, необходимо также отметить, что экстракт из корней пиона «Марьин корень» оказывает не только антикоагулянтный эффект, подобно гепарину [8], но и особый вид фибринолитического действия – фибриндеполимеризационное. Ранее [1] сообщалось об ограничении взаимодействия тромбина с фибриногеном под влиянием ингибиторов растительного происхождения, что и мы наблюдали в наших исследованиях. Кроме того, мы установили наличие в продуктах растворения фибринового сгустка антифибринстабилизирующей активности, что также обусловлено присутствием гепариноида, который сам по себе обладает свойством снижать активность фактора XIIIa крови.

Экстракт из корней пиона представляет фармакологический интерес в плане его применения для профилактики ряда заболеваний, (в том числе и сердечно-сосудистых), осложняющихся тромбозами.

Заключение

Проведенное исследование доказало ингибирующий полимеризацию фибрина эффект растительного гепариноида из пиона «Марьин корень». Установлена его защитная функция при развитии состояния предтромбоза или тромбоза на модели тромбообразования *ex vivo*. Выявлено, что гепариноид уменьшает активность свертывающих факторов (фермента тромбина, фактора XIIIa, одновременно ограничивая процесс полимеризации фибрина. Раскрыт механизм антиполимеризационного действия гепариноида, который заключается в его способности вмешиваться в процессы полимеризации фибрина, как на начальном, так и на конечном этапе. Гепариноид может обеспечить растворение появляющихся в кровотоке фибриновых сгустков за счет своего прямого действия на полимеризующийся фибрин. Все указанные эффекты растительного гепариноида позволяют говорить об эффективности и перспективности изучения этого агента в целях предупреждения и лечения тромбоэмболических заболеваний и тромботических осложнений.

Литература**(п.п. 3-8; 10-13 см. References)**

1. Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Калинин Е.П., Карпова И.А., Русакова О.А., Самойлов М.А. и др. Ингибиторы самосборки фибрина растительного происхождения. *Медицинская наука и образование Урала*. 2012; 13(1): 163–70.
2. Кузнецова С.А., Дрозд Н.Н., Кузнецов Б.Н., Макаров В.А., Левданский В.А., Мифтаков Н.Т. Антикоагулянтное средство. 2009; Патент № 2399377. Россия.
3. Кричевский Л.А. Низкомолекулярные гепарины в современной системе управления свертываемостью крови. *Анестезиоло-*

- гия и реаниматология. Медицинская реабилитация. 2015; 15(116) – 16(117): 42–8.
14. Ляпина М.Г., Оберган Т.Ю., Ляпина Л.А., Успенская М.С. Способность гепариноида из коры корня пиона предотвращать процессы тромбообразования. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, издательство «Наука» (Спб.)*. 2017; 103(10): 1201-6.
 15. Оберган Т.Ю., Ляпина М.Г., Успенская М.С., Ляпина Л.А. Гиполипидемическое и антитромботическое действие гепариноида из пиона при метаболическом синдроме. *Атеросклероз*. 11(3): 14-20.
 16. Шестаков В.А. Определение концентрации гепарина. *Грудная хирургия*. 1975; 2: 41-4.
 17. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови*. М.: Адвансд Солюшнз. 2012.
 7. Van Montfoort M.L., Meijers J.C. Anticoagulation beyond direct thrombin and factor Xa inhibitors: indications for targeting theintrinsic pathway. *Thromb. Haemost.* 2013; 110(2): 223–32.
 8. Manion JS, Thomason JM, Langston VC, Claude AK, Brooks MB, Mackin AJ, Lunsford KV. Anticoagulant effects of inhaled unfractionated heparin in the dog as determined by partial thromboplastin time and factor Xa activity. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2016; 26(1): 132-6. doi: 10.1111 / vec.12344.
 9. Krichevsky L.A. Low Molecular weight heparins in the modern blood coagulation control system. Anesthesiology and resuscitation. *Medical rehabilitation*. 2015; 15(116) – № 16(117): 42-8. (in Russian)
 10. Milani M. The sulodexide, a Review of new clinical studies. *Online J. Medicine and Medical Science Research*. 2013; Issue 5: 57–61.
 11. Pawlaczyk I., Czerchawski L., Kuliczkowski W., Karolko B., Pilecki W., Witkiewicz W., Gancarz R. Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. *Thromb. Res*. 2011; 127(4): 328–40.
 12. Wu M., Xu L., Zhao L., Xiao C., Gao N., Luo L., et al. Structural analysis and anticoagulant activities of the novel sulfated fucan possessing a regular well-defined repeating unit from sea cucumber. *Mar. Drugs*. 2015; 13(4): 2063–84.
 13. Zhang S.B. In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates. *Food Chem*. 2016; 202: 1-8.
 14. Lyapina M.G., Obergan T.Y., Lyapina L.A., Uspenskaya M.S. The ability heparinoida from the root bark of the peony to prevent the process of thrombosis. *Russian physiological journal. I.M. Sechenov*, 2017; 103(10): 1201-6. (in Russian)
 15. Obergan T.Yu., Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Lyapina L.A. lipid-Lowering and antithrombotic effect of heparinoid from pion in metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2017; 11(3): 14-20. (in Russian)
 16. Shestakov V.A. Determination of heparin concentration. *Thoracic surgery*. 1975; 2: 41-4. (in Russian)
 17. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the functional state of the anticoagulant blood system. [Teoreticheskie i prakticheskie voprosy izucheniya funktsional'nogo sostoyaniya protivosvertvyayushchey sistemy krovi]*. Moscow: Advanced Solutions. 2012. (in Russian)
 18. Adam EH, Kreuer S, Zacharowski K, Weber CF, Wildenauer R. FactorXIII: Pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics. *Anaesthesist*. 2017; 66(1): 52-9. doi: 10.1007 / s00101-016-0249-1
 19. Xiao C., Lian W., Zhou L., Gao N., Xu L., Chen J., et al. Interactions between depolymerized fucosylated glycosaminoglycan and coagulation proteases or inhibitors. *Thromb Res*. 2016; 146: 59–68.

References

1. Byshevsky A.Sh., Galyan S.L., Kalinin E.P., Karpova I.A., Rusakova O.A., Samoilov M.A. et al. Inhibitors of self-Assembly of fibrin of plant origin. *Medical science and education of the Urals*. 2012; 13(1): 163-70. (in Russian)
2. Kuznetsova S.A., Drozd N.N., Kuznetsov B.N., Makarov V.A., Levdansky V.A., Miftakhov N.T. *Anticoagulant remedy*. 2009; Patent No. 2399377. Russia. (in Russian)
3. Arata PX, Quintana I, Raffo MP, Ciancia M. Novel sulfated xylogalactoarabinans from green seaweed *Cladophora falklandica*: Chemical structure and action on the fibrin network. *Carbohydr Polym*. 2016; 154: 139-50. doi: 10.1016 / j.2016.07.088. Epub 2016 Jul 21.
4. Naqash S.Y., Nazeer S.A. Anticoagulant, antiherpetic and antibacterial activities of sulphated polysaccharide from Indian medicinal plant *Tridax procumbens* L. (Asteraceae). *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2011; 165(3–4): 902–12.
5. Stebelski L., Brichant J.F., Pierard L., Peters P. Perioperative management of direct oral anticoagulants: not much evidence but several different approaches. *Rev. Med. Liege*. 2014. 69(12): 671–9.
6. Mourier PA, Guichard OY, Herman F, Sizun P, Viskov C. New Insights in Thrombin Inhibition Structure-Activity Relationships by Characterization of Octadecasaccharides from Low Molecular Weight Heparin. *Molecules*. 2017; 22(3). 8. doi: 10.3390 / molecules 22030428.

Сведения об авторах:

Успенская Марианна Сергеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ботанического сада биологического факультета МГУ, e-mail: ms-uspenskaya@yandex.ru;

Ляпина Маргарита Григорьевна, вед. спец. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; e-mail: lyapinal@mail.ru;

Майстренко Евгения Семеновна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; e-mail: mag238@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

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

О феномене повышенной чувствительности крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, к диабетогенному воздействию суммарной РНК

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

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

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», 17418, г. Москва, Россия, ул. Цюрупы, д. 3

Введение. Как было нами показано ранее, препараты аллогенных суммарных РНК лимфоидных и стволовых клеток способствуют нормализации уровня глюкозы в крови белых беспородных крыс со стойким аллоксановым диабетом. **Цель исследования** – оценка влияния суммарной РНК, выделенной из селезенки крыс с аллоксановым диабетом, на уровень глюкозы в крови интактных крыс и животных, перенесших стойкий аллоксановый диабет. **Методика.** Эксперимент выполнен на 34 белых беспородных крысах-самках массой 250–280 г.: 12 интактных животных составили «интактный контроль». У 22 животных моделировали аллоксановый диабет путем однократного подкожного (п/к) введения полного адьюванта Фрейнда (0,5 мл) и последующего подкожного введения аллоксана тригидрата (200 мг/кг) – группа «аллоксановый диабет». Селезенка 10 крыс группы «аллоксановый диабет» была использована для получения суммарной РНК. У 12 крыс группы «аллоксановый диабет» уровень глюкозы в крови был стабильно нормализован введением суммарной РНК клеток костного мозга, селезенки и поджелудочной железы – группа «перенесшая диабет». На 45-е сут эксперимента 12 крыс группы «интактный контроль» и 12 крыс группы «перенесшей диабет» использованы в новом опыте (по протоколу «2-й этап работы»). У 6 животных группы «интактный контроль» (впервые) и у 6 животных группы «перенесший диабет» (повторно) моделировали аллоксановый диабет путем подкожного введения аллоксана в дозе 100 мг/кг. Оставшимся 6-ти животным группы «интактный контроль» и 6-ти животным группы «перенесших диабет» вводили внутривентриально суммарную РНК (15 мкг/100 г веса тела), выделенную из селезенки 10 крыс группы «аллоксановый диабет». **Результаты.** Показано, что исследуемая суммарная РНК в дозе 15 мкг/100 г массы тела вызывала гипергликемию у всех подопытных животных, сравнимую с действием 600–700-кратной дозы самого аллоксана, при этом крысы, ранее перенесшие диабет, реагировали значительно сильнее. Повторный контакт с аллоксаном у крыс, перенесших ранее диабет, так же вызывал значимо более выраженную гипергликемию, чем реакция на аллоксан у интактных крыс. **Заключение.** Выявлен феномен диабетогенного действия исследуемой суммарной РНК, а также повышенную чувствительность животных, ранее перенесших аллоксановый диабет, к повторному действию повреждающего агента. Полученные эффекты свидетельствуют о принципиальной возможности использовать суммарную РНК лимфоидных клеток для создания моделей заболеваний человека и разработку новых подходов в области персонализированной медицины.

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет; аллоксан; суммарная РНК; лимфоидные клетки; селезенка.

Для цитирования: Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г. О феномене повышенной чувствительности крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, к диабетогенному воздействию суммарной РНК. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020;64(2): 85-88.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.85-88

Для корреспонденции: Геворкян Нина Михайловна, науч. сотр. лаб. биосинтеза белков, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. по теме «Создание клеточных моделей молекулярных процессов в органах и тканях» (НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Геворкян Н.М.; выделение препаратов РНК – Геворкян Н.М.; постановка и проведение экспериментов на животных – Тишевская Н.В.; статистическая обработка полученных данных – Тишевская Н.В.; обсуждение полученных данных, написание текста, редактирование – Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г.

Поступила 24.03.2020

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

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

A phenomenon of hypersensitivity to the diabetogenic effect of total RNA in rats that had alloxan diabetes

¹V. N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry,

Pogodinskaya Str. 10, Moscow 119121, Russia;

²South Ural State Medical University,

Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk 454092, Russia;

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

Introduction. As we have shown earlier, preparations of allogenic total RNA from lymphoid and stem cells contribute to normalization of blood glucose levels in white outbred rats with persistent alloxan-induced diabetes. **The aim** of this study was to evaluate the effect of total RNA from the spleen of rats with alloxan diabetes on blood glucose of intact and post-alloxan diabetic animals. **Method.** Experiments were performed on 34 white outbred female rats weighing 250-280 g. Rats were divided into intact animals (n=12) and rats with experimental alloxan diabetes mellitus (n=22). Diabetes mellitus was modeled by a single subcutaneous (s.c.) injection of complete Freund's adjuvant (0.5 ml) followed by a s.c. injection of alloxan trihydrate (200 mg/kg). Spleens from 10 rats with alloxan diabetes were used for obtaining total RNA. In the remaining 12 rats with alloxan diabetes, the level of blood glucose was completely normalized by administration of total RNA from the bone marrow, spleen, and pancreas (post-diabetes group). On day 45 of this experiment, 12 intact rats and 12 post-diabetes rats were used for a new experiment (second stage protocol). Alloxan diabetes was induced in 6 intact rats (for the first time) and 6 post-diabetes rats (for the second time) by a s.c. injection of alloxan 100 mg/kg. The remaining 6 rats of the intact control group and 6 rats of the post-diabetes group received an injection of total RNA (15 µg/100 g body weight, i.p.). **Results.** Administration of total RNA (15 µg/100 g body weight) induced hyperglycemia in all experimental animals, which was comparable with the effect of a 600-700-fold dose of alloxan. Rats that had previously had diabetes responded to the total RNA significantly stronger. Likewise, a repeated exposure to alloxan of post-diabetes rats induced significantly more pronounced hyperglycemia than the response to alloxan of intact rats. **Conclusions.** This study discovered a phenomenon of hypersensitivity to repeated exposure to alloxan and to the diabetogenic effect of total RNA in animals that had previously had alloxan diabetes. This effect suggests a possibility of using the total RNA of lymphoid cells to create animal models of human diseases and to develop new approaches in personalized medicine.

Key words: experimental diabetes mellitus, alloxan, total RNA, lymphoid cells, spleen

For citation: Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. A phenomenon of hypersensitivity to the diabetogenic effect of total RNA in rats that had alloxan diabetes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 85-88. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.85-88

For correspondence: Nina M. Gevorkyan, Researcher, Laboratory for Protein Biosynthesis of «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya Str., Moscow 119121, Russian Federation, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

Acknowledgments. This work was carried out in the framework of the Program of fundamental scientific research of state academies of sciences for 2013-2020 on the topic "Creation of cellular models of molecular processes in organs and tissues" (V.N. Orekhovich Scientific Research Institute of Biomedical Chemistry).

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

Contribution: research concept and design, isolation of RNA, preparations – Gevorkyan N.M.; setting up and conducting experiments on animals, statistical processing of data – Tishevskaya N.V.; discussion of the data, writing text, editing – Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G.

Information about the authors:

Gevorkyan N.M., <https://orcid.org/0000-0002-0386-4010>Tishevskaya N.V., <https://orcid.org/0000-0002-4912-3111>

Received 24.03.2020

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Введение

Ранее нами было показано, что препараты аллогенных суммарных РНК лимфоидных и стволовых клеток способствуют нормализации уровня глюкозы в крови белых беспородных крыс со стойким аллоксановым диабетом. В продолжение исследований морфогенетических свойств суммарных РНК лимфоидных клеток [1-5], дан-

ная работа посвящена решению вопроса: влияет ли – и как именно – суммарная РНК селезенки крыс с аллоксановым диабетом на уровень глюкозы в крови интактных и перенесших аллоксановый диабет животных [1]. Результаты сопоставляли с влиянием аллоксана на уровень глюкозы в крови указанных групп животных.

Цель исследования – оценка влияния суммарной РНК, выделенной из селезенки крыс с аллоксановым диабетом, на уровень глюкозы в крови интактных крыс и животных, перенесших стойкий аллоксановый диабет.

Методика

Эксперименты с животными, содержащимися в стандартных условиях вивария, на стандартном рационе и при свободном доступе к воде, проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ «Принципы надлежащей лабораторной практики». Работа выполнена на 34 белых беспородных крысах-самках массой 250-280 г.: 12 животных составили группу «интактный контроль» и 22 крысы – группу с экспериментальным аллоксановым диабетом (группа «аллоксановый диабет»). Аллоксановый диабет моделировали предварительным однократным подкожным введением полного адьюванта Фрейнда в дозе 0,5 мл на одно животное, а через 24 ч (на фоне 24-часового голодания и свободного доступа к воде) однократно подкожно вводили аллоксана тригидрата («La Chema», Чехия) в дозе 200 мг/кг в 0,9%-ном растворе NaCl. Начиная с 3-х сут после введения аллоксана, все животные получали базисную инсулинотерапию. На 45-е сут из лимфоидных клеток селезенки 10-ти крыс группы «ал-

ллоксановый диабет» выделяли суммарную РНК методом гуанидин тиоцианат–фенол–хлороформной экстракции. У остальных 12 крыс этой группы уровень глюкозы крови был стабильно нормализован к 21-м сут введением суммарных РНК клеток костного мозга, селезенки и поджелудочной железы [1] (группа «перенесшие аллоксановый диабет»).

12 крыс группы «перенесшие диабет» и 12 крыс группы «интактный контроль», содержащиеся в стандартных условиях вивария все 45 сут, были использованы в новом эксперименте (второй этап работы). Эти животные были разделены на 4 группы (таблица). У 6 животных группы «интактный контроль» (первые) и у 6 животных группы «перенесший диабет» (второй) моделировали диабет ведением подкожно аллоксана (100 мг/кг) – группы 1 и 3, соответственно. Оставшиеся 6 животных группы «интактный контроль» и 6 животных группы «перенесших диабет» получали путем внутрибрюшинного введения суммарной РНК селезенки (15 мкг/100 г веса тела) – группы 2 и 4, соответственно.

Статистическую значимость различий оценивали с помощью критерия Манна-Уитни и Уилкоксона. Различия считались статистически значимыми при вероятности ошибки < 0,05.

Таблица

Сравнительное влияние аллоксана и суммарной РНК селезенки крыс с аллоксановым диабетом на уровень глюкозы крови у подопытных животных

Срок наблюдения	Интактные крысы (n=12)		Крысы, ранее перенесшие аллоксановый диабет (n=12)	
	Аллоксан (100 мг/кг)	РНК (15 мкг/100г)	Аллоксан (100 мг/кг)	РНК (15 мкг/100г)
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Фон	5,2±0,2	5,7±0,1	5,5±0,2	5,4±0,2
3 сут	14,1±0,4	8,0±0,5*	17,4±0,5*	11,6±0,6■▲
5 сут	13,9±0,4	14,3±0,6	18,7±0,5*	18,6±0,3■
7 сут	11,7±0,7	17,8±0,3*	20,2±0,6*	19,1±0,4
10 сут	10,9±0,4	16,7±0,5*	21,9±0,8*	19,3±0,5■
14 сут	11,3±0,6	15,7±0,4*	22,3±0,9*	19,9±0,3■
17 сут	9,5±0,5	13,2±0,5*	19,5±0,5*	17,5±0,2■
21 сут	8,2±0,3	9,2±0,3	18,7±0,7*	15,3±0,5■▲
28 сут	7,2±0,6	6,1±0,3	17,9±0,5*	11,6±0,5■▲

Примечание.

1. «*» – статистически значимые различия между группами 1 и 3
2. «•» – статистически значимые различия между группами 1 и 2
3. «■» – статистически значимые различия между группами 2 и 4
4. «▲» – статистически значимые различия между группами 3 и 4.

Результаты

Показано (см. табл.), что микродозы суммарной РНК селезенки животных с аллоксановым диабетом вызывали повышение уровня глюкозы в крови как интактных крыс, так и животных, перенесших ранее диабет, причем гипергликемия в ответ на введение суммарной РНК была статистически значимо выше у животных перенесших диабет (гр. 4), чем у интактных животных (гр. 2). Гипергликемия, вызываемая введением суммарной РНК селезенки, была сравнима с действием 600–700-кратной дозы самого аллоксана. Уровень гипергликемии у крыс с повторно воспроизведенным диабетом (гр. 3) был статистически значимо выше, чем у животных, у которых диабет моделировали впервые (гр. 1).

Заключение

В данной работе нами описан феномен повышенной чувствительности животных, ранее перенесших аллоксановый диабет, как к повторному действию агента, повреждающего инсулинпродуцирующие клетки островков Лангерганса (аллоксану), так и к диабетогенному действию исследуемой РНК. Полученные эффекты свидетельствуют о принципиальной возможности использовать суммарную РНК лимфоидных клеток для создания животных моделей заболеваний человека и новых подходов в области персонализированной медицины. Использование для этих целей именно суммарных РНК имеет особое значение, т.к. доказано [4], что они не имеют аллогенного и ксеногенного ограничений.

Литература

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

Сведения об авторах:

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

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

Бабаева Анна Георгиевна, акад. РАЕН, доктор мед. наук, консультант лаб. роста и развития ФГБНУ «НИИ морфологии человека».

2. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Роль Т-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(2): 189–202.
3. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Болотов А.А. Влияние предварительного введения суммарной РНК клеток костного мозга на динамику восстановления эритропоэза у крыс после острого гамма-облучения. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(5): 670–3.
4. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова Ю.О., Рагимов А.А. О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров. *Онкогематология*. 2015; 10(2): 58–62.
5. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102(11): 1280–301.

References

1. Gevorgyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. The role of lymphoid and stem cell total RNAs in correction of blood glucose levels in experimental diabetes mellitus. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2019; 63(3): 88–95. (In Russian)
2. Tishevskaya N.V., Gevorgyan N.M., Kozlova N.I. The role of T-lymphocytes in the hormonal regulation of morphogenetic processes. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(2): 189–202. (In Russian)
3. Gevorgyan N.M., Tishevskaya N.V., Bolotov A.A. Effect of preliminary introduction of bone marrow cell total RNA on the dynamics of erythropoiesis restoration in rats after acute gamma-irradiation. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 161(5): 670–3. (In Russian)
4. Babaeva A.G., Gevorgyan N.M., Tishevskaya N.V., Golovkina L.L., Muratova Ju.O., Ragimov A.A. On the hematopoietic properties of ribonucleic acid of peripheral blood lymphocytes in patients with true polycythemia and healthy donors. *Onkogematologiya*. 2015; 10(2): 58–62. (In Russian)
5. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorgyan N.M. The role of lymphocytic RNA in intercellular information exchange and regulation of regenerative processes. *Rossiyskiy fiziologicheskiy Zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2016; 102(11): 1280–301. (In Russian)

© Коллектив авторов, 2020

УДК 615-092

Тиньков А.А.^{1,2}, Айсувакова О.П.^{1,2,3}, Скальная М.Г.^{2,3}, Карганов М.Ю.⁴, Chang S.J.-S.⁵, Скальный А.В.^{2,3,5}

Определение изменений уровня кобальта, меди, марганца и железа в сыворотке крови, волосах и моче при ожирении и сопутствующей артериальной гипертензии методом ICP-MS

¹ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет имени П.Г. Демидова»,

150003, г. Ярославль, Россия, ул. Советская, д. 14;

²ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России,

119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

³ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов»,

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

⁴ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

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

⁵Тайбейский медицинский университет,

Тайбей 110, Тайвань Wuxing St., 250

Введение. Нарушения металлолигандного гомеостаза патогенетически связаны с развитием ожирения. Несмотря на то, что обмен железа при ожирении изучен достаточно детально, данные касающиеся обмена других металлов недостаточны. **Цель исследования** – изучение содержания кобальта, железа, меди и марганца в сыворотке крови, моче и волосах пациентов с ожирением в зависимости от наличия у них артериальной гипертензии. **Методика.** Обследованы 395 лиц обоего пола: 196 с ожирением и 199 с нормальной массой тела. На основании данных амбулаторных карт среди обследуемых пациентов с ожирением артериальная гипертензия была диагностирована у 43%, атеросклероз у 9% и нарушение толерантности к глюкозе и/или сахарный диабет 2 типа – 11%. Анализ содержания кобальта (Co), железа (Fe), меди (Cu) и марганца (Mn) в волосах, сыворотке крови и моче проводили с использованием масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой NexION 300D (PerkinElmer Inc., США) оснащенного ESI SC-2 DX4 autosampler (Elemental Scientific Inc., США). Калибровка ICP-DRC-MS системы проводилась с использованием растворов металлов, приготовленных на основе Universal Data Acquisition Standards Kit (PerkinElmer Inc., США). Внутренняя стандартизация проводилась с использованием растворов иттрия и родия 10 мг/л Pure Single-Element Standard (PerkinElmer Inc., США). Контроль качества проводился с использованием референтных образцов волос (GBW09101, SINR, Китай), сыворотки и мочи (ClinChek Plasma/Urine Control, Recipe, Германия). **Результаты.** Установлено, что в сыворотке крови пациентов с ожирением концентрация Co и Fe снижалась статистически значимо на 32% и 12% соответственно. Уровень Cu и Mn превышал соответствующие контрольные значения на 12% и 4%. Содержание Co, Cu и Mn в волосах обследуемых пациентов с ожирением было ниже контроля на 16%, 8% и 20%, соответственно. Отмечалось статистически значимое увеличение содержания железа в волосах на 55% по сравнению с контролем. Концентрация Co и Fe в моче пациентов с ожирением была соответственно ниже на 34% и выше на 25% относительно контрольных значений. При этом у пациентов с ожирением и гипертензией обнаруживалось статистически значимое повышение концентрации меди в сыворотке крови (на 9%), кобальта в моче (на 69%), а также содержания марганца в волосах (на 69%) по сравнению с соответствующими показателями у пациентов с ожирением без гипертензии. **Заключение.** Можно предположить, что дисбаланс металлов в организме вносит вклад в формирование ожирение-ассоциированных патологий, в том числе в развитие артериальной гипертензии.

Ключевые слова: ожирение; кобальт; железо; марганец; метаболический синдром.

Для цитирования: Тиньков А.А., Айсувакова О.П., Скальная М.Г., Карганов М.Ю., Chang S.J.-S., Скальный А.В. Определение изменений уровня кобальта, меди, марганца и железа в сыворотке крови, волосах и моче при ожирении и сопутствующей артериальной гипертензии методом ICP-MS. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 89-95.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.89-95

Для корреспонденции: Тиньков Алексей Алексеевич, e-mail: tinkov.a.a@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки России, государственное задание ЯргУ, работа № 0856-2020-0008

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Тиньков А.А., Скальная М.Г., Скальный А.В.; сбор и обработка материала – Тиньков А.А., Скальная М.Г., Айсувакова О.П., Карганов М.Ю.; статистическая обработка – Тиньков А.А., Айсувакова О.П., Chang S.J.-S.; написание текста – Тиньков А.А., Айсувакова О.П.; редактирование – Скальная М.Г., Карганов М.Ю., Скальный А.В.

Поступила 24.02.2020
Принята к печати 20.04.2020
Опубликована 28.05.2020

Tinkov A.A.^{1,2,3}, Ajsuvakova O.P.^{1,2,3}, Skalnaya M.G.^{2,3}, Karganov M.Yu.⁴, Chang S.J.-S.⁵, Skalny A.V.^{1,2,3}

Measuring changes in serum, hair and urinary levels of cobalt, copper, manganese, and iron in obesity and hypertension using the ICP-MS technique

¹P.G. Demidov Yaroslavl State University, Sovetskaya Str. 14, Yaroslavl 150003;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119991;

³People's Friendship University of Russia, Miklukho-Maklaya Str. 6, Moscow 117198;

⁴Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315;

⁵Taipei Medical University, Wuxing Str. 250, Taipei 110, Taiwan

Background. Disorders of the metal-ligand homeostasis are pathogenetically associated with obesity. Although impaired iron metabolism in obesity is relatively well studied information about other essential metals is insufficient. **Objective.** The objective of the study was to assess serum, urine, and hair levels of cobalt, iron, copper, and manganese in obese subjects in relation to the presence of hypertension. **Methods.** 396 adults with obesity ($n = 196$) and normal weight ($n = 199$) were examined. Based on clinical records of the patients with obesity, 43% of them had arterial hypertension, 9% had atherosclerosis, and 11% had impaired glucose tolerance and/or type 2 diabetes mellitus. Measurements of hair, serum, and urinary levels of cobalt (Co), iron (Fe), copper (Cu) and manganese (Mn) were performed using a NexlOD 300D inductively-coupled plasma mass-spectrometer (PerkinElmer Inc., USA) equipped with an ESI SC-2 DX4 autosampler (Elemental Scientific Inc., USA). The ICP-DRC-MS system was calibrated with metal solutions prepared with a Universal Data Acquisition Standards Kit (PerkinElmer Inc., USA). Pure Single-Element Standard yttrium and rhodium solutions (10 mg/l) (PerkinElmer Inc., USA) were used as internal standards. Reference samples of hair (GBW09101, SINR, China), serum, and urine (ClinChek Plasma/Urine Control, Recipe, Germany) were used for quality control. **Results.** Serum levels of Co and Fe were statistically significantly 32% and 12%, respectively, lower in obese patients than in normal-weight controls. Serum concentrations of Cu and Mn in obese patients exceeded the control values by 12% and 4%, respectively. Hair contents of Co, Cu, and Mn in obese subjects were 16%, 8%, and 20%, respectively, lower as compared to the respective control values. Hair Fe in obesity was 55% elevated compared to normal-weight values. Urinary Co and Fe in obese subjects were 34% lower and 25% higher, respectively, than in healthy controls. At the same time, patients with obesity and hypertension had elevated serum Cu, urinary Co, and hair Mn compared to obese normotensive subjects. **Conclusion.** The impaired metal homeostasis may contribute to the development of obesity-associated disorders including hypertension.

Keywords: obesity; cobalt; iron; manganese; metabolic syndrome.

For citation: Tinkov A.A., Ajsuvakova O.P., Skalnaya M.G., Karganov M.Yu., Chang S.J.-S., Skalny A.V. Measuring changes in serum, hair and urinary levels of cobalt, copper, manganese, and iron in obesity and hypertension using the ICP-MS technique. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 89-95. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.89-95

For correspondence: Tinkov Alexey Alexeyevich, researcher, PhD, MD, Laboratory of Biotechnology and Applied Bioelementology, Yaroslavl State University, e-mail: tinkov.a.a@gmail.com

Acknowledgments. The study was performed with support of the Russian Ministry of Science and Higher Education, Project № 0856-2020-0008.

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

Contribution: the concept and design of the study – Tinkov A.A.; Skalnaya M.G., Skalny A.V.; collection and processing of material – Tinkov A.A., Skalnaya M.G., Ajsuvakova O.P., Karganov M.Yu.; statistical processing – Tinkov A.A., Ajsuvakova O.P., Chang S.J.-S.; writing a text – Tinkov A.A., Ajsuvakova O.P.; editing – Skalnaya M.G., Karganov M.Yu., Skalny A.V.

Information about the authors:

Tinkov A.A., <http://orcid.org/0000-0003-0348-6192>

Ajsuvakova O.P., <http://orcid.org/0000-0003-4707-9353>

Skalnaya M.G., <http://orcid.org/0000-0003-1099-2560>

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

Chang S.J.-S., <http://orcid.org/0000-0001-8608-9349>

Skalny A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4185-6783>

Received 24.02.2020

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Введение

Распространенность ожирения существенно возросла в течение последних десятилетий. В частности, около 2 млрд человек имеют избыточную массу тела, причем примерно треть из них страдает от ожирения [1]. Затрагивая множество органов и систем, ожирение связано с широким спектром метаболических нарушений, в том числе с сахарным диабетом 2-го типа (СД2), сердечно-сосудистыми и респираторными заболеваниями, репродуктивной дисфункцией, а также рядом форм рака [2].

Эссенциальные металлы играют существенную роль в функционировании организма вследствие их каталитической, сигнальной или структурной роли [3]. При этом ожирение также сопровождается нарушением обмена эссенциальных металлов, наиболее изученным из которых является железо. В частности, при ожирении отмечается картина, сходная с анемией воспаления, обусловленная продукцией гепсидина, оказывающего тормозное влияние на экспрессию белков транспортеров железа ферропортина и дивалентного металлтранспортина (DMT1) [4]. Учитывая роль DMT1 в транспорте других эссенциальных двухвалентных металлов [5], ожирение также может быть связано с нарушением их транспорта. Однако данные относительно участия таких металлов как медь [6], кобальт [7], марганец [8] при ожирении весьма противоречивы, что может быть, по крайней мере, частично обусловлено различиями в используемых маркерах.

В то же время, состояние обмена эссенциальных металлов также может оказывать определенное модулирующее влияние на патогенез ожирения и ассоциированных с ним патологий [9]. Учитывая роль таких металлов как марганец или медь в регуляции функционирования сердечно-сосудистой системы [10], нарушение их обмена при ожирении может вносить определенный вклад в формирование сосудистой дисфункции, а также других ассоциированных с ожирением нарушений [11].

Цель исследования – изучение содержания кобальта, железа, меди и марганца в сыворотке крови, моче и волосах пациентов с ожирением в зависимости от наличия артериальной гипертензии.

Методика

Исследование проведено в соответствии с этическими принципами, установленными в Хельсинкской декларации (1964 г.), и ее последними поправками (2013). Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Ярославского госу-

дарственного университета им. П.Г. Демидова. У всех обследуемых было получено письменное информированное согласие на участие в эксперименте.

Обследовано 395 лиц обоего пола в возрасте от 20 до 60 лет с ожирением (64 мужчины и 132 женщины) и нормальной массой тела (39 мужчин и 160 женщин). Последние составили контрольную группу. Ввиду вариативности пола и возраста в процессе анализа проводилась поправка на данные параметры методом ковариационного анализа (ANCOVA). Индекс массы тела (ИМТ) лиц с нормальной массой тела и ожирением составила 22.5 ± 1.4 и 33.3 ± 3.3 м²/кг ($p < 0,001$), соответственно. На основании данных амбулаторных карт среди обследуемых пациентов с ожирением артериальная гипертензия была диагностирована у 43%, атеросклероз у 9% и нарушение толерантности к глюкозе и/или сахарный диабет 2 типа у 11%. Критериями исключения являлись курение, алкоголизм, вегетарианство, профессиональное воздействие металлов, проживание вблизи источника промышленных выбросов, применение витаминно-минеральных добавок, наличие металлических имплантов, а также наличие сердечно-сосудистых катастроф в анамнезе.

Образцы волос брали на исследование в день обследования с последующим обезжиривали ацетоном и промывали бидистиллированной водой. Высушенные образцы подвергали микроволновому разложению в присутствии концентрированной HNO₃ в системе Berghof SW-4 DAP-40 (Berghof Products & Instruments, Eningen, Германия). Кровь из локтевой вены брали утром натощак. Сыворотку получали центрифугированием крови в течение 10 мин при 1800 об/мин. Для анализа мочи использовали среднюю утреннюю порцию. Пробоподготовку образцов сыворотки крови и мочи к анализу проводили путем разведения подкисленным дилуэнтном (pH = 2.0, 1:15 v/v) содержащим 8% 1-бутанол, 0.8% Тритон X-100, 0.02% гидроксид тетраметиламмония, и 0.02% ЭДТА.

Анализ содержания кобальта (Co), железа (Fe), меди (Cu) и марганца (Mn) проводился с использованием масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой NexION 300D (PerkinElmer Inc., USA) оснащенный ESI SC-2 DX4 autosampler (Elemental Scientific Inc., США). Калибровку ICP-DRC-MS системы осуществляли с использованием растворов металлов, приготовленных на основе Universal Data Acquisition Standards Kit (PerkinElmer Inc., USA). Внутреннюю стандартизацию проводили с использованием растворов иттрия и родия 10 мг/л Pure Single-Element Standard (PerkinElmer Inc., США). Контроль качества осуществлялся с использованием референтных образцов волос

(GBW09101, SINR, Китай), сыворотки и мочи (ClinChek Plasma/Urine Control, Recipe, Германия).

Статистический анализ проводили на платформе Statistica 10.0 (Statsoft, США). Результаты представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Сравнительный анализ проводили после логарифмирования данных с использованием ковариационного анализа (ANCOVA) с поправкой Bonferroni. Множественная регрессия использована для оценки взаимосвязи между уровнем металлов (независимые предикторы) и величиной ИМТ (зависимая переменная). Результаты тестов считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Полученные результаты представлены в **табл. 1**. Установлено, что концентрация кобальта и железа в сыворотке крови пациентов с ожирением статистически значимо снижалась на 32% и 12%, соответственно. Уровень меди и марганца напротив, превышал соответствующие контрольные величины на 12% и 4%. Принципиально другие изменения обнаружены при изучении содержания металлов в образцах волос. В частности, уровень Co, Cu и Mn в образцах волос пациентов с ожирением был ниже контрольных значений на 16%, 8% и 20% с тенденцией к уровню статистической значимости. Единственным статистически

значимым изменением в образцах волос пациентов с ожирением оказалось увеличение на 55% содержания железа по сравнению с соответствующими показателями лиц с нормальной массой тела. Интенсивность экскреции металлов с мочой представлена в **табл. 1**. Концентрация кобальта в моче пациентов с ожирением была ниже контрольных значений на 34%, тогда как экскреция железа, напротив, выше на 35%. Отмечалось также тенденция к увеличению уровня меди в моче пациентов на 12%.

Учитывая высокую распространенность артериальной гипертензии у пациентов с ожирением, была проведена дополнительная градация в соответствии с наличием данного заболевания (**табл. 2**). Установлено, что для пациентов с ожирением и гипертензией характерно статистически значимое повышение концентрации меди в сыворотке крови, кобальта в моче, а также содержания марганца в образцах волос на 9%, 69% и 69% соответственно по сравнению с показателями пациентов с ожирением без гипертензии. Статистически значимые нарушения ряда изучаемых показателей были отмечены лишь в группе пациентов с гипертензией по сравнению с контрольными значениями. Так, концентрация меди и марганца в сыворотке крови пациентов с ожирением и гипертензией была статистически значимо выше контрольных значений на 17% и 4%, соответственно. В то же время, в группе пациентов с

Таблица 1

Уровень металлов в сыворотке (С), моче (М) и волосах (В) пациентов с ожирением и контрольных обследуемых

Показатель	Контроль (n = 199)	Ожирение (n = 196)	p
Co-С, нг/мл	0,64 (0,57–0,82)	0,49 (0,42–0,61)	< 0,001
Cu-С, мкг/мл	1,10 (0,98–1,26)	1,24 (1,05–1,38)	< 0,001
Fe-С, мкг/мл	1,53 (1,09–1,87)	1,35 (1,06–1,68)	0,024
Mn-С, нг/мл	1,97 (1,67–2,29)	2,03 (1,75–2,41)	0,010
Co-В, мкг/г	0,01 (0,01–0,02)	0,01 (0,01–0,02)	0,074
Cu-В, мкг/г	12,87 (10,39–16,93)	11,82 (10,01–16,73)	0,061
Fe-В, мкг/г	9,07 (6,72–13,89)	14,05 (8,99–20,89)	< 0,001
Mn-В, мкг/г	0,45 (0,24–0,80)	0,36 (0,19–0,66)	0,074
Co-М, нг/мл	1,01 (0,65–1,46)	0,66 (0,44–1,04)	0,002
Cu-М, мкг/мл	0,01 (0,01–0,01)	0,01 (0,01–0,02)	0,094
Fe-М, мкг/мл	0,02 (0,01–0,03)	0,03 (0,01–0,06)	0,014
Mn-М, нг/мл	0,84 (0,61–1,17)	0,95 (0,63–1,12)	0,933

Данные представлены в виде медианы и соответствующей величины межквартильного размаха (IQR); * – статистическая значимость отличий при $p < 0,05$ (One-way ANOVA Bonferroni post-hoc).

ожирением, но нормальным артериальным давлением значимых различий показателей выявлено не было. Концентрация кобальта в моче пациентов с ожирением характеризовалась статистически значимым снижением относительно контроля только в группе обследуемых с нормотонзией, составляя 39%. В то же время, концентрация кобальта в сыворотке крови пациентов с ожирением была ниже контрольных значений вне зависимости от наличия или отсутствия артериальной гипертонии.

Множественный регрессионный анализ показал, что отрицательными предикторами ИМТ являлись сывороточная концентрация кобальта ($\beta=-0,225$; $p<0,001$) и железа ($\beta=-0,156$; $p<0,001$), а также уровень кобальта в моче ($\beta=-0,096$; $p=0,037$). В то же время уровень меди ($\beta=0,102$; $p=0,024$) и марганца ($\beta=0,139$; $p=0,001$) в сыворотке, а также содержание

железа в волосах ($0,151$; $p=0,001$) были положительно ассоциированы с ИМТ. Модель также включала поправки на наличие гипертонии ($\beta=0,380$; $p<0,001$), атеросклероза ($\beta=-0,011$; $p=0,804$), и нарушенной толерантности к глюкозе ($\beta=0,120$; $p=0,005$). При этом регрессионная модель обуславливала до 41% вариабельности ИМТ.

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи между ожирением и нарушением обмена металлов. При этом уровни железа и кобальта характеризуются выраженной тенденцией к снижению в сыворотке крови, на фоне аккумуляции меди и марганца в организме.

Полученные результаты о значимом снижении сывороточной концентрации железа согласуются с данными литературы. Результаты проведенного метаанализа свидетельствуют, что для пациентов с ожирением характерно статистически значимое снижение сывороточного железа и процента насыщения трансферрина наряду с увеличением риска развития дефицита железа [12]. В качестве потенциального механизма развития данных нарушений рассматривается индуцированное ожирением повышение экспрессии гепсидина [13], обладающего ингибирующим влиянием в отношении ферропортина и DMT-1, что способствует торможению всасывания железа и его секвестрации [4].

Полученные данные также свидетельствуют о недостатке кобальта в организме при ожирении. Shao et al. (2017) выявили статистически значимую обратную взаимосвязь между концентрацией кобальта в моче и ИМТ у детей [14]. В то же время, непосредственные механизмы взаимосвязи между метаболизмом кобальта и ожирением не установлены. В частности, нами было продемонстрировано статистически значимое снижение содержания кобальта в жировой ткани животных с ожирением [15]. Kawakami и соавт. (2012) было продемонстрировано значимое снижение количества жировой ткани у животных, получающих кобальт (II), что было связано с повышением уровня лептина и адипонектина в циркуляции [16].

Выявленное увеличение содержания меди в организме при ожирении в целом согласуется с данными других авторов. В частности, выявлено значимое увеличение кумуляции меди в тканях, концентрации медь-содержащих белков, причем уровень меди в сыворотке значимо коррелировал с концентрацией лептина и инсулина [17]. Предполагается, что медь может быть задействована в патогенезе ожирения, модулируя процесс воспаления и развитие окислительного стресса [18], что согласуется с нашими данными о по-

Таблица 2

Уровень металлов в сыворотке крови, волосах и моче пациентов с ожирением в зависимости от наличия артериальной гипертонии

Металл	Нормотония	Гипертония	<i>p</i>
Со-С, нг/мл	0,48 (0,42–0,59)	0,54 (0,45–0,64)	0,526
Сu-С, мкг/мл	1,19 (1,02–1,34)	1,29 (1,15–1,42)	0,032
Fe-С, мкг/мл	1,37 (1,04–1,64)	1,33 (1,07–1,73)	1,000
Mn-С, нг/мл	2,01 (1,73–2,41)	2,04 (1,76–2,40)	1,000
Со-В, мкг/мл	0,01 (0,004–0,02)	0,01 (0,01–0,02)	0,627
Сu-В, мкг/мл	11,79 (9,73–17,20)	11,90 (10,18–16,36)	1,000
Fe-В, мкг/мл	13,94 (8,93–20,89)	14,39 (9,11–20,56)	1,000
Mn-В, мкг/мл	0,286 (0,19–0,51)	0,48 (0,26–0,79)	0,022
Со-М, нг/мл	0,62 (0,41–0,86)	1,04 (0,98–2,10)	0,008
Сu-М, мкг/мл	0,01 (0,01–0,02)	0,02 (0,01–0,02)	1,000
Fe-М, мкг/мл	0,03 (0,01–0,06)	0,04 (0,02–0,06)	1,000
Mn-М, нг/мл	0,94 (0,60–1,08)	1,08 (0,85–1,73)	0,483

Данные представлены в виде медианы и соответствующей величины межквартильного размаха (IQR); * – статистическая значимость при $p < 0,05$ (One-way ANOVA Bonferroni post-hoc). Единицы измерения см. табл.1.

тенцировании медью адипогенного эффекта высокожировой диеты [19]. Значительную роль также может играть взаимосвязь между содержанием меди и передачей сигнала инсулина [20].

Повышение сывороточной концентрации марганца при ожирении также было статистически значимо, что согласуется с данными о прямой взаимосвязи уровня марганца в сыворотке крови с ожирением [21]. Несмотря на то, что марганец, являясь кофактором Mn-SOD, может иметь определенный протективный эффект [8], избыток марганца может быть связан с развитием ожирения, его вкладом в системный окислительный стресс и воспаление [22].

Выявленная взаимосвязь между наличием артериальной гипертензии у пациентов с ожирением и содержанием металлов в индикаторных биосубстратах указывает на их потенциальную роль в нарушении регуляции сосудистого тонуса [23]. Одним из медь-зависимых механизмов развития сердечно-сосудистых заболеваний является нарушение функционирования транспортеров и шаперонов меди, что приводит к повышению количества каталитически-активной меди [24]. На связь концентрации марганца в крови с величиной АД указывается также в исследованиях Концентрация марганца в крови была также связана с величиной АД в исследовании KNHANES 2008 [25], что может быть связано с модуляцией гомеостаза кальция, а также адренергических влияний.

Заключение

Результаты проведенного исследования указывают на нарушение металло-лигандного гомеостаза при ожирении. Несмотря на то, что развитие ожирения является в данном случае ведущим фактором, индуцирующим дисгомеостаз металлов посредством различных механизмов, предполагается, что дисбаланс металлов в организме может вносить определенный вклад в формирование ассоциированных с ожирением патологий, в том числе артериальной гипертензии.

Литература

(п.п. 1-14; 16-25 см. References)

1. Тиньков, А.А., Гатиатулина, Е.Р., Попова, Е.В., Полякова, В.С., Скальная, А.А., Аглетдинов, Э.Ф. и др. Влияние адипогенной диеты в раннем возрасте на содержание микроэлементов в тканях крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60: 79-85.

References

1. Seidell J.C., Halberstadt J. The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Ann. Nutr. and Metab.* 2015; 66: 7-12. <https://doi.org/10.1159/000375143>

2. Pozza C., Isidori A.M. What's Behind the Obesity Epidemic. In: LAghi A., Rengo M., eds. *Imaging in Bariatric Surgery*. Cham: Springer; 2018: 1-8. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49299-5_1
3. Skalnaya M.G., Skalny, A.V. *Essential trace elements in human health: a physician's view*. Tomsk: Publishing House of Tomsk State University, 2018.
4. Nikonorov A.A., Skalnaya M.G., Tinkov A.A., Skalny A.V. Mutual interaction between iron homeostasis and obesity pathogenesis. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2015; 30: 207-14. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.05.005>
5. Garrick M.D., Singleton S.T., Vargas, F., Kuo, H. C., Zhao, L., Knöpfel, M. et al. DMT1: which metals does it transport? *Biol. Res.* 2006; 39: 79-85. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602006000100009>
6. Gu K., Li X., Xiang W., Jiang X. The Relationship Between Serum Copper and Overweight/Obesity: a Meta-analysis. *Biol. Trace Elem. Res.* 2019. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01803-6>
7. Lee Y.A., Kim S.H., Kim H.N., Song S.W. Are There Differences in Hair Mineral Concentrations Between Metabolically Healthy and Unhealthy Obese Adults? *Biol. Trace Elem. Res.* 2020; 193: 311-8. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01714-6>
8. Li L., Yang X. The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: links and interactions. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2018; 7580707. <https://doi.org/10.1155/2018/7580707>
9. Wiernsperger N., Rapin J. Trace elements in glucometabolic disorders: an update. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2010; 2: 70. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-70>
10. Mohammadifard N., Humphries K.H., Gotay C., Mena-Sánchez G., Salas-Salvado J., Esmailzadeh A. et al. Trace minerals intake: risks and benefits for cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019; 59: 1334-6. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1406332>
11. Suliburska J., Bogdański P., Pupek-Musialik D., Krejpcio Z. Dietary intake and serum and hair concentrations of minerals and their relationship with serum lipids and glucose levels in hypertensive and obese patients with insulin resistance. *Biol. Trace Elem. Res.* 2011; 139: 137-50. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8650-0>
12. Zhao L., Zhang X., Shen Y., Fang X., Wang Y., Wang F. Obesity and iron deficiency: a quantitative meta-analysis. *Obes. Rev.* 2015; 16: 1081-93. <https://doi.org/10.1111/obr.12323>
13. Ganz T., Nemeth E. Hpcidin and disorders of iron metabolism. *Annu. Rev. Med.* 2011; 62: 347-60. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050109-142444>
14. Shao W., Liu Q., He X., Liu H., Gu A., Jiang Z. Association between level of urinary trace heavy metals and obesity among children aged 6–19 years: NHANES 1999–2011. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2017; 24: 11573-81. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8803-1>
15. Tinkov, A.A., Gatiatulina, E.R., Popova, E.V., Polyakova, V.S., Skalvaya, A.A., Agletdinov, E.F., et al. The impact of adipogenic diet on rats' tissue trace elements content. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2016; 60: 79-85.
16. Kawakami T., Hanao N., Nishiyama K., Kadota Y., Inoue M., Sato M. et al. Differential effects of cobalt and mercury on lipid metabolism in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obesity mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 258: 32-42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.10.004>
17. Yang H., Liu C.N., Wolf R.M., Ralle M., Dev S., Pierson H. et al. Obesity is associated with copper elevation in serum and tissues. *Metallomics*. 2019; 11: 1363-71. <https://doi.org/10.1039/C9MT00148D>

18. Pereira T.C.B., Campos M.M., Bogo M.R. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. *J. Appl. Toxicol.* 2016; 36: 876-85. <https://doi.org/10.1002/jat.3303>
19. Tinkov A.A., Polyakova V.S., Nikonov A.A. Chronic administration of iron and copper potentiates adipogenic effect of high fat diet in Wistar rats. *Biometals.* 2013; 26: 447-63. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9630-6>
20. Yang H., Dhawan N., Ivy K., Kaplan J., Lutsenko S. Insulin signaling and copper homeostasis are functionally linked in 3T3-L1 adipocytes (992.2). *FASEB J.* 2014; 28: 992-2.
21. Fan Y., Zhang C., Bu J. Relationship between selected serum metallic elements and obesity in children and adolescent in the US. *Nutrients.* 2017; 9: 104. <https://doi.org/10.3390/nu9020104>
22. Farina M., Avila D.S., Da Rocha J.B.T., Aschner M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem. Int.* 2013; 62: 575-94. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.12.006>
23. Carpenter W.E., Lam D., Toney G.M., Weintraub N.L., Qin Z. Zinc, copper, and blood pressure: Human population studies. *Med. Sci. Monit.* 2013; 19: 1. <https://doi.org/10.12659/MSM.883708>
24. Fukai T., Ushio-Fukai M., Kaplan J.H. Copper transporters and copper chaperones: roles in cardiovascular physiology and disease. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2018; 315: 186-201. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00132.2018>
25. Lee B.K., Kim Y. Relationship between blood manganese and blood pressure in the Korean general population according to KNHANES 2008. *Environ. Res.* 2011; 111: 797-803. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.05.005>

Сведения об авторах:

Тиньков Алексей Алексеевич, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. биотехнологии и прикладной биоэлементологии ЯрГУ им. П.Г. Демидова; вед. науч. сотр., лаб. молекулярной диетологии ПМГМУ им. Сеченова, e-mail: tinkov.a.a@gmail.com;

Айсывакова Ольга Павловна, канд. хим. наук, ст. науч. сотр., лаб. молекулярной диетологии ПМГМУ им. Сеченова, e-mail: oajsuvakova@gmail.com;

Скальная Маргарита Геннадьевна, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр., лаборатория молекулярной диетологии ПМГМУ им. Сеченова, e-mail: skalnaya@yandex.ru;

Карганов Михаил Юрьевич, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии НИИ общей патологии и патофизиологии e-mail: mkarganov@mail.ru;

Chang J.-S. Susan, проф. школы питания и наук о здоровье (School of Nutrition and Health Sciences), Тайбейский медицинский университет, e-mail: susanchang@tmu.edu.tw;

Скальный Анатолий Викторович, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. молекулярной диетологии ПМГМУ им. Сеченова, e-mail: skalny3@gmail.com

© Коллектив авторов, 2020

УДК 615.32

Разуваева Я.Г., Торопова А.А., Гармаев Д.Э.

Стресс-протективное действие настойки *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim. при длительном эмоциональном стрессе

ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, Россия, ул. Сахьяновой, д. 6

Cimicifuga dahurica – многолетнее растение семейства *Ranunculaceae*. В тибетской медицине *C. dahurica* входит в состав сборов, применяющихся при болезнях «гза» («болезни, насылаемые духами»: при инсультах, параличах и других нарушениях функций нервной системы). В середине XX века настойку *C. dahurica* использовали для лечения гипертонической болезни. *C. dahurica* оказывает седативное действие, ограничивая двигательную, ориентировочно-исследовательскую активность и рефлекторную возбудимость животных, а также увеличивая продолжительность наркотического сна. **Цель исследования** – оценка стресс-протективного действия настойки *C. dahurica* при хроническом эмоциональном стрессе. **Методика.** Исследования проведены на крысах *Wistar*. Длительный эмоциональный стресс воспроизводили четырехдневной иммобилизацией животных в пластмассовых пеналах с одновременным погружением их в воду. Настойку *C. dahurica* вводили животным (0,5 мл/кг) в течение 7 сут до моделирования эмоционального стресса и ежедневно перед помещением их в пеналы. Определяли выраженность триады Селье, уровень адренокортикотропного гормона кортикостерона и катехоламинов в плазме крови, содержание малонового диальдегида, и активность каталазы в сыворотке крови, а также активность супероксиддисмутазы в эритроцитах. **Результаты.** Установлено, что настойка *C. dahurica* повышает устойчивость животных к длительному эмоциональному стрессу, ограничивая инволюцию иммунокомпетентных органов – тимуса и селезенки на 22% и 24%, соответственно. Выявленность гипертрофии надпочечников снижалась на 34%, уменьшалось развитие язвенных повреждений слизистой оболочки желудка, что может быть связано с торможением функции симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной систем, ингибированием свободнорадикальных процессов с одновременной активацией эндогенных антиоксидантных систем. Исследуемое фитосредство ингибировало гиперактивацию перекисного окисления липидов, снижая уровень малонового диальдегида на 24%, а также повышало активность эндогенной антиоксидантной системы, увеличивая активность каталазы и супероксиддисмутазы в 1,6 и 1,3 раза соответственно. **Заключение.** Настойка *C. dahurica* в дозе 0,5 мл/кг при длительном эмоциональном стрессе оказывает стресс-протективное действие, уменьшая выраженность стресс-индуцированных изменений, ограничивая гиперактивацию центральных стресс-реализующих систем, корректируя эндогенную антиоксидантную систему организма. Выявленный стресс-протективный эффект исследуемого фитосредства обусловлен содержанием в его составе комплекса биологически активных веществ, таких как фенольные соединения, сапонины.

Ключевые слова: *Cimicifuga dahurica*, длительный эмоциональный стресс, стресс-протективное действие, антиоксидантное действие.

Для цитирования: Разуваева Я.Г., Торопова А.А., Гармаев Д.Э. Стресс-протективное действие настойки *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim. при длительном эмоциональном стрессе. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 96-101.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.96-101

Для корреспонденции: Разуваева Янина Геннадьевна, e-mail: tatur75@mail.ru

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 – Разуваева Я. Г.; сбор и обработка материала – Торопова А.А., Гармаев Д.Э.; статистика – Торопова А.А., Гармаев Д.Э.; написание текста – Разуваева Я.Г.; редактирование – Разуваева Я.Г., Торопова А.А.

Поступила 17.05.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Razuvaeva Ya.G., Tоропова A.A., Garmayev D.E.

Stress-protective effect of the *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim tincture in chronic emotional stress

Institute of General and Experimental Biology,
Sakhyanova Str. 6, Ulan-Ude 670047, Russia

Cimicifuga dahurica (Turcz.) Maxim. is a perennial plant of the *Ranunculaceae* family. In Tibetan medicine, *C. dahurica* is included into medicinal collections used for the treatment of *gza* diseases (diseases “inflicted by demons”), such as stroke, palsies, and other

functional disorders of the nervous system. In mid-20th century, the *C. dahurica* tincture was used for the treatment of hypertension. The *C. dahurica* tincture has a sedative effect; it limits motility, exploratory activity, and reflex excitability in animals and prolongs the narcotic sleep. **The aim** of this study was to evaluate the stress-protective effect of *C. dahurica* tincture in chronic emotional stress. **Methods.** Experiments were performed on Wistar rats weighing 180–200 g. Chronic emotional stress was produced by four-day restraint of animals in plastic cages with simultaneous water immersion. The *C. dahurica* tincture was administered to animals at a dose of 0.5 ml/kg for 7 days, once a day; the last dose was administered 30 min prior to testing. The following parameters were determined: intensity of the Selye's triad, plasma concentrations of ACTH, corticosterone, and catecholamines; serum concentration of malonic dialdehyde; serum activity of catalase; and superoxide dismutase activity in red blood cells. **Results.** The *C. dahurica* tincture increased the tolerance to chronic emotional stress and restricted involution of immune-competent organs, the thymus and spleen, by 22% and 24%, respectively ($p < 0.05$), adrenal gland hypertrophy by 34% ($p < 0.05$), and development of stress-induced stomach ulcers. These effects could be due to inhibition of the sympathoadrenal system and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, inhibition of free-radical processes, and simultaneous activation of endogenous antioxidant systems. The *C. dahurica* tincture inhibited lipid peroxidation processes thus reducing the content of malonic dialdehyde by 24%. Also, the tincture potentiated the endogenous antioxidant system by increasing activities of catalase and superoxide dismutase 1.6 and 1.3 times, respectively. **Conclusion.** The stress-protective effect of the plant remedy is due to contained bioactive substances, such as phenolic compounds and saponins.

Keywords: *Cimicifuga dahurica*; chronic emotional stress; stress-protective effect; antioxidant effect.

For citation: Razuvaeva Ya.G., Toropova A.A., Garmayev D.E. Stress-protective effect of the *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim tincture in the long-term emotional stress. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 96-101. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.96-101

For correspondence: **Yanina G. Razuvaeva**, Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher, Federal State Budgetary Institution of Scientific «Institute of General and Experimental Biology» SB RAS; 6 Sakhyanova Str., Ulan-Ude 670047, Russian Federation, e-mail: tatur75@mail.ru

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

Acknowledgments. The studies were carried out in the course of the project N AAAA-AA17-117011810037.

Contribution: the concept and design of the study – Razuvaeva Ya.G., collection and processing of material – Toropova A.A., Garmayev D.E.; statistical processing – Toropova A.A., Garmayev D.E.; writing a text – Razuvaeva Ya.G., editing – Razuvaeva Ya.G., Toropova A.A.

Information about the authors:

Razuvaeva Ya.G., <http://orcid.org/0000-0001-7829-1424>

Toropova A.A., <http://orcid.org/0000-0003-2618-7777>

Garmayev D.E. <https://orcid.org/0000-0001-7021-6403>

Received 17.05.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Cimicifuga dahurica – многолетнее травянистое растение семейства лютиковых (*Ranunculaceae*). В народной медицине аборигенов Дальнего Востока России *C. dahurica* используется в виде порошка, настойки и жидкого экстракта при головных болях, начальных стадиях гипертонической болезни, при повышенной нервной возбудимости, истерии, бессоннице и др. [1, 2]. В тибетской медицине *C. dahurica* входит в состав сборов, применяющихся при болезнях «гза» («болезни, насылаемые духами»: при инсультах, параличах и других нарушениях функций нервной системы) [3]. В клинике в середине XX века настойку *C. dahurica* использовали для лечения гипертонической болезни [4]. Известно, что настойка *C. dahurica* оказывает седативное действие, ограничивая двигательную, ориентировочно-исследовательскую активность и рефлекторную возбудимость животных, а также увеличивая продолжи-

тельность наркотического сна [5]. В опытах на белых крысах *Wistar* установлено, что настойка *C. dahurica* оказывает выраженное анксиолитическое, антидепрессивное и антиагрессивное действие [6, 7].

Цель исследования – оценка стресс-протективного действия настойки *C. dahurica* при хроническом эмоциональном стрессе.

Методика

Экспериментальные исследования выполнены на 46 крысах обоего пола *Wistar* с массой 180–200 г. Содержание животных соответствовало «Правилам лабораторной практики» (GLP) и Приказу МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Перед началом экспериментов животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, распределялись на группы с учетом принципа рандоми-

зации. Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.77 г.), «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Протокол исследования с этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол №3 от 03.09.2012). Животных декапитировали под эфирным наркозом.

Длительный эмоциональный стресс воспроизводили иммобилизацией животных в пластмассовых пеналах с одновременным погружением их в воду на 2 ч ежедневно в течение 4 сут [8]. Деалкоголизированную настойку *C. dahurica* вводили животным 1-й опытной группы внутривентрикулярно (0,5 мл/кг) в очищенной воде в объеме 10 мл/кг в течение 7 сут до моделирования эмоционального стресса и ежедневно перед помещением их в пеналы. Животные контрольной группы получали воду очищенную в объеме 10 мл/кг в аналогичном режиме. В качестве препарата сравнения использовали валерианы настойку (ОАО Дальхимфарм) в дозе 1,0 мл/кг, которую вводили животным 2-й опытной группы по аналогичной схеме.

Для оценки антистрессорной активности определяли параметры триады Селье: гипертрофию надпочечников, инволюцию иммунокомпетентных органов и количество деструкций в слизистой оболочке желудка с подсчетом язвенного индекса Паулса [9]. Для оценки напряжения симпато-адреналовой и гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной систем методом иммуноферментного анализа в плазме крови определяли содержание адреналина и норадреналина, кортикостерона и уровень адренкортикотропного гормона (АКТГ) на анализаторе «STAT FAX-2100» (США). Интенсивность процессов свободнорадикального окисления (СРО) оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови [10]. О состоянии антиоксидантной системы (АОС) судили по активности каталазы в сыворотке крови [11] и супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах [12].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета программ «Biostat-2006» с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в результате длительного психоэмоционального стресса у животных контрольной группы развивается характерная картина стрессорной реакции – триада Селье, которая проявляется инво-

люцией иммунокомпетентных органов (тимуса и селезенки), выраженной гипертрофией надпочечников, появлением язвенных повреждений в слизистой оболочке желудка (табл. 1).

Курсовое введение животным настойки *C. dahurica* оказывает выраженное стресс-протективное действие, о чем свидетельствует снижение относительной массы надпочечников в среднем на 34% и увеличение массы тимуса и селезенки на 22% и 24% соответственно по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы. Наряду с этим, испытываемое средство препятствует развитию глубоких деструкций в слизистой оболочке желудка. Так, у животных 1-й опытной группы эрозии отсутствовали, тогда как у крыс контрольной группы эрозии обнаружались в 67% случаев. Язвы у животных этой экспериментальной группы встречались лишь в 25% случаев (при 67% в контроле). Соответственно, индекс Паулса для язв у животных, получавших настойку *C. dahurica*, был ниже, чем у крыс контрольной группы и составил 0,08 против 0,45 в контроле (табл. 1). В слизистой оболочке желудка крыс контрольной группы наблюдался резко выраженный отек и гиперемия, тогда как у крыс, получавших настойку *C. dahurica* отечность и сглаженность рельефа слизистой желудка была умеренной. При этом стресс-протективная активность настойки *C. dahurica* превосходила таковую у препарата сравнения – валерианы настойку.

Хронический эмоциональный стресс сопровождается активацией симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной систем, о чем свидетельствует повышение уровня гормонов стресса: адреналина и норадреналина, АКТГ и кортикостерона в плазме крови крыс контрольной группы (табл. 2).

У животных, получавших настойку *C. dahurica* и валерианы, содержание адреналина в плазме крови статистически значимо снижалось на 43% и 39% соответственно, уровень норадреналина – на 20% и 18% по сравнению с контролем. Наряду с этим было показано, что применение испытываемых средств предотвращало гиперактивацию гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы, о чем свидетельствовало снижение уровня кортикостерона в крови животных опытных групп на 44% и 42% по сравнению с показателями крыс контрольной группы. Проявлялась также тенденция к снижению содержания АКТГ в плазме крови. Выраженное стресс-протективное действие настойки *C. dahurica* можно объяснить входящими в ее состав оксикоричными кислотами [13]. Так, по данным литературы [14], феруловая кислота оказывает выраженное стресс-протекторное действие, ограничивая

поражение слизистой оболочки желудка и повреждение миокарда, вызванные иммобилизационно-болевым стрессом.

Важную роль в развитии стресс-индуцированных повреждений органов играет активация процессов свободнорадикального окисления биомакромолекул, в результате которых нарушается целостность клеточных мембран и снижается активность мембраносвязанных ферментов. Установлено, что хронический эмоцио-

нальный стресс сопровождается индукцией процессов свободнорадикального окисления и угнетением антиоксидантной системы животных, на что указывает повышение содержания МДА в сыворотке крови, снижение активности каталазы в сыворотке крови и СОД в эритроцитах животных контрольной группы (табл. 3).

Как следует из данных, приведенных в табл. 3, курсовое введение животным настойки *C. dahurica*, на фоне хронического эмоционального стресса оказывает

Таблица 1

Влияние настойки *C. dahurica* на выраженность стрессорных изменений органов у белых крыс при длительном эмоциональном стрессе, (M±m)

Показатели		Группы животных			
		Интактная (H ₂ O), n = 10	Контрольная (стресс+H ₂ O), n = 12	Опытная 1 (стресс + настойка <i>C.dahurica</i>), n = 12	Опытная 2 (стресс + валерианы настойка), n = 12
Масса органов, мг/100г	тимус	110,0 ± 3,2	66,0 ± 3,2	80,8 ± 1,6*	87,2 ± 3,2*
	селезенка	560,0 ± 12,0	370,5 ± 5,6	460,6 ± 4,5*	463,6 ± 31,6*
	надпочечники	19,5 ± 0,8	35,0 ± 1,1	23,0 ± 1,1*	22,4 ± 1,1*
Кровоизлияния	% поражения животных	0	67	25	33
	среднее число деструкций на 1 животное	0	1,5 ± 0,4	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,4
	индекс Паулса	0	1,0	0,1	0,2
Эрозии	% поражения животных	0	67	0	33
	среднее число деструкций на 1 животное	0	1,3 ± 0,4	0	1,0 ± 0,5
	индекс Паулса	0	0,9	0	0,3
Язвы	% поражения животных	0	67	25	33
	среднее число деструкций на 1 животное	0	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,2
	индекс Паулса	0	0,4	0,1	0,2

Примечание. * ($p < 0,05$) – статистическая значимость различий между контрольной и опытными группами; n – число животных в группе.

Таблица 2

Влияние настойки *C. dahurica* на содержание гормонов стресса в плазме крови крыс при длительном эмоциональном стрессе, (M±m)

Показатели	Группы животных			
	Интактная (H ₂ O), n = 7	Контрольная (стресс + H ₂ O), n = 8	Опытная 1 (стресс+ настойка <i>C.dahurica</i>), n = 8	Опытная 2 (стресс+валерианы настойка), n = 7
Адреналин в плазме крови, нмоль/л	4,4 ± 0,1	23,8 ± 0,3	13,6 ± 0,4*	14,8 ± 0,7*
Норадреналин в плазме крови, нмоль/л	70,6 ± 0,1	135,0 ± 3,4	107,8 ± 4,1*	111,3 ± 6,3*
АКТГ, пг/мл	9,2 ± 1,8	17,5 ± 1,4	15,3 ± 1,0	14,8 ± 1,1
Кортикостерон, нмоль/л	21,6 ± 2,1	44,9 ± 5,3	25,3 ± 1,9*	26,2 ± 3,8*

Примечание. * ($p < 0,05$) – статистическая значимость различий между контрольной и опытными группами; n – число животных в группе.

Таблица 3

Влияние настойки *C. dahirica* на показатели свободнорадикального окисления биомакромолекул и антиоксидантной системы организма белых крыс при хроническом эмоциональном стрессе, ($M \pm m$)

Показатели	Группы животных			
	Интактная (H_2O), n = 7	Контрольная (стресс + H_2O), n = 8	Опытная 1 (стресс+ настоек <i>C.dahirica</i>), n = 8	Опытная 2 (стресс+валерианы настойка), n = 7
МДА в сыворотке, мкмоль/л	2,8 ± 0,1	4,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1*	3,4 ± 0,1*
Каталаза в сыворотке, мкат/л	17,1 ± 0,9	9,2 ± 0,2	14,1 ± 0,2*	12,0 ± 0,5*
СОД в эритроцитах, усл.ед	2,6 ± 0,1	0,9 ± 0,02	1,2 ± 0,1*	1,1 ± 0,1*

Примечание. * ($p < 0,05$) – статистическая значимость различий между контрольной и опытными группами; n – число животных в группе.

выраженное антиоксидантное действие. В частности, под влиянием испытуемого средства у животных 1-й опытной группы содержание МДА в сыворотке крови снижалось на 24%, активность каталазы в сыворотке крови повышалась в 1,6 раза, активность СОД в эритроцитах – в 1,3 раза по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы. При этом антиоксидантная активность настойки *C. dahirica* превосходила таковую у препарата сравнения – валерианы настойки. Указанный эффект исследуемого фитосредства обусловлен содержанием в его составе фенольных соединений и сапонинов, проявляющих выраженную антиоксидантную активность [15].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что курсовое введение настойки *C. dahirica* в дозе 0,5 мл/кг на фоне длительного эмоционального стресса оказывает стресс-протективное действие, уменьшая выраженность патологических стресс-индуцированных изменений во внутренних органах животных, ограничивая гиперактивацию центральных стресс-реализующих систем: симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-адреналовой, благодаря активации эндогенной антиоксидантной системы организма.

Литература

1. Пименова М.Е. Влияние освещенности местообитаний на возрастной состав, численность популяций и продукцию корневищ *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim. *Растительные ресурсы*. 1970; 6(4): 56-62.
2. Фруентов Н.К. *Лекарственные растения Дальнего Востока*. Хабаровск; 1974.
3. Асеева Т.А., Дашиев Д.Б., Дашиев А.Д., Николаев С.М., Суркова Н.А., Чехирова Г.В., Юрина Т.А. *Тибетская медицина у бурят*. Новосибирск; 2008.
4. Шретер А.И. *Лекарственная флора Советского Дальнего Востока*. М.; 1975.
5. Никольская Б.С., Шретер А.И. Настойка цимицифуги даурской. *Медицинская промышленность СССР*. 1961; 9: 47-8.

6. Гармаев Д.Э., Разуваева Я.Г., Шантанова Л.Н. Психотропное действие настойки *Cimicifuga dahurica*. *Вестник Бурятского государственного университета*. 2013; 12: 49-52.
7. Гармаев Д.Э., Шантанова Л.Н., Разуваева Я.Г., Николаев С.М. Анксиолитическое действие *Cimicifuga dahurica*. *Сибирский медицинский журнал*. 2013; 121 (6): 154-5.
8. Разуваева Я.Г. Морфофункциональная оценка нейропротективного действия *Himulus lupulus* L. при хроническом эмоциональном стрессе. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН*. 2012; 6(88): 77-9.
9. Амосова Е.Н., Зуева Е.П., Разина Т.Г. Поиск новых противоязвенных средств из растений Сибири и Дальнего Востока. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 1998; 61(6): 31-5.
10. Стальная И.Д., Горишвили Т.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. В кн.: *Современные методы в биохимии*. М.; 1977: 66-8.
11. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16-9.
12. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. *Лабораторное дело*. 1985; 11: 678-81.
13. Liu I.M., Chi T.C., Hsu F.L., Chen C.F., Cheng J.T. Isoferulic acid as active principle from the rhizoma of *Cimicifuga dahurica* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta medica*. 1999; 65(8): 712-4.
14. Перфилова В.Н., Дьяков А.В., Тюренков И.Н. Кардиопротективное действие феруловой кислоты при стрессорном повреждении сердца. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2005; 68(5): 19-22.
15. Qin R., Zhao Y., Zhou W. et al. Polyphenolic compounds with antioxidant potential and neuro-protective effect from *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim. *Fitoterapia*. 2016; 115: 52-6.

References

1. Pimenova M.E. Influence of the illumination of habitats on the age composition, number of populations and production of rhizomes *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim. *Rastitel'nye resursy*. 1970; 6(4): 56-62. (in Russian)
2. Fruentov N.K. *Medicinal plants of the Far East [Lekarstvennye rasteniya Dal'nego Vostoka]*. Khabarovsk: Khabarovskoe knizhnoe izdatel'stvo; 1974. (in Russian)

3. Aseeva T.A., Dashiev D.B., Dashiev A.D., Nikolaev S.M., Surkova N.A., Chekhirova G.V., Yurina T.A. *Tibetan medicine from the Buryats [Tibetskaya meditsina u buryat]*. Novosibirsk; Izdatel'stvo SO RAN; 2008. (in Russian)
4. Shreter A.I. *Medicinal flora of the Soviet Far East [Lekarstvennaya flora Sovetskogo Dal'nego Vostoka]*. Moscow: Meditsina; 1975. (in Russian)
5. Nikol'skaya B.S., Shreter A.I. Tincture of *Cimicifuga dahurica*. *Meditsinskaya promyshlennost' SSSR*. 1961; 9: 47-8. (in Russian)
6. Garmaev D.E., Razuvaeva Ya.G., Shantanova L.N. Psychotropic effect of tincture *Cimicifuga dahurica*. *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2013; 12: 49-52. (in Russian)
7. Garmaev D.E., Shantanova L.N., Razuvaeva Ya.G., Nikolaev S.M. Anxiolytic action of *Cimicifuga dahurica*. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 121(6): 154-5. (in Russian)
8. Razuvaeva Ya.G. Morphofunctional evaluation of the neuroprotective effect of *Humulus lupulus* L. with chronic emotional stress. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN*. 2012; 6 (88): 77-9. (in Russian)
9. Amosova E.N., Zueva E.P., Razina T.G. Search for new antiulcer drugs from plants in Siberia and the Far East. *Ekspertimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 1998; 61(6): 31-5. (in Russian)
10. Stal'naya I.D., Gorishvili T.D. Method for the determination of malonic dialdehyde with thiobarbituric acid. *Modern methods in biochemistry*. Moscow; 1977: 66-8. (in Russian)
11. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16-9. (in Russian)
12. Chevare S., Chaba I., Sekey Y. The role of superoxide dismutase in the oxidative processes of the cell and the method for determining it in biological materials. *Laboratornoe delo*. 1985; 11: 678-81. (in Russian)
13. Liu I.M., Chi T.C., Hsu F.L., Chen C.F., Cheng J.T. Isoferulic acid as active principle from the rhizoma of *Cimicifuga dahurica* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta medica*. 1999; 65(8): 712-4.
14. Perfilova V.N., D'yakov A.V., Tyurenkov I.N. Cardioprotective action of ferulic acid in stressor damage to the heart. *Ekspertimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2005; 68(5): 19-22. (in Russian)
15. Qin R., Zhao Y., Zhao Y., Zhou W. et al. Polyphenolic compounds with antioxidant potential and neuro-protective effect from *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim. *Fitoterapia*. 2016; 115: 52-6.

Сведения об авторах:

Разуваева Янина Геннадьевна, доктор биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. безопасности биологически активных веществ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, e-mail: tatur75@mail.ru;

Торопова Анюта Алексеевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. безопасности биологически активных веществ, ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, e-mail: anyuta-tor@mail.ru;

Гармаев Д.Э., аспирант лаб. безопасности биологически активных веществ, ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, e-mail: garmayevd@bk.ru

Обзоры

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.9

Степанов И.А.^{1,2}, Белобородов В.А.¹, Шамеева М.А.¹

Молекулярно-генетические механизмы формирования очагов гетеротопической оссификации

¹ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, 664003, г. Иркутск, Россия, ул. Красного Восстания, д. 1;

²ООО «Харлампиевская клиника», 664025, Иркутск, Россия, ул. Горького, д. 8

В обзоре освещены данные современной литературы, посвященные изучению молекулярно-генетических механизмов гетеротопической оссификации (ГО). ГО представляет собой процесс образования пластинчатой кости в мягких тканях, не имеющих остеогенных свойств. В патогенезе формирования очагов ГО важнейшую роль играет ряд внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за направление дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток по пути остеогенеза. Представлен анализ экспериментальных исследований, изучающих молекулярные механизмы ГО. Авторами изложены современные данные о молекулярных терапевтических подходах к лечению и профилактике ГО. Обозначены актуальные, остающиеся нерешенными вопросы, что диктует необходимость проведения дальнейших экспериментальных и клинических исследований проблемы гетеротопической оссификации.

Ключевые слова: гетеротопическая оссификация; молекулярные механизмы; костные морфогенетические белки; внутриклеточные сигнальные пути; нестероидные противовоспалительные лекарственные средства; агонисты рецепторов ретиноевой кислоты; акцепторы свободных радикалов; лучевая терапия; профилактика.

Для цитирования: Степанов И.А., Белобородов В.А., Шамеева М.А. Молекулярно-генетические механизмы формирования очагов гетеротопической оссификации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 102-110.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.102-110

Для корреспонденции: Степанов Иван Андреевич, e-mail: stepanovivanneuro@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Степанов И.А., Белобородов В.А.; сбор и обработка материала – Степанов И.А., Шамеева М.А.; написание текста – Степанов И.А., Шамеева М.А.; редактирование – Белобородов В.А.

Поступила 14.03.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Stepanov I.A.^{1,2}, Beloborodov V.A.¹, Shameeva M.A.¹

Molecular and genetic mechanisms of heterotopic ossification

¹Irkutsk State Medical University, Ministry of Health,

1, Krasnogo Vosstaniya Str., Irkutsk, 664003, Russia;

²Kharlampiev Clinic, 8, Gorkogo Str., Irkutsk, 664025, Russia

This review addressed molecular and genetic mechanisms of heterotopic ossification (HO). HO is a process of lamellar bone formation in soft tissues lacking osteogenic properties. Several intracellular signaling pathways for differentiation of mesenchymal stem cells along with the osteogenesis pathway play an important role in the pathogenesis of HO formation. This review analyzed experimental studies of HO molecular mechanisms. The authors presented state-of-the-art information about molecular therapeutic approaches in HO treatment and prevention and identified relevant but still unresolved issues, which warrant further experimental and clinical studies.

Keywords: heterotopic ossification; molecular mechanisms; bone morphogenetic proteins; intracellular signaling pathways; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; retinoic acid receptor agonists; free radical scavengers; radiotherapy; prevention.

For citation: Stepanov I.A., Beloborodov V.A., Shameeva M.A. Molecular and genetic mechanisms of heterotopic ossification. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2020; 64(2): 102-110. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.102-110

For correspondence: *Ivan A. Stepanov*, Assistant, Department of General Surgery and Anesthesiology, Irkutsk State Medical University, e-mail: stepanovivanneuro@gmail.co

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Contribution: the concept and design of the study – Stepanov I.A., Beloborodov V.A.; collection and processing of material – Stepanov I.A., Shameeva M.A.;

writing a text – Stepanov I.A., Shameeva M.A.; editing – Beloborodov V.A.

Information about the authors:

Stepanov I.A., <https://orcid.org/0000-0001-9039-9147>

Beloborodov V.A., <https://orcid.org/0000-0002-3299-1924>

Shameeva M.A., <https://orcid.org/0000-0002-3085-2998>

Received 14.03.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Гетеротопическая оссификация (ГО) представляет собой процесс образования пластинчатой кости в мягких тканях, не имеющих остеогенных свойств [1]. Принято различать наследственные и приобретенные формы ГО. Наследственные формы ГО включают в себя 3 типа: прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия (ПОФ), прогрессирующая костная гетероплазия (ПОГ) и наследственная остеодистрофия Олбрайта (НОО) [2, 3]. В свою очередь, приобретенные формы ГО могут возникать вследствие воздействия некоторых индуцирующих факторов: повреждение мягких тканей при травмах, ожогах или хирургических вмешательствах и перенесенные травмы головного и/или спинного мозга [3]. Ряд исследователей классифицирует ГО на травматическую, нетравматическую и нейрогенную [4].

К настоящему времени известно, что в формировании очагов ГО принимают участие 3 основных механизма: присутствие остеогенных клеток-предшественников, индуцирующие факторы и клеточное микроокружение [5]. При этом, ключевая роль в развитии очагов ГО отводится сложным межклеточным молекулярным взаимодействиям [6].

Доказано влияние ряда факторов на развитие ГО после выполнения операции тотального эндопротезирования тазобедренных суставов. Факторами риска развития ГО являются мужской пол, повторные оперативные вмешательства на крупных суставах и наличие признаков ГО в анамнезе [7]. Необходимо отметить, что остеоартроз, анкилозирующий спондилоартрит (болезнь Бехтерева), диффузный идиопатический гиперостоз и наличие признаков хронической венозной недостаточности нижних конечностей также могут повышать риск развития ГО [8–10].

Цель обзора — анализ современных данных литературы, посвященных изучению молекулярных и генетических механизмов формирования очагов ГО.

Молекулярные механизмы. Развитие нормальной костной ткани — это сложный и строго организованный физиологический процесс. Формирование костной ткани осуществляется с помощью энхондрального или внутримембранозного окостенений [11]. В обоих случаях окостенения происходит миграция мезенхимальных стволовых клеток (МСК), их взаимодействие с клетками костной ткани с помощью паракринной регуляции и прямая дифференцировка в остеобласты, хондроциты или адипоциты. Пути дифференцировки МСК строго зависят от их локального микроокружения [12]. В исследовании J. Lees-Shepard и соавт. [13] показано, что МСК обладают остеогенными свойствами и являются источником формирования очагов ГО в травмированных скелетных мышцах. Однако не только МСК могут выступать в качестве источника развития ГО. Так, в работах J. Downey и соавт. [14] и С. Кап и соавт. [15] отмечено, что перициты, сосудистые эндотелиоциты, сателлиты мышечной ткани, тучные клетки, мезенхимальные клетки-предшественники и гемопоэтические ткани, также могут выступать в качестве источников образования очагов ГО. Кроме того, имеются данные об участии клеток эндоневрия в развитии эктопической костной ткани [16, 17].

В настоящее время активно изучается влияние различных патологических состояний на истощение пула МСК. В исследовании А. Ahmed и соавт. [18] наглядно продемонстрировано, что процесс естественного старения организма значительно снижает остеогенный потенциал МСК и направляет их дифференцировку в сторону адипогенеза. Сниженный остеогенный потенциал МСК приводит к уменьшению реакции последних на ГО-стимулирующие факторы и, как следствие, к образованию меньших объемов очагов ГО. Доказано, что активность SMAD- и NF- κ B- сигнальных путей в МСК старых мышей резко снижена [19]. Необходимо отметить, что не только старение организма,

но и ожирение, диета с высоким содержанием жиров, сахарный диабет 2-го типа также влияют на функциональную активность МСК. Гипергликемия и гиперинсулинемия влияют на микроокружение МСК, тем самым вызывая их истощение и дисфункцию [20–22]. С другой стороны, усиленный адипогенез увеличивает концентрацию лептина, который участвует в регуляции и стимуляции процесса остеогенеза [23]. Так, по мнению Н. Jiang и соавт. [24] высокие концентрации лептина могут вызывать спонтанное формирование очагов ГО. Авторы считают, что такой эффект лептина на развитие ГО связан с активацией щелочной фосфатазы и белка остеокальцина, активирующих остеогенный mTORC1-внутриклеточный сигнальный путь.

Первым этапом формирования очага ГО является процесс воспаления, возникающий в ответ на различные ГО-индуцирующие факторы (травмы, ожоги, оперативные вмешательства, черепно-мозговая травма и т.д.) [25–27]. Присутствие клеток воспаления в периваскулярной области очага ГО связано с повреждением и гипоксией ткани, которые являются стимулирующими факторами пролиферации недифференцированных клеток-предшественников [28]. Схема патогенеза ГО представлена на **рисунке**.

В процесс ГО вовлечены некоторые важнейшие внутриклеточные сигнальные пути. В очаг локального воспаления привлекается множество типов клеток, включая стволовые клетки или клетки-предшественники. Тем не менее молекулярные механизмы, вовлеченные в процесс ГО, по-прежнему остаются малоизученной областью современной медицины. Разнообразие типов наследственных и приобретенных форм ГО, таких как ПОФ и ПОГ приводят к значительным трудностям в изучении общих молекулярных сигнальных путей, ответственных за образование эктопической костной ткани [29–31]. Тем не менее ряд внутриклеточных сигнальных путей, вовлеченных в молекулярный патогенез формирования очагов ГО, подробно изучены и обоснованы.

Костные морфогенетические белки (КМБ) являются членами суперсемейства трансформирующего фактора роста β (TGF- β), который участвует в эмбриогенезе и поддержании гомеостаза. [32]. КМБ-индуцированное образование костной ткани происходит не только в норме, но и при различных патологических состояниях [33]. Так, в исследовании В. Bouvard и соавт. [34] показано, что у пациентов с подтвержденным диагнозом ПОФ, выявлена высокая актив-

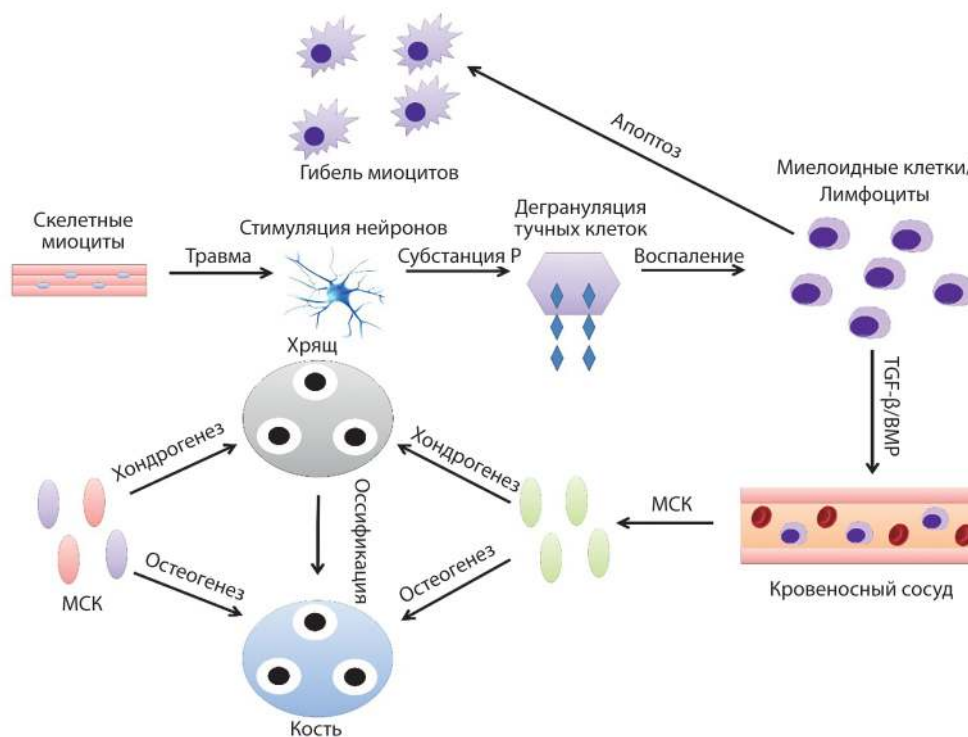


Рис. Схема патогенеза ГО: объяснение в тексте.

ность КМБ-связанных сигнальных путей в лимфоцитах. В сообщении Y. Wang и соавт. [35] отмечено, что у пациентов с черепно-мозговой травмой отмечается высокое содержание КМБ2 в сыворотке крови. Повышение содержания КМБ2, 4, 7, 9 в сыворотке крови животных также наблюдается при повреждении спинного мозга в эксперименте. По мнению M. Reichel и соавт. [36], КМБ9 отводится ключевая роль в молекулярном патогенезе формирования очагов ГО, а его активность напрямую зависит от микроокружения скелетной мускулатуры. Важно отметить, что у пациентов с уже имеющимися признаками ГО после выполнения операции тотального эндопротезирования тазобедренных суставов, отмечено значительное повышение экспрессии изоформы TGF- β 2. При этом, изменения экспрессии других изоформ TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 3) не выявлено [37].

Известно, что Hedgehog (НН)-сигнальные пути играют важнейшую роль в развитии скелета. Indian НН-сигнальный путь индуцирует дифференцировку хондроцитов, а sonic НН-путь ответственен за дифференцировку остеобластов [38]. Работа НН-сигнальной системы строго связана с несколькими факторами, в том числе и с функционированием КМБ-связанных сигнальных путей. Кроме того, НН-сигнальная система участвует в остеогенезе при переломах костей, путем регуляции процессов ангиогенеза и собственно формирования костной ткани [39, 40].

Также известно, что НН-сигнальные пути участвуют в молекулярном патогенезе развития и роста некоторых опухолей и ПОГ (вызванного нулевой мутацией гена GNAS, кодирующего белок G α s) [41]. В исследовании J. Regard и соавт. [42] показано, что в результате нулевой мутации гена GNAS, активность НН-сигнальных путей в подкожных мезенхимальных клетках-предшественниках и стромальных клетках костного мозга значительно увеличивается. Результаты указанного исследования позволяют объяснить молекулярный патогенез фиброзной дисплазии, при которой отмечается усиление экспрессии гена GNAS и активация WNT/ β -катенин-сигнального клеточного пути, а также патогенез образования эктопической костной ткани при ПОГ, при котором имеет место нулевая мутация гена GNAS и повышенная активация НН-сигнальной системы. Белок G α s выступает в качестве основного регулирующего агента дифференцировки остеобластов, за счет поддержания баланса между активностью WNT/ β -катенин- и НН-сигналинами [43]. Учитывая особенности молекулярного патогенеза ПОГ, применение ингибиторов НН-сигнальной системы или Gli-ингибиторов представляется весьма

перспективным направлением профилактики и лечения данного заболевания.

Гипоксией индуцированный фактор 1- α (HIF-1 α) — это ключевой транскрипционный фактор клеточного ответа на возникшую гипоксию. Гипоксия стимулирует хондрогенную дифференцировку клеток. Клетки формирующегося скелета в эмбриональном периоде лишены кровеносных сосудов и во время индукции ангиогенеза ингибируется хондро- и скелетогенез [44, 45]. Нарушение регуляции работы HIF-1 α вовлечено во многие физиологические и патофизиологические процессы, в том числе и в формирование эктопической костной ткани. Изучая экспериментальную модель ГО на лабораторных крысах S. Winkler и соавт. [46] показали, что уровни HIF-1 α и транскрипционного фактора SOX9 значительно повышаются во время хондрогенной дифференцировки клеток и снижаются в остеогенную стадию. Более того, H. Wang и соавт. [47] доказали наличие корреляционной зависимости между воспалением, гипоксией и их ролью у пациентов с ПОФ. Авторы исследования наглядно доказали, что клеточная гипоксия способствует развитию гетеротопической энхондральной оссификации, за счет активации КМБ-связанных сигнальных путей с помощью белка рабаптин 5 (RABEP1). В недавнем наблюдении S. Agarwal и соавт. [48] отмечено, что HIF-1 α участвует в образовании костных эктопий как при врожденной, так и при приобретенной формах ГО.

Лечение и профилактика ГО Как правило, наиболее распространенными методами лечения и профилактики развития эктопической костной ткани являются фармакотерапия и лучевая терапия. Среди наиболее эффективных лекарственных средств, препятствующих развитию очагов ГО, выступают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (НПВС). Эффективность НПВС в профилактике развития эктопической костной ткани доказана многими исследованиями, однако данная группа лекарственных средств лишена специфичности своего действия. В настоящее время изучается эффективность применения лекарственных средств, селективно ингибирующих активность SMAD-КМБ-сигнального пути, ответственного за дифференцировку МСК [49]. Тем не менее, применение НПВС в комплексе с лучевой терапией является стандартом лечения и профилактики формирования очагов ГО, несмотря на отсутствие единых клинических рекомендаций. Более того, применение НПВС с целью профилактики развития очагов ГО может быть обосновано только в рамках «офф-лейбл» терапии [50].

Эффективность применения НПВС в профилактике развития очагов ГО обусловлена ограничением ло-

кального воспаления в мягких тканях, возникающего при действии различных факторов. Профилактическое использование НПВС широко распространено в травматологии и ортопедии, спинальной хирургии, нейрохирургии и общей хирургии [51–54].

Необходимо отметить, что эффективность применения НПВС зависит от стадии формирования очагов ГО. Так, наибольшая эффективность данной группы лекарственных средств отмечается на ранних стадиях развития эктопической костной ткани, и практически неэффективна при уже сформированных очагах ГО [55]. По мнению E. Rakos и соавт. [56] и G. Pavlou и соавт. [57] эффективность применения НПВС в профилактике развития костных эктопий сопоставима с лучевой терапией, а их комбинированное использование значительно улучшают клинический результат. В исследовании J. Rivera и соавт. [58] показано, что местное применение НПВС также является эффективным способом профилактики развития очагов ГО.

В зависимости от ингибирования изоферментов циклооксигеназы, НПВС классифицируются на селективные и неселективные. Клиническая эффективность применения неселективных НПВС доказана в систематическом обзоре B. Neal и соавт. [59]. Авторы наглядно продемонстрировали, что применение неселективных НПВС позволяет достоверно снизить распространенность ГО у пациентов после выполнения операции тотального эндопротезирования тазобедренных суставов на 57 %.

Лучевая терапия подавляет дифференцировку МСК по остеогенному пути, тем самым снижая репаративную активность костной ткани и развитие аномальной кости. В наблюдении A. Jensen и соавт. [60]

отмечено, что статистически значимые различия в частоте встречаемости ГО при использовании лучевой терапии в пред- и раннем послеоперационном периоде у пациентов, которым выполнены оперативные вмешательства на височно-нижнечелюстном суставе отсутствуют. Тем не менее исследователи утверждают, что скорость развития ГО при использовании лучевой терапии в предоперационном периоде значительно меньше. В рандомизированном контролируемом клиническом исследовании J. Liu и соавт. [61] показано, что наиболее эффективная профилактическая доза ионизирующего излучения составляет 700 сГр. В настоящее время доказана клиническая эффективность применения лучевой терапии в профилактике развития очагов ГО у пациентов, которым выполнены оперативные вмешательства на позвоночнике, коленных, тазобедренных, височно-нижнечелюстных суставах, а также у пациентов с нейрогенной ГО после перенесенных травм спинного мозга [62–65].

Потенциальные терапевтические цели. В настоящее время наиболее перспективным способом лечения ГО является воздействие на SMAD-КМБ-сигнальные пути, изученные на животных моделях формирования очагов эктопической костной ткани [66]. Воздействие на указанный сигнальный внутриклеточный путь возможно с помощью агонистов рецепторов ретиноевой кислоты, антагонистов КМБ и веществ, влияющих на фосфорилирование SMAD. Также изучаются эффекты влияния акцепторов свободных радикалов и ингибиторов ангиогенеза [67, 68] (табл.).

Рецепторы ретиноевой кислоты (RAR), представленные в виде трех изоформ (RAR α , RAR β и RAR γ), выступают в роли ингибиторов хондрогенеза. Стиму-

Основные фармакологические агенты, применяемые в терапии ГО

Фармакологический агент	Механизм действия
Кромоллин-натрий	За счет стабилизации мембран тормозит дегрануляцию тучных клеток, препятствуя освобождению из них гистамина, брадикинина, медленно реагирующей субстанции аллергии и других медиаторных веществ
Ретиноевая кислота	Действуя на RAR снижает активность КМБ-ассоциированных внутриклеточных сигнальных путей, тем самым, подавляя процесс хондрогенеза
Дорсоморфин	Связывает и препятствует фосфорилированию рецептора активин-подобной киназы 2 типа (ALK2)
LDN-193189	Связывает и препятствует фосфорилированию рецептора активин-подобной киназы 2 типа (ALK2)
PX-478	Снижает активность HIF-1 α
RP-6758	Небелковый антагонист вещества P, тормозит дегрануляцию тучных клеток
CD15350	Действуя на RAR γ снижает активность КМБ-ассоциированных внутриклеточных сигнальных путей, тем самым, подавляя процесс хондрогенеза
NRX204647	Действуя на RAR γ снижает активность КМБ-ассоциированных внутриклеточных сигнальных путей, тем самым, подавляя процесс хондрогенеза

ляция RAR может быть вызвана его агонистами: активной неселективной формой витамина А и селективным агонистом RAR γ , полученного из мезенхимальной клеточной культуры *in vitro*. При этом, блокирование рецепторов RAR α и RAR β не приводит к ингибированию хондрогенеза. Эффективность применения агонистов RAR изучена в экспериментальной модели ПОФ у мышей [69]. Исследователями отмечено, что использование селективного агониста RAR γ обеспечивает полное ингибирование процесса образования очагов ГО у исследуемой группы животных. Авторами также отмечено, что введение селективного агониста RAR γ способствует снижению интенсивности передачи сигналов КМБ за счет фосфорилирования SMAD1/5/8 и, возможно, их прямого разрушения в протеосомах. В результате указанных молекулярных взаимодействий происходит нарушение процесса дифференцировки МСК по пути остеогенеза.

Другим возможным способом лечения ГО, направленного на снижение активности SMAD-КМБ-сигнального пути за счет снижения уровня фосфора, содержащегося в клетке в виде АДФ и АТФ. Фосфорилирование SMAD1/5/8 приводит к дифференцировке МСК в хондроциты. В исследовании J. Peterson и соавт. [25] отмечено, что местное применение апиразы, гидролизующей АДФ и АТФ, в экспериментальной модели ГО, позволяет снизить интенсивность образования эктопической костной ткани при отсутствии явлений остеопении. G. Pavlou и соавт. [57] в эксперименте на животных моделях ГО, изучили эффективность ингибитора КМБ1 – LDN-193189, который существенно уменьшал интенсивность дифференцировки МСК по остеогенному пути.

Noggin – это универсальный антагонист КМБ, позволяющий эффективно предупреждать развитие ГО. Так, в эксперименте D. Hannallah и соавт. [70] доказана эффективность noggin, который доставлялся внутрь клетки с помощью вирусного вектора и подавлял экспрессию КМБ4 и, как следствие, снижал интенсивность формирования очагов эктопической костной ткани. Однако ингибиторы КМБ обладают широким спектром нежелательных явлений, что не позволяет внедрить их в широкую клиническую практику.

Использование акцепторов свободных радикалов также является весьма перспективным методом лечения ГО. Свободные радикалы представляют собой высокоактивные нестабильные атомы, молекулы или ионы, способствующие окислительному повреждению клеток и развитию очагов ГО. L. Vanden Bossche и соавт. [71] в своем исследовании показали, что комбинированное применение аллопуринола

и N-ацетилцистеина позволяет эффективно препятствовать развитию ГО, наряду с системным применением глюкокортикостероидных гормонов (метилпреднизолон).

Известно, что гипоксический фактор играет ключевые роли в патогенезе различных форм ГО. В случае нормоксии, белки пролилгидроксилазного домена расщепляют субъединицы HIF-1 α . Фармакологическое ингибирование HIF-1 α в клетках пациентов с ПОФ значительно снижает активность КМБ-ассоциированных сигнальных путей. Аналогичный эффект от ингибирования HIF-1 α получен в экспериментальной модели ГО у мышей [72]. Фармакологическое ингибирование HIF-1 α с помощью PX-478 или рапамицина снижает интенсивность образования очагов ГО [73]. Антигипоксический эффект гидроксиэтилкрахмала также способствует снижению интенсивности процесса образования эктопической костной ткани в экспериментальной модели ГО у мышей.

Заключение. Таким образом, ГО представляет собой сложный процесс взаимодействия целого ряда биологически активных веществ и внутриклеточных сигнальных молекул. Особая роль в развитии эктопической костной ткани отводится КМБ-ассоциированным и HH-сигнальным системам, способствующим дифференцировке МСК по пути остеогенеза. Селективное воздействие на работу указанных сигнальных систем представляет собой перспективное направление молекулярной таргетной терапии пациентов с различными формами ГО. Тем не менее необходимы дополнительные лабораторные и клинические исследования, направленные на изучение молекулярных механизмов формирования очагов ГО. Несомненно, понимание указанных механизмов позволит разработать новые способы терапевтического воздействия на ГО и уже в ближайшем будущем внедрить полученные результаты в широкую клиническую практику.

Литература

(п.п. 1-3; 5-68 см. References)

4. Бывальцев В.А., Пестряков Ю.Я., Шепелев В.В., Степанов И.А. Влияние гетеротопической оссификации на клинические и рентгенологические исходы после тотальной артропластики поясничных межпозвонковых дисков протезом «М6-Л»: мультицентровое исследование. *Хирургия позвоночника*. 2017; 14(4): 69-75.

References

1. Xu R., Hu J., Zhou X., Yang Y. Heterotopic ossification: Mechanistic insights and clinical challenges. *Bone*. 2018; 109: 134-42.
2. Ohlmeier M., Suero E.M., Aach M., Meindl R., Schildhauer T.A., Citak M. Muscle localization of heterotopic ossification following

- spinal cord injury. *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*. 2017; 17(10): 1519-22.
3. Lewis P.C., Camou E., Wofford K. The Impact of Cigarette Smoking on the Formation of Heterotopic Ossification Among Service Members With a Traumatic Amputation. *Military medicine*. 2017; 182(5): e1742-e8.
 4. Byvaltsev V.A., Pestrjakov Yu.Ya., Shepelev V.V., Stepanov I.A. The influence of heterotopic ossification on clinical and radiological outcomes after total lumbar disc replacement with M6-L prosthesis: a multicenter study. *Khirurgiya pozvonochnika*. 2017; 14(4): 69-75. (in Russian)
 5. Lewis P.C., Camou E., Wofford K. The Impact of Cigarette Smoking on the Formation of Heterotopic Ossification Among Service Members With a Traumatic Amputation. *Military medicine*. 2017; 182(5): e1742-e8.
 6. Pavey G.J., Qureshi A.T., Tomasino A.M., Honnold C.L., Bishop D.K., Agarwal S., et al. Targeted stimulation of retinoic acid receptor-gamma mitigates the formation of heterotopic ossification in an established blast-related traumatic injury model. *Bone*. 2016; 90: 159-67.
 7. Pavlou G., Salhab M., Murugesan L., Jallad S., Petsatodis G., West R., et al. Risk Factors for Heterotopic Ossification in Primary Total Hip Arthroplasty. *HIP International*. 2012; 22(1): 50-5.
 8. Legosz P., Pulik L., Stepinski P., Janowicz J., Wirkowska A., Kotela A., et al. The Use of Type I Collagen Cross-Linked C-Telopeptide (CTX-1) as a Biomarker Associated with the Formation of Periprosthetic Ossifications Following Total Hip Joint Arthroplasty. *Ann Clin Lab Sci*. 2018; 48(2): 183-90.
 9. Łęgosz P., Sarzyńska S., Pulik Ł., Stepiński P., Niewczas P., Kotela A., et al. Heterotopic ossification and clinical results after total hip arthroplasty using the anterior minimally invasive and anterolateral approaches. *Archives of Medical Science*. 2018; Ahead of print.
 10. Cafasso D.E., Bowen D.K., Kinkennon S.A., Stanbro M.D., Kellicut DC. Heterotopic ossifications in chronic venous insufficiency: a new consideration for clinical, aetiology, anatomy and pathophysiology staging. *Phlebology*. 2013; 28(7): 361-5.
 11. Hoyt B.W., Pavey G.J., Potter B.K., Forsberg J.A. Heterotopic ossification and lessons learned from fifteen years at war: A review of therapy, novel research, and future directions for military and civilian orthopaedic trauma. *Bone*. 2018; 109: 3-11.
 12. Wang C., Meng H., Wang X., Zhao C., Peng J., Wang Y. Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Osteoblasts and Adipocytes and its Role in Treatment of Osteoporosis. *Med Sci Monit*. 2016; 22: 226-33.
 13. Lees-Shepard J.B., Goldhamer D.J. Stem cells and heterotopic ossification: Lessons from animal models. *Bone*. 2018; 109: 178-86.
 14. Downey J., Lauzier D., Kloen P., Klarskov K., Richter M., Hamdy R., et al. Prospective heterotopic ossification progenitors in adult human skeletal muscle. *Bone*. 2015; 71: 164-70.
 15. Kan C., Chen L., Hu Y., Ding N., Li Y., McGuire T.L., et al. Gli1-labeled adult mesenchymal stem/progenitor cells and hedgehog signaling contribute to endochondral heterotopic ossification. *Bone*. 2018; 109: 71-9.
 16. Takashima Y., Era T., Nakao K., Kondo S., Kasuga M., Smith A.G., et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*. 2007; 129(7): 1377-88.
 17. Olmsted-Davis E.A., Salisbury E.A., Hoang D., Davis E.L., Lazard Z., Sonnet C., et al. Progenitors in Peripheral Nerves Launch Heterotopic Ossification. *Stem Cells Transl Med*. 2017; 6(4): 1109-19.
 18. Ahmed A.S., Sheng M.H., Wasnik S., Baylink D.J., Lau K.W. Effect of aging on stem cells. *World J Exp Med*. 2017; 7(1): 1-10.
 19. Peterson J.R., Eboda O.N., Brownley R.C., Cilwa K.E., Pratt L.E., De La Rosa S., et al. Effects of aging on osteogenic response and heterotopic ossification following burn injury in mice. *Stem cells and development*. 2015; 24(2): 205-13.
 20. Tencerova M., Figeac F., Ditzel N., Taipaleenmäki H., Nielsen T.K., Kassem M. High-Fat Diet-Induced Obesity Promotes Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue and Impairs Skeletal Stem Cell Functions in Mice. *J Bone Miner Res*. 2018; 33(6). doi:10.1002/jbmr.3408.
 21. Kim H., Han J.W., Lee J.Y., Choi Y.J., Sohn Y.D., Song M., et al. Diabetic Mesenchymal Stem Cells Are Ineffective for Improving Limb Ischemia Due to Their Impaired Angiogenic Capability. *Cell transplantation*. 2015; 24(8): 1571-84.
 22. Ulum B., Teker H.T., Sarikaya A., Balta G., Kuskonmaz B., Uckan-Cetinkaya D., et al. Bone marrow mesenchymal stem cell donors with a high body mass index display elevated endoplasmic reticulum stress and are functionally impaired. *Journal of cellular physiology*. 2018. DOI: 10.1002/jcp.26804
 23. Xu J.C., Wu G.H., Zhou L.L., Yang X.J., Liu J.T. Leptin improves osteoblast differentiation of human bone marrow stroma stem cells. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2016; 20(16): 3507-13.
 24. Jiang H., Chen Y., Chen G., Tian X., Tang J., Luo L., et al. Leptin accelerates the pathogenesis of heterotopic ossification in rat tendon tissues via mTORC1 signaling. *Journal of cellular physiology*. 2018; 233(2): 1017-28.
 25. Peterson J.R., De La Rosa S., Eboda O., Cilwa K.E., Agarwal S., Buchman S.R., et al. Treatment of heterotopic ossification through remote ATP hydrolysis. *Science translational medicine*. 2014; 6(255): 255ra132.
 26. Genet F., Kulina I., Vaquette C., Torossian F., Millard S., Pettit A.R., et al. Neurological heterotopic ossification following spinal cord injury is triggered by macrophage-mediated inflammation in muscle. *J Pathol*. 2015; 236(2): 229-40.
 27. Dey D., Wheatley B.M., Cholok D., Agarwal S., Yu P.B., Levi B., et al. The traumatic bone: trauma-induced heterotopic ossification. *Transl Res*. 2017; 186: 95-111.
 28. Convente M.R., Chakkalakal S.A., Yang E., Caron RJ, Zhang D, Kambayashi T, et al. Depletion of Mast Cells and Macrophages Impairs Heterotopic Ossification in an Acvr1(R206H) Mouse Model of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *J Bone Miner Res*. 2018; 33(2): 269-82.
 29. Bouvard B., Masson C., Legrand E., Audran M. Fibrodysplasia ossificans progressiva. A case report and focus on the BMP signaling pathway. *Morphologie*. 2016; 100(331): 250-5.
 30. Wang Y.K., Sun W.F., Liu X.G., Deng J., Yan B.E., Jiang W.Y, et al. [Comparative study of serum levels of BMP-2 and heterotopic ossification in traumatic brain injury and fractures patients]. *Zhongguo Gu Shang*. 2011; 24(5): 399-403.
 31. Reichel L.M., Salisbury E., Moustoukas M.J., Davis A.R., Olmsted-Davis E. Molecular mechanisms of heterotopic ossification. *J Hand Surg Am*. 2014; 39(3): 563-6.
 32. Toom A., Arend A., Gunnarsson D., Ulfspärre R., Suutere S., Haviko T., et al. Bone formation zones in heterotopic ossifications: histologic findings and increased expression of bone morphogenetic protein 2 and transforming growth factors beta2 and beta3. *Calcif Tissue Int*. 2007; 80(4): 259-67.

33. Suutre S., Toom A., Arend A., Selstam G. Bone tissue content of TGF-beta2 changes with time in human heterotopic ossification after total hip arthroplasty. *Growth Factors*. 2009; 27(2): 114-20.
34. Shore E.M., Xu M., Feldman G.J., Fenstermacher D.A., Cho T.J., Choi I.H., et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet*. 2006; 38(5): 525-7.
35. Pacifici M. Acquired and congenital forms of heterotopic ossification: new pathogenic insights and therapeutic opportunities. *Curr Opin Pharmacol*. 2018; 40: 51-8.
36. Rosenberg N., Bull A.M.J. Simulating localised cellular inflammation and substrate properties in a strain energy density based bone remodelling algorithm for use in modelling trauma. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*. 2018; 21(3): 208-18.
37. Regard J.B., Malhotra D., Gvozdenovic-Jeremic J., Josey M., Chen M., Weinstein L.S., et al. Activation of Hedgehog signaling by loss of GNAS causes heterotopic ossification. *Nat Med*. 2013; 19(11): 1505-12.
38. Alman B.A. The role of hedgehog signalling in skeletal health and disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2015; 11(9): 552-60.
39. Kazmers N.H., McKenzie J.A., Shen T.S., Long F., Silva M.J. Hedgehog signaling mediates woven bone formation and vascularization during stress fracture healing. *Bone*. 2015; 81: 524-32.
40. Cairns D.M., Pignolo R.J., Uchimura T., Brennan T.A., Lindborg C.M., Xu M., et al. Somitic disruption of GNAS in chick embryos mimics progressive osseous heteroplasia. *J Clin Invest*. 2013; 123(8): 3624-33.
41. Winkler S., Niedermair T., Fuchtmeier B., Grifka J., Grassel S., Anders S., et al. The impact of hypoxia on mesenchymal progenitor cells of human skeletal tissue in the pathogenesis of heterotopic ossification. *Int Orthop*. 2015; 39(12): 2495-501.
42. Wang H., Lindborg C., Lounev V., Kim J.H., McCarrick-Walmsley R., Xu M., et al. Cellular Hypoxia Promotes Heterotopic Ossification by Amplifying BMP Signaling. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2016; 31(9): 1652-65.
43. Agarwal S., Loder S.J., Brownley C., Eboda O., Peterson J.R., Hayano S., et al. BMP signaling mediated by constitutively active Activin type 1 receptor (ACVR1) results in ectopic bone formation localized to distal extremity joints. *Dev Biol*. 2015; 400(2): 202-9.
44. Winkler S., Craiovan B., Wagner F., Weber M., Grifka J., Renkawitz T. Pathogenesis and prevention strategies of heterotopic ossification in total hip arthroplasty: a narrative literature review and results of a survey in Germany. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2015; 135(4): 481-9.
45. Beckmann J.T., Wylie J.D., Kapron A.L., Hanson J.A., Maak T.G., Aoki S.K. The Effect of NSAID Prophylaxis and Operative Variables on Heterotopic Ossification After Hip Arthroscopy. *The American journal of sports medicine*. 2014; 42(6): 1359-64.
46. Beckmann J.T., Wylie J.D., Potter M.Q., Maak T.G., Greene T.H., Aoki S.K. Effect of Naproxen Prophylaxis on Heterotopic Ossification Following Hip Arthroscopy: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2015; 97(24): 2032-7.
47. Nunley R.M., Zhu J., Clohisey J.C., Barrack R.L. Aspirin decreases heterotopic ossification after hip resurfacing. *Clinical orthopaedics and related research*. 2011; 469(6): 1614-20.
48. Vavken P., Castellani L., Sculco T.P. Prophylaxis of heterotopic ossification of the hip: systematic review and meta-analysis. *Clinical orthopaedics and related research*. 2009; 467(12): 3283-9.
49. Winkler S., Wagner F., Weber M., Matussek J., Craiovan B., Heers G., et al. Current therapeutic strategies of heterotopic ossification--a survey amongst orthopaedic and trauma departments in Germany. *BMC musculoskeletal disorders*. 2015; 16: 313.
50. Aubut J.A., Mehta S., Cullen N., Teasell R.W., Group E., Scire Research T. A comparison of heterotopic ossification treatment within the traumatic brain and spinal cord injured population: An evidence based systematic review. *NeuroRehabilitation*. 2011; 28(2): 151-60.
51. Pakos E.E., Stafilas K.S., Tsekeris P.G., Politis A.N., Mitsionis G., Xenakis T.A. Combined radiotherapy and indomethacin for the prevention of heterotopic ossification after total hip arthroplasty. *Strahlenther Onkol*. 2009; 185(8): 500-5.
52. Pavlou G., Kyrkos M., Tsiologiannis E., Korres N., Tsiridis E. Pharmacological treatment of heterotopic ossification following hip surgery: an update. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2012; 13(5): 619-22.
53. Rivera J.C., Hsu J.R., Noel S.P., Wenke J.C., Rathbone C.R. Locally Delivered Nonsteroidal Antiinflammatory Drug: A Potential Option for Heterotopic Ossification Prevention. *Clinical and translational science*. 2015; 8(5): 591-3.
54. Neal B.C., Rodgers A., Clark T., Gray H., Reid I.R., Dunn L., et al. A systematic survey of 13 randomized trials of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of heterotopic bone formation after major hip surgery. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 2000; 71(2): 122-8.
55. Jensen A.W., Viozzi C.F., Foote R.L. Long-term results of radiation prophylaxis for heterotopic ossification in the temporomandibular joint. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2010; 68(5): 1100-5.
56. Liu J.Z., Frisch N.B., Barden R.M., Rosenberg A.G., Silverton C.D., Galante J.O. Heterotopic Ossification Prophylaxis After Total Hip Arthroplasty: Randomized Trial of 400 vs 700 cGy. *The Journal of arthroplasty*. 2017; 32(4): 1328-34.
57. Milakovic M., Popovic M., Raman S., Tsao M., Lam H., Chow E. Radiotherapy for the prophylaxis of heterotopic ossification: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2015; 116(1): 4-9.
58. Boffeli T.J., Pfannenstien R.R., Thompson J.C. Radiation therapy for recurrent heterotopic ossification prophylaxis after partial metatarsal amputation. *The Journal of foot and ankle surgery: official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*. 2015; 54(3): 345-9.
59. Cipriano C., Pill S.G., Rosenstock J., Keenan M.A. Radiation therapy for preventing recurrence of neurogenic heterotopic ossification. *Orthopedics*. 2009; 32(9).
60. Davis J.A., Roper B., Munz J.W., Achor T.S., Galpin M., Choo A.M., et al. Does Postoperative Radiation Decrease Heterotopic Ossification After the Kocher-Langenbeck Approach for Acetabular Fracture? *Clinical orthopaedics and related research*. 2016; 474(6): 1430-5.
61. Jensen A.W., Viozzi C.F., Foote R.L. Long-term results of radiation prophylaxis for heterotopic ossification in the temporomandibular joint. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2010; 68(5): 1100-5.
62. Museler A.C., Grasmucke D., Jansen O., Aach M., Meindl R., Schildhauer T.A., et al. In-hospital outcomes following single-dose radi-

- ation therapy in the treatment of heterotopic ossification of the hip following spinal cord injury-an analysis of 444 cases. *Spinal cord*. 2017; 55(3): 244-6.
63. Gallieni M., Martini A., Fusaro M. Warfarin and heterotopic ossification: good, bad or ugly? *Spinal cord*. 2011; 49 (3): 483; author reply 4.
64. Shimono K., Tung W.E., Macolino C., Chi A.H., Didizian J.H., Mundy C., et al. Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor-gamma agonists. *Nature medicine*. 2011; 17(4): 454-60.
65. Hannallah D., Peng H., Young B., Usas A., Gearhart B., Huard J. Retroviral delivery of Noggin inhibits the formation of heterotopic ossification induced by BMP-4, demineralized bone matrix, and trauma in an animal model. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2004; 86-a(1): 80-91.
66. Vanden Bossche L.C., Van Maele G., Wojtowicz I., Bru I., Decorte T., De Muynck M., et al. Free radical scavengers versus methylprednisolone in the prevention of experimentally induced heterotopic ossification. *J Orthop Res*. 2009; 27(6): 748-51.
67. Zimmermann S.M., Schwitter L.W., Scheyerer M.J., Jentsch T., Simmen H.P., Werner C.M. Prevention of heterotopic ossification: an experimental study using a plasma expander in a murine model. *BMC Surg*. 2016; 16(1): 29.
68. Agarwal S., Loder S., Brownley C., Cholok D., Mangiavini L., Li J., et al. Inhibition of Hif1alpha prevents both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113(3): E338-47.

Сведения об авторах:

Степанов Иван Андреевич, ассистент каф. общей хирургии и анестезиологии Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: stepanovivanneuro@mail.ru;

Белобородов Владимир Анатольевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. общей хирургии и анестезиологии Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: BVA555@yandex.ru;

Шамеева Мария Анатольевна, студентка 6-го курса лечебного факультета Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: marishameeva@mail.ru.

© Пальцын А.А., 2020

УДК 616-092

Пальцын А.А.

Остеокальцин

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;
ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, 123995, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1

В качестве общего итога современных биомедицинских исследований стало привычным обнаруживать корреляционные связи «всего со всем». Четверть вековая история изучения остеокальцина – пример, подтверждающий эту тенденцию. За 25 лет научный статус вещества прогрессирует от белка с неизвестной функцией, просто присутствующего на второй по содержанию позиции в кости, до остеокина с влиянием, распространяющимся далеко за морфологические и узко определяемые функциональные границы кости, демонстрирующего, что кость через остеокальцин влияет на многие стороны жизни – в том числе на энергетический обмен, развитие и функцию мозга, репродуктивную способность. Известные сегодня свойства остеокальцина делают его перспективным объектом геронтологического изучения.

Ключевые слова: остеокальцин; кость; мозг; мышцы; физические нагрузки.

Для цитирования: Пальцын А.А. Остеокальцин. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 111-116.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.111-116

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 12.01.2020

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Paltsyn A.A.

Osteocalcin

Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia;
Russian Medical Academy of Postgraduate Education,
Barikadnaya Str. 2/1, Moscow 125315, Russia.

As a general outcome of modern biomedical research, it has become customary to discover relationships “of everything with everything”. A quarter-century history of studying osteocalcin is an example of this trend. For 25 years, the scientific status of this substance has progressed from a protein with an unknown function that is nothing but the second most concentrated substance in bones to an osteokine, which extends its influence far beyond the morphological and one-dimensionally understood functional boundaries of the bone. It has become clear that osteocalcin mediates effects of the bone on multiple aspects of life, including energy metabolism, brain development and function, and reproduction. The state-of-the-art knowledge about osteocalcin properties makes it a promising object of gerontological study.

Keywords: osteocalcin; bone; brain; muscle; physical exercise.

For citation: Paltsyn A.A. Osteocalcin. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2020; 64(2): 111-116. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.111-116

For correspondence: Alexander A. Paltsyn, Doctor of Biological Sciences, Professor, Laureate of the USSR State Prize, Principal Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: lrrp@mail.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 12.01.2020

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

В августе 1996 г. журнал «Nature» опубликовал статью [1] с результатами исследования созданной авторами линии мутантных мышей, лишенных белка — остеокальцина (ОК-/-), наиболее обильного среди коллагеновых белков остеобластов, но с неизвестной на тот момент функцией. Фенотипически мутантные животные отличались более массивным скелетом. Так появились в науке первые сведения об ОК как ингибиторе функции остеобластов. Работу, выполненную в Техасском университете, подписали 12 авторов. Обращаю внимание на последнего — Gerard Karsenty. Он главный герой этой статьи, что однако не найдет отражения в списке литературы, так как в библиографии принято указывать не более 6 авторов статьи, а Karsenty часто подписывает статью последним.

Кости ОК(-/-) животных имели нормальное строение при рождении, но становились более массивными и плотными к возрасту 6 мес. Вывод авторов — функция ОК (белка, содержащего 49 аминокислотных остатков, активного в недекарбоксилированной форме) ограничивать массив формируемой кости без нарушения резорбции и минерализации. Сегодня известно множество функций ОК и вероятно будут ещё открываться неизвестные пока функции [2]. У молодых млекопитающих ОК секретируется остеобластами в больших количествах в экстрацеллюлярный матрикс кости. Экспрессия кодирующих его генов синхронна с началом минерализации костей. ОК(-/-) мыши позднее достигают половой зрелости и раньше утрачивают репродуктивную способность в сравнении с животными дикого типа [2]. Кость — вторая (после мышц, а может быть, третья — после мышц и кожи) по объему ткань тела, уникальна присутствием остеокластов — клеток, главная функция которых разрушение костной ткани. В других тканях подобных клеток нет. Из этого факта следует другая феноменальная особенность кости — самая твердая ткань отличается повышенной сравнительно с другими тканями пластичностью, «текучестью» — способностью, оставаясь твердой, быстро менять архитектуру соответственно изменениям величины и направления нагрузки. Сознание противится этому, но жесткость кости совмещается с большой пластичностью, постоянной и высокой скоростью перестраивания. Это позволяет кости наравне с мышцами выполнять самую энергозатратную, самую быстро изменяемую (если забыть о мозге) функцию — движение. И хотя движение связано с постоянным, быстрым и очень значительным смещением различных частей тела относительно друг друга, после прекращения движения, благодаря костям, форма тела остается неизменной. Типичные для каждого вида формы тела животных определяются скелетом.

Необходимость энергообеспечения движения позволила обосновать предположение, что кость может быть эндокринным органом, регулирующим энергетический обмен и ряд других физиологических функций. Предположение подтвердилось. Скелет оказался эндокринным органом, влияющим на различные проявления энергетического обмена. Большой международный коллектив с участием Karsenty доказал, что скелет регулирует энергетический обмен посредством ОК, влияя на гомеостаз сахаров [3]. Расположить регуляторные связи организма по схеме первичные-вторичные сложно, или даже невозможно. Так, через 3 года после предыдущей публикации [3] тем же коллективом (Колумбийский университет) тоже в Cell (и тоже с Karsenty на последней позиции) представлена статья [4], где доказано, что сигналы инсулина в остеобластах активируют синтез и секрецию гормона ОК, который способствует метаболизму глюкозы.

Секреция клетками скелета ОК зависит от концентрации в крови инсулина и текущих энергозатрат. На этот процесс влияет также концентрация лептина, глюкокортикоидов и тонус симпатической нервной системы [5]. Эндокринные функции ОК этим не ограничиваются, его недостаточность способствует ожирению и снижает плодовитость, по крайней мере у мышей. У самцов с низким уровнем ОК обнаруживают гипотестостеронемия, снижение концентрации сперматозоидов, массы эпидидимисов и семенников. У старых мужчин и женщин с прекращением функции половых желез снижается масса костной ткани. [2]. Культуральная среда остеобластов усиливает экспрессию инсулина островками поджелудочной железы и экспрессию адипонектина адипоцитами. При диабете 1-го типа содержание жира обратно пропорционально концентрации остеокальцина [6]. Кость — вторая по массе, но по значению не менее важная, чем первая — мышцы, железа внутренней секреции. В природе всё гармонично. Поскольку эти две железы — физическая (структурная) основа движения, они же и главные участники энергетического метаболизма, потребители глюкозы, инсулинзависимые ткани, регуляторы кальций-фосфорного гомеостаза, регуляторы массы самих желез и репродуктивной функции организма. Мыши с нарушенной секрецией остеобластами остеокальцина отличаются замедленной пролиферацией β -клеток, инсулинорезистентностью, снижением толерантности к глюкозе, меньшей концентрацией адипонектина. Есть и другие свидетельства того, что ОК является гормоном, а кость, соответственно, «железой» внутренней секреции. Супернатант культуры остеобластов стимулирует секрецию инсулина островковой тканью и секрецию адипо-

нектин адипоцитами. Действие специфично. Секреция других гормонов островковой ткани и адипоцитов не изменяется в присутствии ОК. Супернатант остеокальцин-дефицитных остеобластов такого эффекта не вызывает [7]. ОК стимулирует секрецию инсулина β -клетками *in vitro* и поджелудочной железой *in vivo* через рецептор GPRC6A [8].

Особый интерес представляет взаимодействие «костного гормона» с мышцами, в осуществлении главной функции костей и мышц — движении. Аэробные нагрузки (бегущая дорожка — тредмил тест) повышают концентрацию ОК в крови почти в два раза. Остеокальцин оказывает действие на миофибриллы через рецептор — GPRC6A усиливая поглощение глюкозы из крови и процесс гликолиза в миофибриллах. Мыши, лишённые GPRC6A в β -клетках, не синтезируют инсулин и не чувствительны к глюкозе [9]. Экзогенный ОК (внутрибрюшинная инъекция) увеличивает физическую активность молодых мышей, а у старых (15-месячных) повышают способность к выполнению нагрузки (время и расстояние в тредмил-тесте) до уровня 3-месячных. Иными словами, нивелирует возрастное снижение физических способностей и даже позволяет вернуть «молодую силу» [10]. ОК увеличивает мышечную массу у старых животных [11]. Наглядно получается, что созданный костью гормон «работает» в мышцах, устраняя их возрастную слабость [12].

Физическая нагрузка стимулирует секрецию в остеобластах костей ОК, а в мышцах IL-6, что способствует поглощению и метаболизму глюкозы и жирных кислот миофибриллами. Действие ОК вызывает в миофибриллах распад гликогена до глюкозы — энергетической основы, «топлива» для сокращения. Этот эффект ОК усиливается его благоприятным действием на поглощение и катаболизм жирных кислот. Таким образом, связь мышечного IL-6 с костным ОК оказывается важным инструментом, обеспечивающим согласование событий в скелете и мускулатуре при движении. Пока известны 3 синергичных механизма такой связи. ОК ускоряет захват и катаболизм глюкозы и жирных кислот миофибриллами. Ускоряется распад гликогена до глюкозы. Увеличиваемая нагрузкой концентрация IL-6 способствует резорбции ОК из кости. Результатом становится совместное согласованное повышение концентрации этих двух главных стимуляторов энергетического обеспечения движения. Понятно, что сказанное не исключает возможности IL-6 и ОК благоприятно влиять на адаптационное действие нагрузок другими, пока неизвестными, механизмами [2]. Важно, что создается взаимосвязь между костью и мышцей, оптимизирующая выполнение двигательной функции [13].

Чтобы сохранить гомеостаз, интенсификация обмена при работе значительного массива мышц осуществляется, по-сути, всеми тканями организма, конечно, согласованная работа такого комплекса участников возможна только при отрегулированном межорганным взаимодействии. Некоторое (далеко неполное) представление о сложности этой регуляции демонстрирует список известных сегодня миокинов, длинный, но тем не менее, не исчерпывающий их реальное число. Тканью, не менее мышц нагруженной физической работой, является кость — не только опорный, но и эндокринный, как представлено выше, орган — столь же важный, как мышцы в осуществлении движения. Таким образом, кость обеспечивает движение не только механически как опорная ткань, но и как обязательный участник энергетического обмена [14]. Медиатор обмена — ОК способен спасти животных от экспериментального диабета 2-го типа [15]. На β -клетки поджелудочной железы и клетки в других тканях ОК действует через рецептор GPRC6A. Жизненно важной «другой тканью» с рецепторами GPRC6A являются мышечные волокна. Они отвечают на связывание ОК с GPRC6A сокращениями, катаболизмом нутриентов (глюкозы, жирных кислот) и АТФ, продукцией и секрецией миокинов, в том числе IL-6 — стимулятора синтеза ОК остеобластами [13]. Таким образом, круг замыкается: IL-6 стимулирует синтез ОК, а ОК стимулирует синтез IL-6. Сравнительно недавно было показано, что ОК стимулирует катаболизм и функцию мышечных волокон и в отсутствие IL-6 [16].

Скелет, а конкретно ОК, оказался вовлеченным в способность млекопитающих уклоняться от опасности, в механизм развития острого стресс-ответа — acute stress response (ASR). Воздействие различного типа стрессоров на мышей, крыс и людей ведет к быстрому селективному выбросу в циркуляцию ОК, способствующего ASR. Стрессор включает сигнал к ингибированию парасимпатических нейронов, т.е. удаляет противовес стрессовой — симпатической импульсации [17].

Давно известное влияние пола на скелет оказалось, по крайней мере, для мужчин, двусторонним. Нельзя точно сказать, когда люди заметили отличие мужского скелета от женского, но вероятно «срок известности» этого факта измеряется тысячами веков. Противоположный факт, — что скелет существенно влияет на мужские половые характеристики — тысячекратно моложе. Об этом сообщалось в статье, опубликованной в Cell в 2011 г., где показана способность остеобластов и, конкретно, ОК индуцировать продукцию тестостерона в семенниках (клетках Лейдига), но не продукцию эстрогена в яичниках, где нет рецепторов к ОК [18].

Первое указание на связь ОК с работой мозга было замечено уже в первом исследовании этой проблемы, опубликованном в *Nature* в 1996 г. [1]. Признак проявлялся физической пассивностью ОК(-/-) мышей. Позже обнаружено, что ОК(-/-) мыши отличаются от гетерозиготных сверстников меньшим объемом мозга, повышенной тревожностью, сниженной обучаемостью и памятью, неспособностью найти платформу в водном лабиринте Морриса [19]. Морфологическая недостаточность структур мозга ОК(-/-) животных особенно выражена в зубчатой извилине (меньше нормы на 30%), а также в мозолистом теле – часто рудиментарном или даже отсутствующим у таких особей [20]. Этими авторами представлены доказательства эндокринного действия ОК. Остеокальцин проникает через ГЭБ и связывается с нейронами ствола мозга, среднего мозга, гиппокампа, стимулирует в них синтез моноаминовых нейромедиаторов, ингибируют синтез ГАМК, предотвращая тревожность и развитие депрессии и стимулируя обучение и память. При беременности материнский ОК проникает через плаценту и предотвращает апоптоз нейронов в период отсутствия у плода собственного ОК. У ОК дефицитных мышей развивается гипоплазия гиппокампа. Введение ОК беременным ОК(-/-) матерям нормализовало развитие гиппокампа, предотвращало апоптоз нейронов и устраняло дефицит памяти у потомков [21]. Иными словами, скелет через ОК определяет материнское влияние на развитие мозга плода и когнитивный статус потомства. ОК проникает через ГЭБ связывается нейронами ствола мозга, среднего мозга, гиппокампа, стимулирует синтез моноаминов, снижает тревожность и депрессию, благоприятно влияет на обучение и память [20, 22]. Интрацеребровентрикулярное введение взрослым животным ОК в дозе, исключающей существенное проникновение в общую циркуляцию, полностью исключает тревожность, дефекты памяти и нарушения экспрессии генов [19]. При болезни Паркинсона в эксперименте у крыс снижался уровень ОК в ликворе. Инъекции ОК устраняли двигательную дисфункцию, повышали активность тирозин гидроксилазы [23].

Есть материалы клинических исследований влияния ОК на интеллект. Международный коллектив врачей описал результаты [24] сравнительного анализа связи концентрации нескольких биологически активных компонентов плазмы с когнитивными показателями у старых (74.4 ± 3.3 года) и молодых (23.4 ± 2.7) клинически здоровых женщин. Обнаружили статистически достоверную положительную связь концентрации ОК с исполнительной функцией и общим интеллектом у старых женщин. Изучение микроструктуры мозга по

данным МРТ и нейропсихологического статуса тех же людей обнаружило связь ухудшения этих показателей со снижением концентрации ОК в крови [25].

Мыши ОК(-/-) отличаются сниженным на 20-50% содержанием моноаминов: серотонина, дофамина, норадреналина в стволе и среднем мозге и повышением на 15-30% концентрации ГАМК [19]. Причинно-следственная связь этих изменений с ОК проверена двумя контролями. 1) Введение ОК в мозг интрацеребровентрикулярно устраняет тревожность, восстанавливает память и экспрессию генов. 2) Делеция гена ОК у взрослых мышей вызывает тревожность и дефекты памяти, хотя и менее выраженные, чем у ОК(-/-) мышей [19]. ОК связывается нейронами Аммонова рога (СА3), нейронами вентральной области покрышки, нейронами дорзального и медиального ядер шва [19].

Опубликованы клинические данные о зависимости от концентрации ОК уже не когнитивного статуса, а общего показателя здоровья. Представлен результат метаанализа связи концентрации ОК в сыворотке с индексом массы тела [26] (проанализированы сообщения, представленные до ноября 2016 года в PubMed и SCOPUS). Обнаружена высокая статистическая значимость обратной связи между этими показателями. Концентрация в крови ОК с возрастом быстро снижается. У женщин к 20–30 годам приблизительно до 1/3 молодежного уровня. У мужчин примерно такое же соотношение устанавливается к 45–50 годам и в дальнейшей жизни существенно не меняется [17]. Более раннее снижение концентрации ОК у женщин, по сравнению с мужчинами может быть причиной известного факта большей распространенности остеопороза среди женщин [27]. Значение ОК для мышечной работы и сравнительно раннее возрастное снижение его концентрации, конечно, пробуждают желание повышением концентрации ОК избавиться от старческой слабости мышц.

Важная, как все влияющее на ЦНС, функция ОК в мозге приобретает особую актуальность ролью в биологии старения. Многогранно положительная роль ОК в организме; указанное выше раннее (по современным меркам у молодых людей) снижение его концентрации; чуть позже начинающееся когнитивное увядание – эти факты увлекают мысль исследователей на гериатрическое использование ОК [25]. Введения ОК улучшали память и снижали тревожность у 16-месячных мышей. Генетические, электрофизиологические, молекулярные данные и исследования поведения позволили определить экспрессируемый нейронами СА3 области гиппокампа белок Gpr158 как рецептор действия ОК с участием в этом процессе BDNF. Авторы

считают, что эти факты открывают направление терапевтического использования ОК.

В статье от группы Karsenty сообщается, что инъекции плазмы 3-месячных мышей 16-месячным могут остановить у последних развитие многих возрастных изменений и даже вернуть животных к более раннему, более молодому состоянию синаптической мобильности структур гиппокампа и некоторых показателей когнитивной функции. Улучшались как функциональные, так и структурные (плотность расположения дендритных шипиков) характеристики. Улучшалась память, снижалась тревожность [28].

Группа Karsenty повторила это исследование и воспроизвела результаты. Но удалось повторение результатов только при использовании плазмы диких ОК(+/-) мышей. Введения плазмы 3-месячных ОК(-/-) животных омолаживающего действия не оказывало. Karsenty с сотрудниками дополнительно двумя способами контролировали свой эксперимент. В первом контроле не было обнаружено омолаживающего эффекта и при введении плазмы диких ОК(+/-) мышей, обработанной перед введением антителами против ОК. Второй контроль основывался на способности ОК проникать через гемато-энцефалический барьер. Мышам в возрасте 10 и 14 мес подкожно вшивали 2 вида мини-капсул: с ОК или только с растворителем для него. Результат наблюдали через 2 месяца. В обеих возрастных группах некарбосилированный ОК, в отличие от растворителя, избавлял животных от когнитивной недостаточности и тревожности [28]. В этой же работе содержится ещё интересный для понимания механизма нейрогенного действия ОК материал. Инъекция плазмы 3-месячной мыши увеличивает содержание BDNF в гиппокампе 16-месячной мыши. Эффект отсутствует, если плазма берется от ОК(-/-) 3-месячной мыши. Результат этого эксперимента переводит на молекулярный язык объяснение положительного (омолаживающего) действия ОК. Оказывается, ОК стимулирует образование BDNF. Иными словами, у ОК в мозге есть медиатор и этот медиатор не что иное, как вещество с многообразно положительным действием на многие функции нервной системы – BDNF. Этот факт не исключает существования других механизмов увеличения синаптической пластичности и гиппокамп-опосредованного повышения когнитивной способности у старых животных. Например, посредством тканевого ингибитора металлопротеиназ 2 (TIMP2), содержащегося в крови молодых мышей, пуловинной крови человека [29, 30].

Давно известная частая синхронность костной и когнитивной недостаточности у пожилых людей была предметом изучения международной группы врачей

[31]. В выборке участвовали молодые и старые мужчины и женщины без явной костной патологии. Авторы не нашли статистически значимой связи между минеральной плотностью кости и когнитивной функцией. У старых женщин обнаружена связь снижения когнитивности и исполнительной функции со снижением в плазме уровня ОК и других, влияющих на кость пептидов: остеопротегерина, остеоопонтина, паратиреоидного гормона и FGF23. Высказывается мнение, что, эффективность таких анализов удастся повысить персонализированным медицинским обслуживанием, опирающимся на молекулярные профили: эпигеномный, транскриптомный, протеомный, метаболомный и прочие [32].

Итак, сегодня обращаясь к теме ОК, мы обнаруживаем часто складывающуюся в науке ситуацию. Придуманый по первому впечатлению о явлении термин – остеокальцин: т.е. вещество, влияющее на содержание в кости кальция, стал выражать в результате последующих исследований длинный список дополнительных явлений. Остеокальцин – пептидный гормон с ауто-, пара- и эндокринной регуляцией гомеостаза костной ткани. Он улучшает память и другие проявления когнитивной способности, способствует адаптации мышц к физическим нагрузкам, пролиферации β -клеток поджелудочной железы, секреции инсулина и адипонектина и повышению мужской фертильности. Остеокальцин становится важным объектом клинических исследований, критерием эффективности терапевтических технологий.

Литература

(п.п. 1-26; 28-31 см. References)

27. Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х. Перспективы применения пептидного биорегулятора для профилактики и лечения возраст-ассоциированных заболеваний опорно-двигательного аппарата. *Патогенез*. 2019; 17(2): 13-24.
32. Кайшева А.Л., Гришин Д.В., Каменский П.А., Федорончук Т.В., Мальсагова К.А., Чойнзонов Е.Л. и др. Современные направления развития постгеномных медицинских технологий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(3): 95-105.

References

1. Ducey P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996; 382(6590): 448-52.
2. Karsenty G, Olson EN. Bone and muscle endocrine functions: Unexpected paradigms of inter-organ communication *Cell*. 2016; 164(6): 1248–56.
3. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 2007; 130(3): 456–69.
4. Ferron M1, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*. 2010; 142(2): 296-308.

5. Ferron M, Lacombe J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 561, 137–46.
6. Takashi Y, Ishizu M, Mori H, Miyashita K, Sakamoto F, Katakami N. Circulating osteocalcin as a bone-derived hormone is inversely correlated with body fat in patients with type 1 diabetes. *PLoS One.* 2019; 14(5): e0216416.
7. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.* 2007; 130: 456–46.
8. Min Pi, Yunpeng Wu, and L Darryl Quarles. GPRC6A Mediates Responses to Osteocalcin in β -Cells In Vitro and Pancreas In Vivo. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(7): 168.
9. Wei J, Hanna T, Suda N, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin promotes beta-cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. *Diabetes.* 2014; 63: 1021–31.
10. Mera P, Laue K, Ferron M, Confavreux C, Wei J, Galán-Díez M. et al. Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise. *Cell Metab.* 2016; 23(6): 1078–92.
11. Mera P, Laue K, Wei J, Berger JM, Karsenty G, Osteocalcin is necessary and sufficient to maintain muscle mass in older mice. *Mol Metab.* 2016; 5(10): 1042–7.
12. Baskin KK, Winders BR, Olson EN. Muscle as a “mediator” of systemic metabolism. *Cell Metab.* 2015; 21: 237–48.
13. Karsenty G, Mera P. Molecular bases of the crosstalk between bone and muscle. *Bone.* 2018; 115: 43–9.
14. Wei J, Hanna T, Suda N, Karsenty G, Ducy P, Osteocalcin promotes beta-cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. *Diabetes.* 2014; 63(3) 1021–103.
15. Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P, Karsenty G, Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone.* 2012; 50 (2) 568–575.
16. Mera P, Laue K, Ferron M, Confavreux C, Wei J, Galan- Díez M, et al. Osteocalcin signaling in myofibers is necessary and sufficient for optimum adaptation to exercise. *Cell Metab.* 2016; 25 (1): 218.
17. Berger JM, Singh P, Khirimian L, Morgan DA, Chowdhury S, Arteaga-Solis et al. Mediation of the Acute Stress Response by the Skeleton. *Cell Metab.* 2019; 30(5): 890-902.
18. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE et al. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell.* 2011; 144(5): 796-809.
19. Obri A, Khirimian L, Karsenty G, Oury F. Osteocalcin in the brain: from embryonic development to age-related decline in cognition. *Nat Rev Endocrinol.* 2018; 14(3): 174–82.
20. Oury F, Khirimian L, Denny C.A, Gardin A, Chamouni A, Goeden N. et al. Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell.* 2013; 155: 228–41.
21. Oury F, Ferron M, Huizhen W, Confavreux C, Xu L, Lacombe J. et al. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *J Clin Invest.* 2013; 123: 2421–33.
22. Khirimian L, Obri A, Ramos-Brossier M, Rousseaud A, Moriceau S, Nicot A. et al. Gpr158 mediates osteocalcin’s regulation of cognition. *J Exper Med.* 2017; 214(10): 2859–73.
23. Xing-zhi Guo, Chang Shan, Yan-fang Hou, Geng Zhu, Bei Tao, Li-hao Sun et al. Osteocalcin Ameliorates Motor Dysfunction in a 6-Hydroxydopamine-Induced Parkinson’s Disease Rat Model Through AKT/GSK3 β Signaling. *Front Mol Neurosci.* 2018; 11: 343.
24. Bradburn S, McPhee JS, Bagley L, Sipila S, Stenroth L, Vincenzo M. et al. Association between osteocalcin and cognitive performance in healthy older adults. *Age Ageing.* 2016; 45(6): 844–9.
25. Puig J, Blasco G, Daunis-i-Estadella J, Moreno M, Molina X, Alberich-Bayarri A. et al. Lower Serum Osteocalcin Concentrations Are Associated With Brain Microstructural Changes and Worse Cognitive Performance. *Clin Endocrinol.* 2016; 84(5): 756-63.
26. Kord-Varkaneh H, Djafarian K, Khorshidi M, Shab-Bidar S. Association Between Serum Osteocalcin and Body Mass Index: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Endocrine.* 2017; 58(1): 24–32.
27. Ryzhak G.A., Popovich I.G., Khavinson V.Kh. Prospects for using peptide bioregulators for prevention and treatment of age-associated diseases of the musculoskeletal system. *Patogenez (Pathogenesis).* 2019; 17(3): 13-24. (in Russian)
28. Khirimian L, Obri A, Ramos-Brossier M, Rousseaud A, Moriceau S, Nicot AS et al. Gpr158 mediates osteocalcin’s regulation of cognition. *J Exp Med.* 2017; 214 (10), 2859-2873.
29. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, Castellano JM, Mosher KI, Luo J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med.* 2014; Jun; 20(6): 659–63.
30. Castellano JM, Mosher KI, Abbey RJ, McBride AA, James ML, Berdnik D, et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature.* 2017; 544(7651): 488–92.
31. Bradburn S, McPhee JS, Bagley L, Sipila S, Stenroth L, Vincenzo Narici M. et al. Association Between Osteocalcin and Cognitive Performance in Healthy Older Adults. *Age Ageing.* 2016; 45(6): 844-9.
32. Kaysheva A.L., Grishin D.V., Kamenski P.A., Fedoronchuk T.V., Choynzonov., Lisitsa A.V. Current directions in development of postgenomic medical technologies. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2018; 62(3): 95-105. (in Russian)

Сведения об авторах:

Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр. НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.12–008.331.1:577.11

Туйзарова И.А.¹, Свеклина Т.С.², Козлов В.А.¹, Сардинов Р.Т.²

Роль кальция и витамина D в формировании артериальной гипертензии

¹ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»,
428015, г. Чебоксары, Россия, Московский проспект, д. 15;

²ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»,
194044, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Лебедева, д. 6

В ряде последних эпидемиологических и ретроспективных исследований представлены доказательства роли кальция и витамина D в развитии артериальной гипертензии и связанной с ней сердечной недостаточностью. Дефицит витамина D, который может встречаться у 82,5% населения, и связанное с ним нарушение обмена кальция, эпидемиологи расценивают как пандемию. **Цель обзора** – систематизация современных сведений о роли кальциевого гомеостаза и дефицита витамина D в формировании артериальной гипертензии. В обзоре литературы рассмотрены вопросы связи артериальной гипертензии с плазменными концентрациями кальция и холекальциферолов. Анализ данных литературы свидетельствует, что у молодых людей стойкое повышение артериального давления ассоциировано с высокими плазменными концентрациями Ca²⁺, а у пожилых, особенно лиц с остеопорозом – с низкими. Циркадианные колебания плазменных концентраций кальция совпадают с изменением величины артериального давления. Данные ряда проспективных исследований и метаанализов о связи артериальной гипертензии и низких концентраций холекальциферолов в крови подтверждены экспериментами на мышах с нокаутированным геном рецептора витамина D. Низкие концентрации витамина D в плазме крови сопровождаются уменьшением высвобождения оксида азота, поэтому предполагают, что витамин D является эндокринным регулятором ренин-ангиотензиновой системы. Дефицит витамина D осложняет течение заболеваний, ассоциированных с артериальной гипертензией (хроническая сердечная недостаточность, сахарный диабет второго типа, ожирение). Вне зависимости от географического места проживания у значительной части населения наблюдается дефицит холекальциферолов в крови. Уменьшение плазменных концентраций холекальциферолов у пожилых людей, особенно сочетанное с остеопорозом, ассоциируется с инсулинорезистентностью и АГ. Дефицит витамина D во время беременности и концентрации ниже 11 нг/мл при рождении и 25 нг/мл в раннем детстве увеличивают риск высокого систолического давления более чем в 1,5 раза. **Заключение:** результаты нескольких независимых метаанализов убедили авторов в необходимости включения активных форм витамина D в плановую терапию артериальной гипертензии.

Ключевые слова: артериальная гипертензия; кальций; холекальциферол; витамин D; нейромедиаторы; хроническая сердечная недостаточность.

Для цитирования: Туйзарова И.А., Свеклина Т.С., Козлов В.А., Сардинов Р.Т. Роль кальция и витамина D в формировании артериальной гипертензии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 117-123.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.117-123

Для корреспонденции: Козлов Вадим Авенурович, e-mail: pooh12@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция исследования – Козлов В.А., Свеклина Т.С., Туйзарова И.А.; сбор и обработка материала – Козлов В.А., Свеклина Т.С., Туйзарова И.А., Сардинов Р.Т.; написание текста – Козлов В.А., Свеклина Т.С., Туйзарова И.А.; редактирование – Туйзарова И.А., Сардинов Р.Т.

Поступила 20.09.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Tausarova I.A.¹, Sveklina T.S.², Kozlov V.A.¹, Sardinov R.T.²

The role of calcium and vitamin D in arterial hypertension

¹I.N. Ulyanov Chuvash State University,
Moskovsky Prospekt 15, Cheboksary 428015, Russia

²S.M. Kirov Military Medical Academy,
Akademika Lebedeva Str. 6, St. Petersburg 194044, Russia

Several recent epidemiological and retrospective studies have provided evidence for the role of calcium and vitamin D in development of hypertension and related heart failure. Epidemiologists regard as a pandemic the vitamin D deficiency, which may occur

in 82.5% of the population and be associated with calcium metabolism disorders. **The aim** of the review was to systematize current information about the role of calcium homeostasis and vitamin D deficiency in the development of hypertension. The review addresses the relationship of blood pressure (BP) with plasma concentrations of calcium and cholecalciferols. In young people, a persistent BP elevation correlates with high plasma concentrations of Ca^{2+} whereas in the elderly, particularly those with osteoporosis, high BP correlates with low Ca^{2+} . Circadian fluctuations of plasma calcium parallel changes in BP. A number of prospective studies and meta-analyses has reported a relationship of hypertension and low blood cholecalciferols. These results were confirmed by experiments on knockout mice lacking the vitamin D receptor gene. Low plasma concentrations of vitamin D are associated with decreased release of nitric oxide, which suggests that vitamin D is an endocrine regulator of the renin-angiotensin system. Vitamin D deficiency complicates the course of diseases associated with hypertension (chronic heart failure, type 2 diabetes, obesity). Regardless of the geographical location of the residence, a significant part of the population has a shortage of cholecalciferols in the blood. Decreased plasma concentrations of cholecalciferols in the elderly, particularly in combination with osteoporosis, is associated with insulin resistance and hypertension. Vitamin D shortage during pregnancy and its concentrations <11 ng/ml at birth and <25 ng/ml in early childhood increase the risk of high systolic BP more than 1.5 times. **Conclusion:** Results of several independent meta-analyses warrant the inclusion of active forms of vitamin D into regimens of antihypertensive treatment.

Keywords: arterial hypertension; calcium; cholecalciferol; vitamin D; neurotransmitters; chronic heart failure.

For citation: Tausarova I.A., Sveklina T.S., Kozlov V.A., Sardinov R.T. The role of calcium and vitamin D in arterial hypertension. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 117-123. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.117-123

For correspondence: Kozlov V.A., e-mail: pooh12@yandex.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Contribution: the concept and design of the study — Kozlov V.A., Sveklina T.S.

Tausarova I.A.; collection and processing of material — Kozlov V.A., Sveklina T.S., Tausarova I.A., Sardinov R.T.; writing a text — Kozlov V.A., Sveklina T.S., Tausarova I.A.; editing — Tausarova I.A., Sveklina T.S., Kozlov V.A., Sardinov R.T.

Information about authors:

Tausarova I.A., <https://orcid.org/0000-0001-7246-5868>

Kozlov V.A., <https://orcid.org/0000-0001-7488-1240>

Sveklina T.S., <https://orcid.org/0000-0001-9546-7049>

Sardinov R.T., <https://orcid.org/0000-0002-5402-3975>

Received 20.09.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Введение

Увеличение продолжительности жизни и связанные с этим проблемы старения являются общемировым трендом. Как известно из математики, положительный тренд имеет свойство переходить в отрицательную фазу. В медицине перелом тренда может быть связан с недооценкой роли кумуляции неблагоприятных средовых факторов, каждый из которых сам по себе незначителен, но действующие вместе в течение жизни приводят к лавинообразному нарастанию поломок. Очевидно, большинство проблем возраста базовой основой имеют хроническую нарастающую клеточную гипоксию и накопление недоокисленных продуктов катаболизма. Также очевидно, что гипоксия часто вызвана локальными и общими нарушениями гемодинамики и проницаемости сосудов. Одной из важных причин этого может являться хронический прижизненный дефицит гормонально активных кальциферолов, вызванный недостатком инсоляции, де-

фектами привычных (этнических) диет, проживанием в закрытых помещениях, ношением одежды. Согласно данным эпидемиологических исследований, дефицит кальциферолов может наблюдаться у 80% населения. Между тем роль дефицита группы естественных гормонов, каковыми являются кальциферолы в целом, остается недостаточно изученной, тогда как возрастной остеопороз уже вышел на четвертое место среди основных причин смерти связанных с старением организма [1].

Из результатов эпидемиологических исследований следует, что повышенные концентрации Ca^{2+} в сыворотке крови увеличивают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [2, 3], поэтому предполагается, что остеопороз и сердечно-сосудистые заболевания эпидемиологически связаны. Выявлена связь между низкими уровнями холекальциферола сыворотки и сердечно-сосудистыми заболеваниями, но примене-

ние холекальциферола на фоне его дефицита не предотвращало возникновение сердечно-сосудистых событий [3]. В некоторых когортных исследованиях β -адреноблокаторы и тиазиды у гипертоников на 20% снижали риск перелома проксимального отдела бедренной кости [4]. Связь остеопороза с патологией сердечно-сосудистого континуума обусловлена тем, что вымытый из костной ткани Ca^{2+} остается в организме перераспределяясь в мягкие ткани. Увеличение цитоплазматической концентрации Ca^{2+} в гладких мышцах сосудов уменьшает эффективность естественных вазодилататоров, стойко повышает тонус гладких мышц артерий, увеличивая артериальное давление (АД) и постнагрузку.

Учитывая, что статистические закономерности вне зависимости от описываемых ими процессов имеют обыкновение сбываться, следует ожидать, что положительный тренд увеличения средней продолжительности жизни населения сменится отрицательным, если не будет разработан и внедрен в клиническую практику комплекс мер, направленных на поддержание положительного тренда. Проблема пожизненного пищевого дефицита регуляторно-активных веществ, в том числе кальциферолов, неоднократно обсуждалась как в отечественной, так и зарубежной литературе, тем не менее, она начинает приобретать характер вечно новой и вечно обсуждаемой, как тот лес, которого не видно за дровами. Логика клиницистов, считающих, что эффекта нет, если он не наблюдаем на малой группе людей в виде яркого события (эффект Лазаря), интересы фармакологических компаний, считающих, что не выгодно десятилетиями продавать одни и те же дешевые средства, не приносящие сверхприбыли, не приемлемы, если действительной заботой является здоровье населения в целом.

Цель публикации – систематизация известных сведений о роли кальциевого гомеостаза и дефицита витамина D в формировании артериальной гипертензии.

Связь плазменных концентраций Ca^{2+} с повышением АД и гипертонической болезнью. В исследовании ASCOT было установлено, что эффективность блокаторов кальциевых каналов и ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента при АГ [5] у пожилых людей зависит от суточных изменений концентрации Ca^{2+} . У 190 мужчин и женщин с АГ и неизменной функцией почек выявлено увеличение плазменных концентраций Ca^{2+} , фосфатов и паратиреоидного гормона [6]. Увеличение концентрации Ca^{2+} в сыворотке крови оказалось положительно связано с доклиническим поражением периферических артерий независимо от наличия классических сердечно-сосудистых факторов

риска. Относительный риск этой патологии составил 2,28 на каждый 1 мг/дл увеличения концентрации Ca^{2+} в сыворотке крови [7]. Поскольку концентрация Ca^{2+} в крови коррелирует с плазменными концентрациями витамина D, допустимо напомнить, что уменьшение плазменных концентраций холекальциферолов при хронической сердечной недостаточности наблюдается как правило, а не как исключение. Плазменные концентрации витамина D тесно связаны с увеличением частоты госпитализации и смертности от хронической сердечной недостаточности [8–10]. При обследовании 2023 подростков 12–17 лет сельских районов Северо-Восточного Китая высокая концентрация Ca^{2+} в сыворотке крови была положительно связана с детской артериальной гипертензией [11]. В другом исследовании 24-часовое амбулаторное АД положительно коррелировало с концентрацией Ca^{2+} в сыворотке крови у африканских мужчин моложе 43 лет [12]. У женщин с сахарным диабетом II типа и АГ найдена низкая плазменная концентрация Ca^{2+} , а минеральная плотность костей обратно коррелировала с систолическим АД и тяжестью инсулинорезистентности [13]. В исследовании NHANES III доказана взаимосвязь сывороточных концентраций кальцитриола и величиной АД [14]. Таким образом, нарушение концентрации Ca^{2+} в плазме изменяет АД, но у молодых людей стойкое повышение АД ассоциировано с высокой концентрацией Ca^{2+} , а у пожилых, особенно с остеопорозом, с низкой. Возрастные изменения, ассоциируемые с АГ, ишемической болезнью сердца, сахарным диабетом II типа [15], сопровождаются остеопенией и гиперкальциемией, как у женщин [16], так и мужчин, у последних наблюдаются более выраженные суточные колебания концентрации Ca^{2+} , ПТГ и остеокальцина [17], вызывая значительное перемещение Ca^{2+} из костей в мягкие ткани. Имбибиция мягких тканей Ca^{2+} делает их ригидными, а возбудимые ткани – более чувствительными к стимулирующим факторам. При сравнении концентраций Ca^{2+} у здоровых добровольцев у 6 человек с пограничной АГ и 29 человек с АГ установлена прямая связь между концентрациями Ca^{2+} и величиной АД [18]. Таким образом, возрастное нарушение гомеостаза Ca^{2+} , наряду с гормональным дисбалансом, является базовой основой формирования проблем сердечно-сосудистого континуума.

Циркадианные ритмы плазменной концентрации Ca^{2+} у больных АГ. Циркадианный ритм концентрации Ca^{2+} в сыворотке крови [19; 20] обеспечен бимодальным циркадианным ритмом паратиреоидного гормона, его первый пик приходится на интервал 3 ч 14 мин, второй – на 17 ч 26 мин [21]. Плазменные концентрации

белка, связывающего $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, и его свободной формы были максимальны в дневные часы и коррелировали с концентрациями паратиреоидного гормона [22]. Предполагают, что циркадианный ритм концентрации Ca^{2+} и паратиреоидного гормона необходим для компенсации изменений, вызванных поступлением Ca^{2+} с пищей [23]. Циркадианный ритм концентрации Ca^{2+} влияет на клиническую эффективность антигипертензивных препаратов с различным механизмом действия. В проспективном рандомизированном перекрестном исследовании у 46 «бессимптомных» пациентов с АГ антигипертензивные эффекты были более выражены у блокатора кальциевых каналов амлодипина, чем у ингибитора ангиотензин-превращающего фермента темокаприла в ночное время и утром, особенно у не-дипперов [24]. В других исследованиях амлодипин был также более эффективен в утренние и вечерние часы, особенно в отношении систолического, но не диастолического подъема АД [25, 26].

Влияние холекальциферола на формирование и течение АГ. Дефицит витамина D, характерный для всех возрастных групп, эпидемиологами расценивается как пандемия и основной фактор многих хронических заболеваний [27, 28]. Удивительно, но даже в странах с высокой годичной инсоляцией распространенность дефицита витамина D в выборке из 60979 человек составила 82,5% [28]. Плазменные концентрации витамина D значительно ниже у лиц с ожирением и плохим состоянием здоровья, артериальной гипертензией, низким уровнем липопротеинов высокой плотности. [29]. У молодых людей с ожирением, распространенность дефицита витамина D значительна, а АД выше, чем у их сверстников с нормальным индексом массы тела [30]. Дефицит витамина D у тучных больных вызван его депонированием в жировой клетчатке [26]. Повышение плазменных концентраций витамина D снижает АД. У 18 пациентов с мягкой формой АГ, облучавшихся ультрафиолетом 3 раза в неделю в течение 6 недель, плазменная концентрация $25(\text{OH})\text{D}$ увеличилась на 162%, а АД снизилось на 6 мм рт. ст. [31]. В другом исследовании витамин D 800 МЕ и 1200 мг Ca^{2+} снижали АД на 9,3% через 8 недель лечения. Прием Ca^{2+} в дозе 1200 мг без витамина D снижал АД только на 4% [32]. Аналогичные данные получены и в других работах, например, выявлена отрицательная корреляция между плазменными концентрациями витамина D и величиной АД: в группе с плазменными концентрациями $25(\text{OH})\text{D}$ выше 85,7 нмоль/л систолическое и диастолическое АД были на 3,0 и 1,6 мм рт. ст. ниже, чем в группе с плазменными концентрациями ниже 40 нмоль/л [33]. Результат подтвержден S. Pilz и

др. (2009), обнаруживших отрицательную корреляцию между плазменными концентрациями $25(\text{OH})\text{D}$ и АД [34]. В исследовании «Nurse's Health Study» дефицит витамина D с плазменной концентрацией $25(\text{OH})\text{D}$ ниже 30 нг/мл увеличивал риск АГ в 1,47 раза [35, 36]. Аналогичный эффект получен и в исследовании «Health Professional Follow Up Study», в котором риск АГ был выше у мужчин с дефицитом витамина D в 3,03 раза, а у женщин в 1,42 раза, чем в популяции [37]. A.G. Pittas и соавт. (2010) установили, что у лиц с наименьшей плазменной концентрацией $25(\text{OH})\text{D}$ риск развития АГ выше в 1,76 раза [38]. F. Carbone и соавт. (2014) изучали связь между плазменными концентрациями $25(\text{OH})\text{D}$ и риском развития АГ. Их метаанализ охватил 145486 обследованных, география метаанализа: США – 13 исследований, Китай – 3, Нидерланды – 2, из Австралии, Великобритании, Германии, Дании, Израиля, Испании, Италии, Норвегии, Пуэрто-Рико Финляндии, Франции, Швеции, Южной Кореи, – по одной публикации. В 25 публикациях из 32, установлено, что низкие плазменные концентрации $25(\text{OH})\text{D}$ коррелируют с увеличенным риском развития АГ, но в 7 исследованиях эта закономерность не обнаружена [39]. N.G. Fogouhi и соавт. (2008) при анализе 10-летнего риска развития АГ у больных с различной обеспеченностью витамином D также не выявили значимых различий [40]. Аналогичные результаты получены и при обследовании жителей Норвегии, у которых исходная плазменная концентрация $25(\text{OH})\text{D}$ не была связана с показателями АД [41].

Указанные противоречия могут быть вызваны различиями дизайна исследований, количества и возраста обследуемых, лабораторных методов обнаружения $25(\text{OH})\text{D}$. Проблема оценки корреляции статуса витамина D со смертностью и результатами лечения сердечно-сосудистых заболеваний – обратная причинно-следственная связь, обусловленная тем, что низкие плазменные концентрации витамина D могут быть индикатором плохого состояния здоровья и низкого уровня активности на открытом воздухе, что снижает синтез $25(\text{OH})\text{D}$. Во многих исследованиях $25(\text{OH})\text{D}$ определяли перед включением в исследование и не оценивали в динамике на фоне приема витамина D [26].

Отрицание роли холекальциферолов в патогенезе АГ тем более удивительно, что результаты крупных исследований, в том числе упомянутый метаанализ [39], доказывают связь дефицита холекальциферола со стойким повышением АД [33] и риском возникновения АГ [42, 43]. Отрицательные результаты антигипертензивной терапии с применением $25(\text{OH})\text{D}$ могли быть связаны с дефектами планирования экс-

перимента. Например, витамин D на фоне антигипертензивной терапии назначали вместе с препаратами Ca^{2+} — при этом не было получено снижения АД [44]. Но, базовая гипотеза участия кальциферолов в патогенезе АГ основана на том, что они восстанавливают нормальное распределение Ca^{2+} , возвращая его в костную ткань. Соответственно, этот эксперимент не мог увенчаться успехом, поскольку дополнительное поступление Ca^{2+} мешало возвращению Ca^{2+} из мягких тканей в кости. У людей устойчивое увеличение плазменных концентраций ренина и ангиотензина на фоне снижения плазменных концентраций $25(\text{OH})\text{D}$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ впервые выявлено в когортном обследовании 3316 пациентов [45]. В другом исследовании у лиц с ожирением и АГ с низкой плазменной концентрацией $25(\text{OH})\text{D}$ повышалась активность ренин-ангиотензиновой системы [46]. Эти же авторы обнаружили, что полиморфизм *FokI* гена рецептора витамина D и плазменные концентрации $25(\text{OH})\text{D}$ связаны с активностью ренина плазмы крови при АГ [47]. Низкие плазменные концентрации $25(\text{OH})\text{D}$ коррелируют с высокой активностью ренин-ангиотензиновой системы [2, 46, 48], которая снижается при назначении витамина D_3 [49]. Витамин D блокирует секрецию ренина независимо от гомеостаза Ca^{2+} и нарушений водно-солевого обмена, активируя собственные рецепторы. У трансгенных мышей с нокаутом гена рецептора *VDR-KO* уровни мРНК ренина и активность преренина плазмы уменьшались на 50% и 30%, соответственно, без значительного изменения АД и концентрации Ca^{2+} плазмы. В культуре юстагломерулярных клеток этих мышей концентрация ренина уменьшалась без участия Ca^{2+} или паратиреоидного гормона. Напротив, у трансгенных мышей с гиперэкспрессией рецептора *VDR-KO* в ренин-продуцирующих клетках наблюдается независимая от паратиреоидного гормона и гомеостаза Ca^{2+} блокада синтеза ренина кальцитриолом [50]. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ подавлял высвобождение ренина у мышей дикого типа [51]. Последующая работа выявила гипертрофию сердца у мышей с нокаутом рецептора витамина D, что доказывает прямой механизм предупреждения гипертрофии кардиомиоцитов кальцитриолом [52]. Поэтому $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ считают регулятором ренин-ангиотензиновой системы, уменьшающим плазменные концентрации ренина [53], а аналоги витамина D предложено использовать как ингибиторы ренина, аналогичные ингибиторам ангиотензин-превращающего фермента и антагонистам ангиотензиновых рецепторов у пациентов с гиперренинемией [26, 54].

В проспективном когортном исследовании 775 детей, продолжавшемся от рождения до 18 лет, было установлено, что у детей, родившихся от матерей с дефицитом витамина D в крови которых концентрация витамина D оставалась ниже 11 нг/мл при рождении и ниже 25 нг/мл в раннем детстве, от 3 до 6 лет риск высокого систолического АД был в 1,38 раза выше, по сравнению с детьми, у которых концентрации витамина D были в референтных пределах. К 18 годам риск у них возрастал до 1,59 раз [55].

Выводы:

1. Вне зависимости от географического места проживания у значительной части населения наблюдается дефицит холекальциферолов в крови.
2. Уменьшение плазменных концентраций холекальциферолов у пожилых людей, особенно сочетанное с остеопорозом, ассоциируется с инсулинорезистентностью и артериальной гипертонией.
3. Результаты независимых метаанализов убеждают в необходимости включения активных форм витамина D в плановую терапию артериальной гипертонии.

Литература/References

1. Johnell O., Kanis J.A., Oden A., Sernbo I., Redlund-Johnell I., Pettersson C., De Laet C., Jönsson B. Mortality after osteoporotic fractures. *Osteoporosis Int.* 2004; 15(1): 38-42. DOI: 10.1007/s00198-003-1490-4
2. Foley R.N., Collins A.J., Ishani A., Kalra P.A. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *American heart journal.* 2008; 156(3): 556-63. DOI: 10.1016/j.ahj.2008.05.016
3. Jorde R., Figenschau Y., Emaus N., Hutchinson M., Grimnes G. Serum 25-hydroxyvitamin D levels are strongly related to systolic blood pressure but not predict future hypertension. *Hypertension.* 2010; 55(3): 792-8. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.143990
4. Laroche M., Degboe Y., Blain H., Breuil V., Chapurlat R., Cortet B., Sutter B. Effect of drugs for osteoporosis on cardiovascular diseases and effect of cardiovascular drugs on osteoporosis. *Presse. Med.* 2017; 46(2, Pt 1): 159-64. DOI: 10.1016/j.lpm.2016.11.005.
5. Porreca E., Di Febbo C., Fusco L., Moretta V., Di Nisio M., Cucurullo F. Soluble thrombomodulin and vascular adhesion molecule-1 are associated to leptin plasma levels in obese women. *Atherosclerosis.* 2004; 172(1): 175-80.
6. Kanbay M., Isik B., Akcay A., Ozkara A., Karakurt F., Turgut F., et al. Relation between serum calcium, phosphate, parathyroid hormone and “nondipper” circadian bloodpressure variability profile in patients with normal renal function. *Am. J. Nephrol.* 2007; 27(5): 516-21. DOI: 10.1159/000107489
7. Kim H.J., Kim M.R., Park J.K., Lee Y.J., Park B. Higher Serum Calcium Levels Are Associated with Preclinical Peripheral Arterial Disease among the Apparently Healthy Individuals. *Korean J. Fam. Med.* 2018; 4: 1-5. DOI: 10.4082/kjfm.17.0035
8. Lugg S.T., Howells P.A., Thickett D.R. Optimal Vitamin D Supplementation Levels for Cardiovascular Disease Protection. *Dis Markers.* 2015; P. 864370. Available at: <https://www.hindawi.com/jour->

- nals/dm/2015/864370/ (Accessed 9 August 2015) DOI: 10.1155/2015/864370
9. Zittermann A., Schleithoff S.S., Koerfer R. Vitamin D insufficiency in congestive heart failure: why and what to do about it? *Heart Fail. Rev.* 2006; 11(1): 25-33. DOI: 10.1007/s10741-006-9190-8
 10. Zittermann A., Iodice S., Pilz S., Grant W.B., Bagnardi V., Gandini S. Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012; 95(1): 91-100. DOI: 10.3945/ajcn.111.014779
 11. Sun H., Shi J., Wang H., Fu L., Zhou B., Wu X., Dong W., Li H., Wang W. Association of serum calcium and hypertension among adolescents aged 12-17 years in the rural area of Northeast China. *Biol. Trace Elem. Res.* 2013; 155(3): 344-51. DOI: 10.1007/s12011-013-9805-6
 12. Schutte R., Huisman H.W., Schutte A.E., Malan N.T., van Rooyen J.M., Fourie C.M., Malan L. Serum calcium revisited: associations with 24-h ambulatory blood pressure and cardiovascular reactivity in Africans. *Hypertens. Res.* 2010; 33(7): 688-94. DOI: 10.1038/hr.2010.65
 13. Gotoh M., Mizuno K., Ono Y., Takahashi M. High blood pressure, bone-mineral loss and insulin resistance in women. *Hypertens. Res.* 2005; 28(7): 565-750. DOI: 10.1291/hypres.28.565
 14. Sabanayagam C., Teppala S., Shankar A. Markers of Sleep Disordered Breathing and Diabetes Mellitus in a Multiethnic Sample of US Adults: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey (2005-2008). *Intern. J. Endocrin.* 2012, Article ID 879134, 8 p. DOI: 10.1155/2012/879134
 15. Masood T., Kushwaha R.S., Singh R., Sailwal S., Pandey H., Varma A., Singh R.K., Cornelissen G. Circadian rhythm of serum 25 (OH) vitamin D, calcium and phosphorus levels in the treatment and management of type-2 diabetic patients. *Drug Discov Ther.* 2015; 9(1): 70-4. DOI: 10.5582/dtd.2015.01002
 16. McKane W.R., Khosla S., Egan K.S., Robins S.P., Burritt M.F., Riggs B.L. Role of calcium intake in modulating age-related increases in parathyroid function and bone resorption. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996; 81(5): 1699-703.
 17. Greenspan S.L., Dresner-Pollak R., Parker R.A., London D., Ferguson L. Diurnal variation of bone mineral turnover in elderly men and women. *Calcif. Tissue Int.* 1997; 60(5): 419-23.
 18. Hvarfner A., Larsson R., Mörlin C., Rastad J., Wide L., Akerström G., Ljunghall S. Cytosolic free calcium in platelets: relationships to blood pressure and indices of systemic calcium metabolism. *J. Hypertens.* 1988; 6(1): 71-7.
 19. Fijorek K., Püsküllüoğlu M., Tomaszewska D., Tomaszewski R., Glinka A., Polak S. Serum potassium, sodium and calcium levels in healthy individuals – literature review and data analysis. *Folia Med. Cracov.* 2014; 54(1): 53-70.
 20. Kanabrocki E.L., Sothorn R.B., Ryan M.D., Kahn S., Augustine G., Johnson C., et al. Circadian characteristics of serum calcium, magnesium and eight trace elements and of their metallo-moieties in urine of healthy middle-aged men. *Clin. Ter.* 2008; 159(5): 329-46.
 21. el-Hajj Fuleihan G., Klerman E.B., Brown E.N., Choe Y., Brown E.M., Czeisler C.A. The parathyroid hormone circadian rhythm is truly endogenous – a general clinical research center study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82(1): 281-6.
 22. Rejnmark L., Lauridsen A.L., Vestergaard P., Heickendorff L., Andreasen F., Mosekilde L. Diurnal rhythm of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D and vitamin D-binding protein in postmenopausal women: relationship to plasma parathyroid hormone and calcium and phosphate metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* 2002; 146(5): 635-42.
 23. Kurbel S., Radić R., Kotromanović Z., Puseljčić Z., Kratofil B. A calcium homeostasis model: orchestration of fast acting PTH and calcitonin with slow calcitriol. *Med. Hypotheses.* 2003; 61(3): 346-50.
 24. Eguchi K., Kario K., Shimada K. Effects of long-acting ACE inhibitor (temocapril) and long-acting Ca channel blocker (amlodipine) on 24-h ambulatory BP in elderly hypertensive patients. *J. Hum. Hypertens.* 2001; 15(9): 643-8. DOI: 10.1038/sj.jhh.1001252
 25. Nold G., Strobel G., Lemmer B. Morning versus evening amlodipine treatment: effect on circadian blood pressure profile in essential hypertensive patients. *Blood Press Monit.* 1998; 3(1): 17-25.
 26. Rammos G., Tseke P., Ziakka S. Vitamin D, the renin-angiotensin system, and insulin resistance. *Int. Urol. Nephrol.* 2008; 40(2): 419-26. DOI: 10.1007/s11255-007-9244-4
 27. Holick M.F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79(3): 362-71. DOI: 10.1093/ajcn/79.3.362
 28. Haq A., Svobodová J., Imran S., Stanford C., Razzaque M.S. Vitamin D deficiency: A single centre analysis of patients from 136 countries. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2016; 164: 209-13. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.02.007
 29. Hyppönen E., Power C. Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007; 85(3): 860-8. DOI: 10.1093/ajcn/85.3.860
 30. Kao K.T., Abidi N., Ranasinha S., Brown J., Rodda C., McCallum Z., et al. Low vitamin D is associated with hypertension in paediatric obesity. *J. Paediatr. Child. Health.* 2015; 51(12): 1207-13. DOI: 10.1111/jpc.12935
 31. Krause R., Buhning M., Hopfenmuller W., Holick M.F., Sharma A.M. Ultraviolet B and blood pressure. *The Lancet.* 1998; 352(9129): 709-10. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)60827-6
 32. Pfeifer M., Begerow B., Minne H.W., Nachtigall D., Hansen C. Effects of a short-term vitamin D3 and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.* 2001; 86(4): 1633-7. DOI: 10.1210/jcem.86.4.7393
 33. Scragg R., Sowers M., Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am. J. Hypertens.* 2007; 20(7): 713-9. DOI: 10.1016/j.amjhyper.2007.01.017
 34. Pilz S., Tomaschitz A., Ritz E., Pieber T.R. Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat. Rev. Cardiol.* 2009; 6(10): 621-30. DOI: 10.1038/nrcardio.2009.135
 35. Forman J.P., Curhan G.C., Taylor E.N. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension among young women. *Hypertension.* 2008; 52(5): 828-32. DOI: 10.1161/HYPERTENSION-AHA.108.117630
 36. Forman J.P., Giovannucci E., Holmes M.D., Bischoff-Ferrari H.A., Tworoger S.S., Willett W.C., Curhan G.C. Plasma 25-hydroxy vitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension.* 2007; 49(5): 1063-9. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.087288
 37. Forman J.P., Williams J.S., Fisher N.D. Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension.* 2010; 55(5): 1283-8. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.148619
 38. Porreca E., Di Febbo C., Fusco L., Moretta V., Di Nisio M., Cucurullo F. Soluble thrombomodulin and vascular adhesion molecule-1 are associated to leptin plasma levels in obese women. *Atherosclerosis.* 2004; 172(1): 175-80.

39. Carbone F., Mach F., Vuilleumier N., Montecucco F. Potential pathophysiological role for the vitamin D deficiency in essential hypertension. *World J. Cardiol.* 2014; 6(5): 260-76. DOI: 10.4330/wjc.v6.i5.260
40. Forouhi N.G., Luan J., Cooper A., Boucer B.J., Wareham N.J. Baseline serum 25-hydroxy vitamin D is predictive of future glycemic status and insulin resistance: The Medical Research Council Ely Prospective Study 1990-2000. *Diabetes.* 2008; 57(10): 2619-25. DOI: 10.2337/db08-0593
41. Jorde R., Sundsfjord J., Fitzgerald P., Bonna K.H. Serum calcium and cardiovascular risk factors and diseases: the Tromso study. *Hypertension.* 1999; 34(3): 484-90.
42. Burgaz A., Byberg L., Rautiainen S., Orsini N., Håkansson N., Arnlov J., et al. Confirmed hypertension and plasma 25(OH)D concentrations amongst elderly men. *J. Intern. Med.* 2011; 269(2): 211-8. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2010.02309.x
43. Burgaz A., Orsini N., Larsson S.C., Wolk A. Blood 25-hydroxyvitamin D concentration and hypertension: a meta-analysis. *J. Hypertens.* 2011; 29(4): 636-45. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32834320f9
44. Margolis K.L., Ray R.M., Van Horn L., Manson J.E., Allison M.A., Black H.R., et al. Women's Health Initiative Investigators. Effect of calcium and vitamin D supplementation on blood pressure: The Women's Health Initiative Randomized Trial. *Hypertension.* 2008; 52(5): 847-55. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.114991
45. Tomaschitz A., Pilz S., Ritz E., Grammer T., Drechsler C., Boehm B.O., März W. Independent association between 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and the renin-angiotensin system: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin. Chim. Acta.* 2010; 411(17-18): 1354-60. DOI: 10.1016/j.cca.2010.05.037
46. Vaidya A., Forman J.P., Williams J.S. Vitamin D and the vascular sensitivity to angiotensin II in obese Caucasians with hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 2011; 25(11): 672-8. DOI: 10.1038/jhh.2010.110
47. Vaidya A., Forman J.P., Seely E.W., Williams J.S. 25-hydroxyvitamin D is Associated with Plasma Renin Activity and the Pressor Response to Dietary Sodium Intake in Caucasians. *JRAAS.* 2011; 12(3): 311-9. DOI: 10.1177/1470320310391922
48. Vaidya A., Sun B., Forman J.P., Hopkins P.N., Brown N.J., Kotlarkar N.S., et al. The FokI vitamin D receptor gene polymorphism is associated with plasma renin activity in Caucasians. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2011; 74(6): 783-90. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2011.03991.x
49. Carrara D., Bernini M., Bacca A., Rugani I., Duranti E., Virdis A., et al. Cholecalciferol administration blunts the systemic renin-angiotensin system in essential hypertensives with hypovitaminosis D. *JRAAS.* 2014; 15(1): 82-7. DOI: 10.1177/1470320312471149
50. Kong J., Qiao G., Zhang Z., Liu S.Q., Li Y.C. Targeted vitamin D receptor expression in juxtaglomerular cells suppresses renin expression independent of parathyroid hormone and calcium. *Kidney International.* 2008; 74(12): 1577-81. DOI: 10.1038/ki.2008.452
51. Yan Chun Li, Juan Kong, Minjie Wei, Zhou-Feng Chen, Shu Q. Liu, Li-Ping Cao. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 2002; 110(2): 229-38. DOI: 10.1172/JCI15219
52. Simpson R.U., Hershey S.H., Nibelink K.A. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007; 103(3-5): 521-4. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2006.12.098
53. Li L., Yin X., Yao C., Zhu X., Wu X. Vitamin D, parathyroid hormone and their associations with hypertension in a Chinese population. *PLoS One.* 2012; 7: e43344. DOI: 10.1371/journal.pone.0043344
54. Beveridge L.A., Witham M.D. Vitamin D and the cardiovascular system. *Osteoporos Int.* 2013; 24(8): 2167-2180. DOI: 10.1007/s00198-013-2281-1
55. Wang G., Liu X., Bartell T.R., Pearson C., Cheng T.L., Wang X. Vitamin D Trajectories From Birth to Early Childhood and Elevated Systolic Blood Pressure During Childhood and Adolescence. *Hypertension.* 2019. 1: HYPERTENSIONAHA11913120. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13120

Сведения об авторах:

Туйзарова Ирина Алексеевна, врач терапевт БУ «БСМП», ассистент каф. факультетской и госпитальной терапии, Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, E-mail: irina_tuizarova@mail.ru;

Козлов Вадим Авенирович, доктор биол. наук, проф. каф. медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, E-mail: rooh12@yandex.ru;

Свеклина Татьяна Сергеевна, канд. мед. наук, ассистент каф. пропедевтики внутренних болезней, ФГБВОУ ВО ВМА им. С.М. Кирова МО РФ, e-mail: sveklina@rambler.ru;

Сардинов Руслан Тальгатович, канд. мед. наук, подполковник м/с, преподаватель 1 каф. (терапии усовершенствования врачей), ФГБВОУ ВО ВМА им. С.М. Кирова МО РФ, e-mail: 9117032134@mail.ru

Методика

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Денисова Ю.В.¹, Мандра Е.В.¹, Люндуп А.В.², Александров Л.С.¹, Ищенко А.И.¹, Никонов А.П.¹

Выбор оптимального метода повреждения матки при создании модели для проведения доклинических исследований

¹ ФGAOУBO «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

²АО «Национальная инжиниринговая корпорация», 105062, г. Москва, Россия, Лялин пер., д. 19/1

Проведение доклинических исследований для оценки безопасности и эффективности лекарственного средства является необходимым условием для его регистрации и внедрения в клиническую практику. Успех данных исследований во многом зависит от выбора животного и способа моделирования определенной патологии. В представленном обзоре методов анализируются данные по моделированию гинекологической патологии на лабораторных животных. В частности, рассмотрены методы воздействия, позволяющие моделировать синдром Ашермана, эндометриоз и хронический эндометрит. Поиск исследований производился в электронной библиотеке PubMed и базе клинических исследований Clinical Trials. В работе приводится характеристика используемых хирургических вмешательств, физических, химических и инфекционных методов нарушения целостности матки и формирования в органе воспалительного и спаечного процессов. Рассматривается возможность моделирования эндометриоза при помощи стрессового воздействия. Оценена эффективность применения данных стратегий и возможность их дальнейшего использования. Анализ литературы показал, что наиболее оптимальным вариантом для моделирования повреждения матки считается использование крыс-самок в возрасте от 5 до 8 нед. Наиболее воспроизводимым способом имитации патоморфологических механизмов внутриматочной адгезии является повреждение эндометрия 95-процентным этанолом. Наиболее универсальным способом моделирования хронического эндометрита считается подшивание участков эндометрия к париетальной брюшине передней брюшной стенки.

Ключевые слова: повреждение матки; повреждение эндометрия; моделирование; эндометрит; эндометриоз; синдром Ашермана.

Для цитирования: Денисова Ю.В., Мандра Е.В., Люндуп А.В., Александров Л.С., Ищенко А.И., Никонов А.П. Выбор оптимального метода повреждения матки при создании модели для проведения доклинических исследований. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(2): 124-136.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.124-136.

Для корреспонденции: Александров Леонид Семёнович, e-mail: leonid.aleks@bk.ru

Финансирование. Работа не имела спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: сбор и обработка материала – Денисова Ю.В., Мандра Е.В.; написание текста – Денисова Ю.В., Мандра Е.В.; редактирование – Люндуп А.В., Александров Л.С., Ищенко А.И., Никонов А.П. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Поступила 05.04.2020

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Denisova Yu.V.¹, Mandra E.V.¹, Lyundup A.V.², Aleksandrov L.S.¹, Ischenko A.I.¹, Nikonov A.P.¹

Selecting an optimal model of uterine damage for preclinical studies

¹I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russia;

²National Engineering Corporation, JSC, Lyalin Pereulok 19, Bldg. 1, Moscow 105062, Russia

Preclinical studies are performed to assess safety and efficacy of a drug. They are a prerequisite for drug registration and implementation. Success of these studies depends on the choice of the animal and the method of modeling the pathology. This review focuses on modeling gynecological pathologies in preclinical studies. Specifically, the authors addressed experimental impacts

for modeling Asherman's syndrome, endometriosis, and chronic endometritis. The search for literature was conducted in PubMed and Clinical Trials databases. The review describes surgical interventions, physical, chemical, and infectious methods for affecting the uterus integrity and induction of inflammatory and adhesive processes in this organ. A possibility of modeling endometriosis by stress exposures is considered. Effectiveness of these strategies and prospects for their future use were evaluated. According to the analysis of reports the most suitable animal for modeling the uterine damage is 4-8-week-old female rats. The most reproducible way to activate mechanisms of pathomorphological intrauterine adhesion is chemical injury of the endometrium with 95% ethanol. The best approach in modeling chronic endometritis is endometrial and parietal peritoneum stitching.

Keywords: uterus damage; endometrium damage; modeling; endometritis; endometriosis; Asherman's syndrome.

For citation: Denisova Yu.V., Mandra E.V., Lyundup A.V., Aleksandrov L.S., Ischenko A.I., Nikonov A.P. Selecting an optimal model of uterine damage for preclinical studies. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 124-136. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.124-136

For correspondence: **Leonid S. Aleksandrov**, Dr. Med. Sc., Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology № 1, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University); Elanskogo str. 2, bldg. 2, 119435, Moscow, Russian Federation, e-mail: leonid.aleks@bk.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Contribution: collection and processing of material – Denisova Yu.V., Mandra E.V.; writing a text – Denisova Yu.V., Mandra E.V.; editing – Lyundup A.V., Aleksandrov L.S., Ischenko A.I., Nikonov A.P.; Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article — all co-authors.

Information about the authors:

Denisova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-1753-0537>

Mandra E.V., <https://orcid.org/0000-0002-5397-9422>

Lyundup A.V., <http://orcid.org/0000-0002-0102-5491>

Aleksandrov L.S., <http://orcid.org/0000-0003-2512-5785>

Ischenko A.I., <http://orcid.org/0000-0003-3338-1113>

Nikonov A.P., <http://orcid.org/0000-0002-0142-8397>

Received 05.04.2020

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Обязательным условием для регистрации любого лекарственного препарата и его внедрения в клиническую практику является проведение исследований по оценке его безопасности и эффективности. Первым этапом в таких доклинических исследованиях является моделирование на животных.

Поиск новых методов терапии заболеваний женской половой системы, в частности патологии матки требует расширения спектра различных моделей. Наиболее активно в последнее десятилетие востребованы модели повреждения эндометрия. Для получения достоверных результатов необходимо искусственно создать модель повреждения маточной ткани, морфологические и гистологические характеристики которой будут наиболее близки к показателям заболевания, против которого разрабатывается лекарство. На сегодняшний день требуют коррекции методы терапии многих заболеваний органов женской половой сферы: синдрома Ашермана, хронического эндометрита, эндометриоза и др. Основным осложнением перечисленных состояний является бесплодие. При неэффективности

консервативного и хирургического лечения вспомогательные репродуктивные технологии (ЭКО, ИКСИ, суррогатное материнство) становятся последней надеждой женщины в ее стремлении иметь детей. Однако и эти методы не гарантируют стопроцентного результата. Поэтому разработка инновационных препаратов, которые станут основой лечения хронических заболеваний матки, ведущих к бесплодию, является очень важным и актуальным направлением работы ученых. Успех доклинических испытаний во многом зависит от правильного выбора модели повреждения, чему и посвящен данный обзор.

Цель обзора – выбор оптимального метода повреждения матки при создании модели для проведения доклинических исследований.

Методология поиска первоисточников. Основным методом является систематический обзор литературы по темам преимуществ и недостатков различных моделей повреждения матки и их использования в исследованиях по разработке новых подходов к лечению маточной патологии. Поиск публикаций проводился в электрон-

ной библиотеке PubMed и в базе клинических исследований Clinical trials по запросу «uterine damage model», «endometrium damage model», а также с уточнением конкретных заболеваний; историческая глубина поиска не ограничивалась. По данным запросам на ClinicalTrials найдено 108 публикаций. На сайте PubMed по запросу «uterine damage model» – 317 статей, «uterus damage» – 1368. Для анализа отобрано 55 публикаций, независимо от типа и базы проведения. Исследования, не относящиеся к теме обзора, были исключены.

Выбор животного для моделирования повреждения матки. Помимо способа повреждения матки, на адекватность результатов доклинических испытаний влияет выбор вида животного, который определяется несколькими факторами: длительностью эстральных циклов, сроками наступления половозрелости, размерами матки, расходами на содержание и разведение животных. В подавляющем большинстве исследований эксперименты проводятся на мышах, крысах и кроликах. Рассмотрим сильные и слабые стороны выбора того или иного животного для моделирования.

Крольчихи. Главным их отличием является провоцируемая овуляция, т.е. овуляцию у крольчих, в отличие от других млекопитающих, вызывают не регулярные гормональные изменения в организме, а процесс спаривания и время года. Другим недостатком выбора этих животных для моделирования повреждения матки являются большие расходы на их содержание и разведение.

Мыши. Недостатком данной модели является небольшой диаметр внутренней полости матки, что делает процесс моделирования повреждения технически сложным. Деятельность полового аппарата носит циклический характер; эстральный цикл, как и у крыс, составляет 4–5 сут. Сумма, требуемая на содержание и разведение мышей, заметно меньше.

Крысы. Преимуществом перед мышью моделью является больший диаметр внутренней полости матки, составляющий 5 мм. Изменения уровней гормонов в ходе эстрального цикла относительно стабильны, что снижает вероятность получения ошибочных данных. Эндометрий при повреждении способен восстанавливать свою структуру через 1–2 эстральных цикла. Затраты на содержание и разведение крыс невелики.

У крыс и мышей в возрасте до 4 нед длина и диаметр маточных рогов малы, предел прочности на разрыв низкий, что делает манипуляцию технически сложной и повышает вероятность разрыва маточного рога и развития кровотечения. У крыс и мышей старше 9 нед матка окружена большим количеством жировой клетчатки, что затрудняет ее фиксацию. Наиболее

оптимальным возрастом грызуна для моделирования маточного повреждения следует считать возраст самки от 5 до 8 нед.

Таким образом, самки крыс в возрасте от 5 до 8 нед наиболее оптимальны для моделирования повреждения матки в виду экономичности данной модели, простоты выполнения хирургического вмешательства, низкой вероятности осложнений и быстрого получения результата.

Моделирование внутриматочной адгезии

Способы повреждения эндометрия для моделирования внутриматочной адгезии. Синдром Ашермана – это патология матки, при которой в ее полости под действием различных факторов (травматических, инфекционных) формируется спаечный процесс, приводящий к частичной, а иногда и полной облитерации ее полости. В 1973 г. в журнале Gynecologic and Obstetric Investigation появилась статья, касающаяся моделирования повреждения эндометрия у крольчих химическим (этанол) и механическим (медный шабер) способами для изучения процесса его регенерации [1]. Все способы моделирования повреждения эндометрия, применяемые в исследованиях, можно разделить на механические, химические, термические, инфекционные и комбинированные.

Механический способ. Повреждения наносились различными способами: кюреткой, иглами различного калибра, лезвием для скальпеля, электрод-иглой, электрическим скальпелем, медным шабером, хирургическим ножом.

Описание метода. Перед операцией шерсть на передней брюшной стенке выривали, кожу обрабатывали раствором антисептика (например, 10%-ым раствором повидон-йода). Применялись различные виды анестезии: внутривнутренняя инъекция кетамина гидрохлорида и ксилазина гидрохлорида или хлоралгидрата, ингаляции 3% изофлурана, инъекции уретана в краевую ушную вену крольчих и т.д. Доступ к матке осуществлялся путем проведения срединной лапаротомии, ее модификации – нижней срединной лапаротомии или поперечного разреза в нижней трети брюшной полости. Брюшная полость оставалась увлажненной благодаря ее промыванию большим количеством физиологического раствора на протяжении всей операции для уменьшения образования спаек. После повреждения матку промывали физиологическим раствором для удаления остатков эндометрия. Сравнительные характеристики проведения операций представлены в **табл. 1**

Применение шабера нередко приводило к разрыву маточного рога и неконтролируемому кровотече-

Таблица 1

Методики повреждения эндометрия механическим способом

Вид животного	N	Анестезия	Доступ	Ход операции	Период наблюдения	Автор
Крысы Спрег-Доули	81	Внутрибрюшинная инъекция кетамина (50 мг/кг), диазепам (50 мг/кг)	Срединная лапаротомия	Обнажались рога матки, окружающую область покрывали влажной марлей. Участок рога длиной 1,5 см и диаметром 1/2 -2/3 от общего резецировался.	30-90 сут	[2]
Крысы Спрег-Доули	72	Не указана	Разрез на брюшной стенке	Участок маточного рога длиной 1,0 см и шириной 0,5 см удалялся.	30 сут	[3]
Новозеландские белые кролики	13	Ингаляция флуотана	Проксимальный разрез – выше шейки матки, дистальный – на маточно-трубном сочленении	Через эти разрезы проводили выскабливание эндометрия кюреткой Vasnier диаметром 2 мм. Правый рог использовался для контроля.	7 сут	[4]
Крысы Спрег-Доули	92	Не указана	Нижняя срединная лапаротомия	Участок рога матки длиной 1,5 см и шириной 0,5 см резецировался.	14 сут	[5]
Мыши C57BL/6	12	Внутрибрюшинная инъекция кетамина, диазепам	Срединная лапаротомия	На каждом роге на уровне маточно-трубного сочленения производился разрез, через который иглу 27-го калибра вводили на 2/3 ее длины 4 раза и совершали ей вращательные движения.	3 эстральных цикла (12 сут)	[6]
Крысы F344/NJcl-mu/gnu	-	Не указана	Срединная лапаротомия	Разрез производился на участке от шейки матки до маточной трубы. Эндометрий повреждался лезвием для скальпеля №21.	8 сут	[7]
Новозеландские белые кролики	20	В/м инъекция 16 мг ксилазина, через 5 мин в/в инъекция 20 мг кетамина	Срединная лапаротомия	Разрез производился на дистальной трети маточной трубы. Проводилось два выскабливания матки кюреткой диаметром 3 мм интервалом в 10 дней.	20 сут	[8]
Мыши ICR	40	Внутрибрюшинная инъекция 8% хлоралгидрата (0, мл/ 10 г)	Вертикальный разрез передней брюшной стенки и матки	В правом роге производился небольшой разрез; медной электрод-иглой диаметром 1 мм и мощностью 0,5 Вт, введенной внутрь маточного рога, наносились повреждения.	14 дней	[9]
Крысы Спрег-Доули	-	Внутрибрюшинная инъекция 10% хлоралгидразы (3,5 мл/ кг).	Нижняя срединная лапаротомия	Вначале производился поперечный разрез на матке, затем - выскабливание правой половины матки кюреткой диаметром 2 мм до появления отека.	7 сут	[10]
Кролики	-	Внутрибрюшинная инъекция 4% хлоралгидрата (0,1 мл / 10 г).	Срединная лапаротомия	Через продольный разрез длиной 0,5 см на теле матки выше отхождения маточных труб наносилось механическое повреждение электрическим скальпелем мощностью 70 ВТ со скоростью 6 мм с ⁻¹ .	7 сут	[11]
Мыши ICR	-	Не указана	Срединная лапаротомия	Группа выскабливания: в один рог вводили тупую иглу 20-го калибра с отрицательным давлением 0,05 мегаПа. Группа электрокоагуляции: один рог матки повреждали монополярной электрод-иглой мощностью 0,5 Вт.	7 сут	[12]
Мыши C57BL/6	-	Ингаляция 5% изофлурана	Вагинальный хирургический доступ	Для механического повреждения был разработан медный шабер диаметром 1,8 мм, который предварительно стерилизовался и вместе с направляющим наконечником вводился в полость матки до достижения конца маточной полости, затем наносились как минимум 10 царапающих движений скребком.	7-10 сут	[1] [13] [14]

Продолжение табл. 1 см. на стр. 128

Вид животного	N	Анестезия	Доступ	Ход операции	Период наблюдения	Автор
Крысы Спрег-Доули	40	350 мг/кг 10% хлоралгидрата	Срединная лапаротомия	В верхней трети матки производили разрез длиной 1,5 см, ткани фиксировали офтальмологическим пинцетом. Эндометрий скоблили хирургическим ножом до появления кровотечения.	1-6 нед	[15]
Мыши BALB/с голые	30	Внутрибрюшинная инъекция 1% пентобарбитала натрия (0,75 мл/10 г)	Продольный разрез длиной 1,5 см в проекции верхней части мочевого пузыря по средней линии живота	Офтальмологическими щипцами фиксировали кожу, офтальмологическими ножницами послойно разрежали брюшную стенку. Маточные трубы фиксировались прямыми зажимами. На маточном роге производился разрез, в него на 2/3 расстояния между рогом и телом матки вводилась игла 4-го калибра и вращалась 4 раза.	-	[16]
Крысы Спрег-Доули	-	в/в инъекция 3% пентобарбитала натрия (1 мл/кг) в диэструс	Срединная лапаротомия (длина разреза 2 мм)	В полость матки вводилась игла 16-го калибра, которую вращали, повреждая эндометрий обеих боковых стенок матки до серозной оболочки.	19 сут	[17]
Мыши BALB/с	-	Внутрибрюшинная инъекция пентобарбитала натрия	Нижняя срединная лапаротомия	Между правой и левой маткой вводили иглу 7-го калибра и повреждали внутренний слой матки до появления гиперемии.	8 сут	[18]
Крысы Спрег-Доули	5	Внутрибрюшинная инъекция 1% пентобарбитала натрия (2 мг/кг ⁻¹)	Поперечный разрез длиной в 2 см в нижней части живота	Вблизи от маточной трубы, не затрагивая кровеносные сосуды, производился разрез. Игла 16-го калибра придавали форму ложки-скрепка, который затем вставляли в полость матки и вращали до появления кровотечения.	8 сут	[19] [20]

нию, поэтому его следует использовать для моделирования повреждения эндометрия у животных, матки которых имеют достаточный размер [13].

Изменения тканей матки и степень внутриматочной адгезии оценивались в среднем через 1 нед после операции различными методами: 1) УЗИ – измерение толщины эндометрия; 2) гистологически – оценка толщины, структуры эндометрия и подсчет числа эндометриальных желез; 3) патоморфологически – оценка размеров полости матки, выраженности гиперемии и отека, а также эластичности ткани; 4) количественным – учет частоты беременностей для оценки результатов вмешательства.

Механическое повреждение, несомненно, является наиболее распространенным способом моделирования повреждения матки, в частности, внутриматочной адгезии. Этот вид повреждения наиболее близок к естественному механизму образования спаек в маточной полости (в 90% случаев внутриматочные синехии являются следствием послеродового выскабливания) [21]. При проведении гистологического и патоморфологического исследований через 1 нед после вмешательства в матке выявляются характерные для внутриматочной адгезии изменения: сужение маточной полости, уменьшение толщины эндометрия, сни-

жение количества эндометриальных желез и т.д. Однако степень выраженности признаков внутриматочной адгезии в различных исследованиях неоднозначна, что объясняется наличием большого количества факторов, влияющих на получаемые результаты (особенности хирургического инструмента, площадь и глубина повреждения, длительность воздействия, квалификация сотрудника, выполняющего процедуру). Все это препятствует созданию универсальной модели механического повреждения эндометрия и достижению стабильного эффекта при многократном воспроизведении.

Химический способ. В подавляющем большинстве исследований для индуцирования внутриматочной адгезии в качестве химического агента применялся этанол в различных концентрациях. *Способы анестезии.* Внутрибрюшинные инъекции: золетил (8 мкл) и ромпун (2 мкл) [22]; 1% пентобарбитал натрия (2 мг/кг⁻¹) [19], 8% хлоралгидрат (0,5 мл/10 г) [23]; внутримышечные инъекции: тилетамин (0,07 мл), золазепам и ксилазин (0,05 мл) в 0,1 мл физ.раствора [24].

Kim Y.Y., Park K.H., Kim Y.J. и др. вводили 50%-й этанол в полость матки с помощью катетера через влагалище, через 5 мин омывали маточную полость физиологическим раствором. Некоторые исследователи вводили

этанол в полость матки в ходе операции прямого доступа к телу и рогам матки. *Описание способа.* Вскрывалась брюшная полость, обеспечивался доступ к матке, дистально и проксимально на рога матки накладывались два кровоостанавливающих зажима, 0,4–0,5 мл 95%-го водного раствора этилового спирта вводилось в рог матки с помощью шприца 26-го или 30-го калибра. Через 3 мин зажимы снимались и рог матки промывался стерильным физиологическим раствором для удаления остатков этанола [19, 23–24].

В исследовании Kim Y.Y., Choi B.B., Lim J.W. и др. проводилось сравнение влагалищного и дорсального хирургических доступов для введения этанола в полость матки [13]. *Описание способов:* а) влагалищный доступ: наконечник пипетки вставлялся во влагалище, в правый либо левый маточный рог вводился катетер длиной 2 см, через который в маточную полость поступало 50 мл 50%, 70% или 95% этилового спирта; через несколько мин полость матки промывали сбалансированным солевым раствором Хэнка; б) дорсальный хирургический доступ: над областью проекции почек (1,5–2,0 см от средней линии) делался поперечный разрез, прослойка жировой клетчатки позади яичника отодвигалась, через фиксированный зажимом маточный рог проксимальнее от яичника в полость матки вводилась игла калибра 30 G со шприцем объемом 1 мл, содержащим 50 мкл спирта указанных выше концентраций. Спустя 7–8 мин полость матки также промывали раствором Хэнкса. Преимуществами влагалищного хирургических доступа являлись более короткий период наркотизации, меньшая вероятность развития послеоперационных спаек. Недостатками данного доступа были невозможность контроля прохождения катетера, случаи перфорации и проникновения катетера в брюшную полость, что приводило к гибели животного. Явные преимущества дорсального хирургического доступа: визуализация и возможность купирования кровотечения. Через 7–10 сут после повреждения проводили гистологический и морфологический анализ тканей матки. Наиболее эффективной оказалась 95%-я концентрация спирта (эффективность 70% спирта была практически аналогична, 50% спирта – заметно ниже), т.к. при этой концентрации достигалось более значительное уменьшение толщины эндометрия. Отек и снижение эластичности внутренней поверхности матки наблюдались во всех исследуемых группах.

Моделирование внутриматочной адгезии с использованием этанола имеет ряд преимуществ: концентрация и объем этанола, время начала и прекращения воздействия легко фиксируются и могут быть стан-

дартизованы, что обеспечивает стабильность и воспроизводимость данной модели. Кроме того, данный метод приводит к значительным изменениям толщины эндометрия, количества желез и относительно высокому уровню фиброза, что относится к основным фенотипическим показателям для оценки модели внутриматочной адгезии. Также воздействие этанола препятствует пролиферации эпителиальных и стромальных клеток, не инициирует восстановительные реакции в отличие от механического повреждения.

Xiangzhen Wang, Nana Ma, Qiannan Sun и др. в качестве химического агента использовали *клейкий фенол* (0.04 мл), который инъецировали в маточные рога крыс Спрег-Доули [25]. Через 10 сут после инъекции оценивали параметры внутриматочной адгезии (количество эндометриальных желез, площадь фиброза). Оценивали также экспрессию транскрипционного фактора NF- κ B, который способствует экспрессии внутриматочных воспалительных факторов адгезии и играет важную роль в патогенезе синдрома Ашермана.

Kilic S., Yuksel B., Pinarli F. и др. в правый маточный рог крыс инъецировали *трихлоруксусную кислоту*, что также приводило к развитию внутриматочных синехий [26].

Исследования, в которых были использованы клейкий фенол и трихлоруксусная кислота единичны, что не позволяет сделать однозначные выводы об их достоверности и рекомендовать данные химические агенты к моделированию.

Термический способ. Оценку эффективности данного способа моделирования повреждения матки проводили Sun L, Zhang S, Chang Q и др. *Описание способа.* Для анестезии использовали внутривенную инъекцию 1% пентобарбитала натрия (2 мг/кг); затем производили поперечный разрез длиной 2 см в нижней части живота. Область вокруг матки обкладывалась марлей, смоченной водой, для предотвращения высыхания. Шприц 20-го калибра, соединенный с резиновой трубкой и чашкой Петри, содержащей горячую воду, вводили проксимально и дистально в полость матки. После этого в течение 80 секунд с помощью шприца с постоянной скоростью вводили горячий физиологический раствор (90 °C), после чего брюшная полость промывалась физиологическим раствором для ее охлаждения.

Через 1 нед проводили патоморфологические исследования, в ходе которых обнаруживалось повреждение как функционального, так и базального слоев эндометрия. В ходе эксперимента развивался воспалительный процесс, серьезно повреждался эндометрий и мышечный слой окружающих тканей. Следствием действия термического агента являлись коагуляция

белков, гибель клеток эндометрия (индукция некроза), воспалительный процесс, что завершалось развитием фиброза [27]. Ввиду непредсказуемости и тяжести повреждений данный способ не был рекомендован для создания модели внутриматочной адгезии.

Инфекционный способ. В качестве инфекционного агента для повреждения эндометрия и индукции внутриматочной адгезии применялись липополисахариды (ЛПС) бактерий, которые вводились в полость матки путем внутрибрюшинной инъекции или в ходе оперативного вмешательства. Внутрибрюшинная инъекция проводилась однократно, доза ЛПС составляла 0.5 мг/кг. В качестве животной модели использовали мышей BALB/c [28]. Для оценки повреждения эндометрия измеряли процентное содержание нейтрофилов через 24 ч после инъекции.

Liu F., Zhu Z.-J., Li P. вводили ЛПС в полость матки хирургическим путем. *Описание способа.* Для обезболивания авторы в краевую ушную вену кроликов вводили уретан (1,5 г/кг). Производилась срединная лапаротомия, обнажалась матка, на ее передней поверхности в нижней трети делался продольный разрез длиной 0,5 см, через который в маточную полость вводилась хирургическая шовная нить с липополисахаридами бактерий. Хвостовой конец нити выводился на кожу передней брюшной стенки для облегчения удаления нити через 48 ч после операции [29]. Степень внутриматочной адгезии оценивалась по количеству эндометриальных желез и площади фиброза. Спустя 1 нед после вмешательства были ярко выражены отек и нейтрофильная инфильтрация, отмечалась выраженная регенерация клеток эндометрия, что делает данную модель более пригодной для изучения патогенеза воспалительной реакции, чем для создания искусственной модели внутриматочной адгезии.

Комбинированная модель. В ходе исследований комбинировались различные способы повреждения. Liu F., Zhu Z.-J., Li P. вначале повреждали матку механическим способом, а затем инфекционными агентами [29]. *Описание способа.* Для анестезии кроликам в краевую ушную вену вводили уретан (1,5 г/кг), затем проводили срединную лапаротомию, обнажали матку, на ее передней поверхности в нижней трети выполняли продольный разрез длиной 0,5 см, функциональный слой эндометрия средней и верхней третей внутренней поверхности матки выскабливали кюреткой диаметром 4 мм. После выскабливания в полость матки через разрез вводилась хирургическая шовная нить с липополисахаридами бактерий, хвостовой конец нити выводился на кожу передней брюшной стенки для облегчения его удаления через 48 ч.

Анализ изменений проводили через 24, 48, 72 ч и 7, 14, 28 сут. Через 1 нед после вмешательства спайки занимали 30% внутренней поверхности матки. Клетки эндометрия быстро начинали регенерировать, однако восстановительные процессы протекали относи-

тельно медленно, и нормальная структура матки наблюдалась лишь спустя 28 сут после операции.

Sun L., Zhang S., Chang Q. также, как и Liu F., Zhu Z.-J., Li P., комбинировали механическое повреждение и инфекционные агенты в одной из экспериментальных групп [19]. *Описание способа.* После нанесения механического повреждения с помощью ложки-скребка, которое было описано выше, в полость матки через разрез вводилась хлопковая нить длиной 5 см, пропитанная 0,6 мг L1 липополисахарида (ЛПС). Отрезок этой нити длиной 2 см выводился на переднюю поверхность брюшной стенки. При патоморфологическом исследовании было обнаружено, что толщина эндометрия, являющаяся одним из основных параметров оценки внутриматочной адгезии, практически не изменялась. Степень внутриматочной адгезии после механического повреждения, которое является первым этапом операции, зависит от большого количества факторов, что делает невозможным создание универсального протокола данных исследований. Таким образом, результаты применения комбинированной травмы (механическое повреждение + инфекционные агенты) для создания модели внутриматочной адгезии противоречивы, что свидетельствует о нерепрезентативности данной модели.

Кава С., Sever N., Cengiz повреждали матку путем прижигания ее внутренней поверхности, что сочетает в себе механический и термический способы [30]. *Описание способа.* Анестезию проводили путем внутримышечной инъекции 10% кетамина (50 мг/кг) гидрохлорида и 2% ксилазина (5 мг/кг). На передней брюшной стенке крыс линии Вистар по средней линии производили разрез длиной 3 см, обнажали рога матки. Затем путем прижигания электрокоагулятором Bovie1 мощностью 10 Вт наносили по 7 повреждений на поверхности маточных рогов, противоположной брыжейке матки. Второе повреждение наносилось на участке длиной в 1,5 см между двумя основными сосудистыми ветвями на нижней стенке каждого рога. Через 2 нед после операции проводили гистологическую оценку клеточной адгезии. По данным одного исследования нельзя сделать однозначные выводы о преимуществах и недостатках данного способа, однако, как уже было сказано, механическое повреждение, являющееся обязательным этапом создания комбинированной модели, препятствует стандартизации вмешательства и не позволяет его рекомендовать экспериментаторам.

Сравнение представленных способов моделирования внутриматочной адгезии. Sun L., Zhang S., Chang Q. и др. проводили сравнительный анализ 4 способов повреждения матки: химического, механического, термического и комбинированных (механический + инфекционный и механический + термический). При патоморфологическом исследовании во всех экспериментальных группах отмечалось сужение полости мат-

ки и снижение эластических свойств ткани. В группе комбинированной травмы полость матки была более дилатирована относительно остальных групп, степень повреждения стенок была выражена в наименьшей степени, что говорит о нерепрезентативности данной модели. Гистологический анализ показал уменьшение толщины эндометрия и сокращение количества желез; структура эндометрия была рыхлой. Во всех группах наблюдалось истончение эндометрия, за исключением групп с комбинированной травмой, в которых его толщина практически не изменилась. Это может быть связано с тем, что механическое повреждение вызывает воспаление, сопровождающееся репарацией поврежденной ткани за счет дифференцировки эндометриальных стволовых клеток и выравнивания соотношения фибротических и антифибротических факторов [31, 32]. По степени сужения полости матки, снижения эластических свойств, развития фиброза наилучшие показатели отмечались в группе химического повреждения 95% водным раствором этилового спирта.

Kim Y.Y., Choi B.B., Lim J.W. и др. сравнивали механический и химический способы моделирования внутриматочной адгезии [13]. При механической травме изменения эндометрия были выражены слабее, чем в группе химического повреждения. Осложнениями применения медного шабера являлись разрыв маточного рога и неконтролируемые кровотечения, поэтому применение данного механического повреждения у крыс и мышей с малым диаметром полости матки не желательно при моделировании внутриматочной адгезии.

Таким образом, повреждение эндометрия 95% этанолом можно считать наиболее эффективным и подходящим способом имитации патоморфологических механизмов внутриматочной адгезии ввиду возможности создания единого протокола клинических исследований и схожести параметров маточной ткани после воздействия этанола с таковыми при развитии внутриматочных синехий в естественных условиях.

Модель повреждения матки для изучения ее регенеративного потенциала. Другим направлением исследований является изучение процесса регенерации ткани матки при самых разнообразных ее повреждениях. В основе таких экспериментов лежит удаление определенного участка (в основном, небольшой части маточного рога) с последующим наблюдением за процессом ее репара-

ции. Стандартный протокол такого клинического исследования описали Miyazaki K., Maruyama T. [33]. *Описание способа.* Авторы для анестезии применяли ингаляцию 3% изофлурана. Крысам Фишер проводили срединную лапаротомию, обнажали рога матки, область вокруг матки покрывали куском влажной марли. Участок маточного рога длиной 1,5 см и диаметром $\frac{1}{2}$ от общего резецировался. Брюшную полость промывали физиологическим раствором, после чего переднюю брюшную стенку крыс контрольной группы послойно зашивали. В экспериментальной группе в матку трансплантировали децеллюляризованный маточный матрикс со зрелыми и недифференцированными клетками матки и мезенхимальными стволовыми клетками для ускорения регенерации.

Моделирование эндометрита и эндометриоза

Основными заболеваниями, моделируемыми в доклинических исследованиях, являлись хронический эндометрит и эндометриоз. Эндометрит — это воспаление слизистой оболочки матки, которое часто сопровождается хронической тазовой болью [34]. Эндометриоз, помимо хронического воспаления внутреннего слоя маточной стенки, характеризуется его разрастанием за пределы этого слоя [35].

Способы повреждения эндометрия для моделирования эндометрита. К основным критериям успешно воспроизведенного хронического воспалительного процесса эндометрия относятся наличие лейкоцитарных инфильтратов, состоящих преимущественно из лимфоидных элементов в сочетании с лейкоцитами, гистиоцитами и плазматическими клетками. Для эндометрита характерен отек стромы, очаговый фиброз, а также склеротические изменения стенок спиральных артерий эндометрия и стаз эритроцитов [36]. Основные стратегии моделирования хронического воспаления и их результаты представлены в **табл. 2**.

Можно выделить несколько групп методик, использовавшихся для моделирования хронического воспаления. Во-первых, это введение аутокала (1:10 с физиологическим раствором), которое приводило к возникновению воспаления после операции. Следует отметить простоту моделирования данного типа повреждения¹. Айламазян Э.К. и соавт. (2012 г.) запатентовали способ моделирования хронических воспалительных заболеваний половых органов². В течение 7 сут до планируемой операции проводилась эстрогенизация животных путем внутримышечного введения 0,1% синестрола. *Описание способа.* Для наркоза

¹Тихаева К.Ю., Рогова Л.Н., Ткаченко Л.В. Способ моделирования экспериментального хронического воспаления эндометрия у крыс. Патент РФ RU2580986C1, 04.10.2016.

²Айламазян Э.К., Ниаури Д.А., Гзгзян А.М., Джемплиханова Л.Х., Радькова Ю.А., Савельев А.Н. Способ моделирования хронических воспалительных заболеваний женских половых органов в эксперименте. Патент РФ RU 2 533 739 C2, 11.07.2012.

Методики повреждения эндометрия для моделирования хронического эндометрита

Метод	Животные	Описание метода	Период наблюдения	Результат	Автор
Введение аутокаала	Крысы	Приготовление взвеси аутокаала: кал смешивали с физиологическим раствором в соотношении 1:10. Наркоз: рометар (3-4 мг/кг). Этапы вмешательства: 1. Обработка передней брюшной стенки растворами антисептиков. 2. Срединная лапаротомия. 3. Выведение матки в рану, обложение стерильными салфетками. 4. Введение тонкой инъекционной иглы в маточный рог. 5. Введение 0,1 мл приготовленной взвеси аутокаала. 6. Послойное ушивание передней брюшной стенки.	С 3 сут проводились в/м инъекции цефтриаксона в течение 7 сут.	Формирование хронического воспаления эндометрия на 41 сут эксперимента.	[Патент РФ RU2580986C1]
Подшивание фрагментов эндометрия к париетальной брюшине	Кролики	Использование общехирургической техники и шовного материала, создающего объемное давление в зоне хирургических узлов, что приводит к повреждению эндометрия.	Первые 5 сут: цефтриаксон 50 мг/кг/сут. Повторная эстрогенизация 0,1%-м раствором синестрола. Снятие кожных швов на 7-е сут после операции.	Нестабильная и непредсказуемая морфологическая реакция имплантов эндометрия на лазерное и электрохирургическое воздействия, а также их несоответствие критериям хронического воспаления говорят о нецелесообразности применения данных методик. Использование же общехирургической техники показало стабильно положительные результаты.	[37]
Лазерное воздействие		Фрагмент эндометрия фиксировался к брюшине с применением микрохирургических инструментов. На 7-е сут в ходе лапароскопического вмешательства производилось лазерное воздействие на имплант (мощность излучения составляла 2 Вт, длина волны лазерного излучения — 980 нм) в непрерывном режиме с последующей поверхностной лазерной вапоризацией до визуально контролируемого испарения имплантата. Время экспозиции: 3–5 с.			
Электрохирургическое воздействие		Фрагмент эндометрия фиксировался к брюшине с применением микрохирургических инструментов. На 7-е сут производилось воздействие на импланты эндометрия электрическим током высокой частоты в монополярном режиме (мощность — 10 Вт, частота тока — 440 кГц).			
Введение ЛПС	Мыши	Мышам вводили 50 мл ЛПС через влагалище (1 мг / мл, растворенный в стерильном фосфатно-буферном физиологическом растворе).	Через 24 ч мышей усыпляли для взятия образца тканей матки.	Наблюдались: воспалительная клеточная инфильтрация, отек эпителия эндометрия, гиперемия; достоверное повышение воспалительных цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-1 β .	[38, 39, 40]
	Мыши	Мышам вводили равные количества ЛПС (1 мг/кг) с каждой стороны.	Мышей умерщвляли при помощи CO ₂ через 24 ч. Ткани матки помещали в 4% параформальдегид для окрашивания гематоксилином и эозином. Оставшиеся ткани хранили при температуре -80 °С.	Отек, воспалительная клеточная инфильтрация и исчезновение маточных структур.	[41, 42, 43]

Продолжение табл. 2 см. на стр. 133

Метод	Животные	Описание метода	Период наблюдения	Результат	Автор
	Мыши	25 μ л ЛПС (2 мг/мл) вводили в каждый рог матки мышей с помощью шприца 100 μ л с тупой иглой 30-го калибра для индуцирования эндометрита.	Мышей усыпляли через 24 ч, а ткани матки хранили при температуре -80°C .	Отек, воспалительная клеточная инфильтрация и исчезновение маточных структур.	[44]
Инфицирование <i>Staphylococcus aureus</i>	Мыши	Инфицирование золотистым стафилококком с помощью инъекций 100 μ л в каждый рог матки (общий объем 200 μ л) через микрошприц.	Мыши были усыплены через 24 ч пентобарбиталом натрия.	Воспалительная клеточная инфильтрация, гиперемия эндометрия, выраженное разрушение клеток миометрия.	[45, 46]
	Мыши	200 мл суспензии <i>S. aureus</i> (1×10^7 колониеобразующих единиц [КОЕ]/10 мкл) вводили в оба рога матки мышей для индуцирования эндометрита.	Через 8 ч мышей усыпляли пентобарбиталом натрия, а ткани матки собирали и хранили при температуре -80°C	Воспалительная инфильтрация, отек эндометрия.	[47, 48]
	Крысы	Инфицирование золотистым стафилококком с помощью инъекций 100 μ л в каждый рог матки через микрошприц.	Через 24 ч крыс усыпляли пентобарбиталом натрия. Ткани матки собрали и хранили при температуре -80°C .	Отслаивание выстилающего эпителия, отек эндометрия, утолщение эндометрия с повреждением эндометриальных желез.	[49]
	Мыши	Наркоз: внутривентральное введение 0,075 мг/мл медетомидина, 0,4 мг/мл мидазолама и 0,5 мг/мл буторфанолола. Инюкуляцию токсина/клеток золотистого стафилококка проводили с использованием устройства NSET. Этапы: 1. Введение зеркала в вагинальный тракт мыши 2. В наконечник NSET набирали 3 мкл суспензии бактерий с титром клеток 1×10^7 КОЕ / 3 мкл или 10 мкг токсинов 3. Образец прививали в матку 4. Удаляли наконечник и зеркало 5. Внутривентральная инъекция 0,075 мг/мл гидрохлорида атипамезола	Через 24 ч мышей умерщвляли. Матку фиксировали в 4%-ом параформальдегидном буфере при 4°C в течение ночи. Затем ткани помещали в температуру -80°C .	Нахождение бактериальных клеток в эпителии. Признаки цервиковагинальной инфекции.	[50]

использовался тиопентал (30–40 мг/кг массы тела животного). Выполнялась послынная нижнесрединная лапаротомия. Правый маточный рог выделялся и резецировался на протяжении 3 см, оставшийся участок рога рассекался продольным разрезом на стороне, противоположной прикреплению брыжейки матки. Эндометрий из центра препарата отделялся острым путем, и его фрагменты размером 2×3 мм подшивались к париетальной брюшине передней брюшной стенки. Способ фиксации фрагментов эндометрия, а также дополнительные воздействия на имплант, отличались в группах животных в зависимости от выбранного повреждающего фактора. По итогам сравнения повреждающих методик исследователи пришли к выводу о неэффективности применения лазерного и электрохирургического воздействия в то время, как общехирургическая

техника доказала свою универсальность и стабильность результатов [37].

Значительное количество исследований было направлено на изучение влияния введения липополисахаридов (ЛПС). ЛПС являются одними из наиболее мощных индукторов воспаления (табл. 2), что было подтверждено авторами всех анализируемых нами публикации (табл. 2). При введении ЛПС в эндометрии наблюдался отек и клеточная инфильтрация – основные признаки воспалительного процесса, характерного для эндометрита [38–44].

Еще одним часто используемым методом воздействия для моделирования эндометрита служило инфици-

Способы повреждения эндометрия для моделирования эндометриоза

Метод	Животные	Описание метода	Период наблюдения	Результат	Автор
Стресс	Крысы	Анестезия: пентобарбитал Этапы: Удаление дистальных 2 см правого рога матки Погружение их в теплую (37 °С), стерильную питательную среду Обнажение эндометрия путем продольного вскрытия стерильными ножницами Отделение 4 имплантатов эндометрия размером 2*2 мм Имплантаты сшивались с серозной оболочкой рядом с брыжеечными сосудами тонкой кишки В группе «фиктивной операции» к брыжейке кишечника без имплантатов прикрепляли 4 шва. Правый рог матки массировали кончиками пальцев в течение 2 мин Через 7 сут после хирургической индукции эндометриоза крысам давали плавательные нагрузки, что вызывало появление у них стресса	Животные были умерщвлены через 60 сут после операции. Оценивали влияние уровня стресса на симптоматику и характеристики ткани эндометрия при эндометриозе.	При стрессе усиливалась местная воспалительная реакция и стимулировалось образование нервных волокон.	[51, 52, 53, 54, 55]

цирование *Staphylococcus aureus* (табл. 2). Описание сподоба. Золотистый стафилококк культивировали в 100 мл среды LB (англ. Lysogeny broth), пока он не вступал в стационарную фазу (оптическая плотность при 600 нм равна 2,0). *S. aureus* центрифугировали и затем ресуспендировали в 1 мл фосфатно-буферного физиологического раствора [47]. После внесения суспензии *S. aureus* в оба маточных рога мышей все авторы исследований отмечали появление признаков воспаления эндометрия, а в некоторых случаях повреждение и гибель клеток миометрия [47–49].

Моделирование эндометриоза. Эндометриоз моделировали аутоотрансплантацией предварительно отделенных имплантов правого рога матки к брыжейке тонкой кишки. В ложнооперированных группах правый рог матки массировали пальцами в течение 2 мин и накладывали швы без маточных имплантатов на брыжеечную область кишки. В качестве фактора прогресси-рования эндометриоза многие ученые указывают стресс, поэтому для формирования модели эндометриоза использовали стрессовое воздействие. Через 7 сут после операции крыс подвергали плавательным нагрузкам (данное мероприятие проводилось в пластиковом бассейне (диаметр 150 см, глубина 60 см), заполненном водой (37 °С) с растворенной в ней нетоксичной краской. Положение животных во время выполнения задания контролировалось и фиксировалось с помощью установленной на потолке видеокамеры [51]. Отмечалось усиление воспалительной реакции при стрессе, также стимулировалось образование нервных волокон [51–55] (табл. 3).

Заключение

Мировой опыт моделирования гинекологических заболеваний свидетельствует о перспективности данного направления, а следовательно, и о возможности проведения испытаний по внедрению инновационных препаратов в терапию синдрома Ашермана, эндометрита и эндометриоза на доклиническом этапе. Различный подход к воспроизведению патологических процессов на моделях животных обеспечивает условия для оценки эффективности лечения при различных уровнях оснащенности.

Внедрение препарата в практику – сложный многоуровневый процесс, однако надежность и относительная простота ряда обсуждаемых способов повреждения эндометрия для проведения доклинических исследований помогут изменить подход к лечению многих гинекологических заболеваний и даже бесплодия.

Литература

(п.п. 1-35; 38-55 см. References)

- Кузнецова А.В. Хронический эндометрит. *Архив патологии*. 2000; 3: 48–52.
- Айламазян Э.К., Гзгзян А.М., Савинов П.А., Ниаури Д.А., Джемплиханова Л.Х., Усольцева Е.О., и др. Особенности реакции импланта аутологичного эндометрия на механическое воздействие в эксперименте *Журн. акушерства и женских болезней*. 2012; LX1(3): 24–30.

References

- Schenker J., Polishuk W. Regeneration of rabbit endometrium following intrauterine instillation of chemical agents. *Gynecol Invest*. 1973; 4: 1–13.

2. Li X., Sun H., Lin N., Hou X., Wang J., Zhou B., et al. Regeneration of uterine horns in rats by collagen scaffolds loaded with collagen-binding human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*. 2011; 32(32): 8172–81.
3. Lin N., Li X., Song T., Wang J., Meng K., Yang J., et al. The effect of collagen-binding vascular endothelial growth factor on the remodeling of scarred rat uterus following full-thickness injury. *Biomaterials*. 2012; 33(6): 1801–7.
4. Fernandez H., Hafiz A., Khrouf M., Morel O., Chavatte-Palmer P. Evaluation of the rabbit as an experimental model for human uterine synechia. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2012; 5(2): 175.
5. Ding, L., Li, X., Sun, H., Su, J., Lin N., Peault B., et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus. *Biomaterials*. 2014; 35(18): 4888–900.
6. Alawadhi F., Du H., Cakmak H., Taylor H. Bone Marrow-Derived Stem Cell (BMDSC) Transplantation Improves Fertility in a Murine Model of Asherman's Syndrome. *PLoS ONE*. 2014; 9(5): e96662.
7. Kuramoto G., Takagi S., Ishitani K., Shimizu T., Okano T., Matsui H. Preventive effect of oral mucosal epithelial cell sheets on intra-uterine adhesions. *Human Reproduction*. 2014; 30(2): 406–16.
8. Huberlant S., Fernandez H., Vieille P., Khrouf M., Ulrich D., de-Tayrac R., et al. Application of a Hyaluronic Acid Gel after Intra-uterine Surgery May Improve Spontaneous Fertility: A Randomized Controlled Trial in New Zealand White Rabbits. *PLoS ONE*. 2015; 10(5): e0125610.
9. Zhang Y., Lin X., Dai Y., Hu X., Zhu H., Jiang Y., et al. Endometrial stem cells repair injured endometrium and induce angiogenesis via AKT and ERK pathways. *Reproduction*. 2016; 152: 389–402.
10. Xu H., Xu J., Zhang S., Zhu Q., Jin B., et al. Temperature-sensitive heparin-modified poloxamer hydrogel with affinity to KGF facilitate the morphologic and functional recovery of the injured rat uterus. *Drug Delivery*. 2017; 24(1), 867–81.
11. Xu, H.-L., Xu, J., Shen, B.-X., Zhang, S.-S., Jin, B.-H., Zhu, Q.-Y., et al. Dual Regulations of Thermosensitive Heparin–Poloxamer Hydrogel Using ϵ -Polylysine: Bioadhesivity and Controlled KGF Release for Enhancing Wound Healing of Endometrial Injury. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017; 9(35): 29580–94.
12. Yanpeng W., Qiongxiao H., Sheng X., Jing S. Establishment of mouse endometrial injury model by curettage or coagulation. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2017; 46: 186–91.
13. Kim Y., Choi B., Lim J., Kim Y., Kim S., Ku S. Efficient Production of Murine Uterine Damage Model. *Tissue Eng Regen Med*. 2018; 16(2): 119–29.
14. Aaby P., Jensen H., Simondon F., Whittle H. High-titer measles vaccination before 9 months of age and increased female mortality: do we have an explanation? *Semin Pediatr Infect Dis*. 2003; 14: 22032
15. Cai Y., Wu F., Yu Y., Liu Y., Shao C., Gu H., et al. Porous Scaffolds from Droplet Microfluidics for Prevention of Intrauterine Adhesion. *Acta Biomaterialia*. 2018; 15(84): 222–30.
16. Hu J., Song K., Zhang J., Zhang Y., Tan B. Effects of menstrual blood-derived stem cells on endometrial injury repair. *Mol Med Rep*. 2019; 19(2): 813–20.
17. Zhang S., Li P., Yuan Z., Tan J. Platelet-rich plasma improves therapeutic effects of menstrual blood-derived stromal cells in rat model of intrauterine adhesion. *Stem Cell Res Ther*. 2019; 10(1): 61.
18. Li B., Zhang Q., Sun J., Lai D. Human amniotic epithelial cells improve fertility in an intrauterine adhesion mouse model. *Stem Cell Res Ther*. 2019; 10(1): 257.
19. Sun L., Zhang S., Chang Q., Tan J. Establishment and comparison of different intrauterine adhesion modelling procedures in rats. *Reprod Fertil Dev*. 2019; 31(8): 1360–8.
20. Khrouf, M., Morel, O., Hafiz, A., Chavatte-Palmer, P., Fernandez, H. Evaluation of the rabbit as an experimental model for human uterine synechia. *J. Hum. Reprod. Sci*. 2012; 5(2): 175–80.
21. Hooker A., de Leeuw R., van de Ven P., Bakkum E., Thurkow A., Vogel N., et al. Prevalence of intrauterine adhesions after the application of hyaluronic acid gel after dilatation and curettage in women with at least one previous curettage: short-term outcomes of a multicenter, prospective randomized controlled trial. *Fertil. Steril*. 2017; 107(5): 1223–31.
22. Kim Y., Park K., Kim Y., Kim M., Liu H., Rosenwaks Z., et al. Synergistic regenerative effects of functionalized endometrial stromal cells with hyaluronic acid hydrogel in a murine model of uterine damage. *Acta Biomater*. 2019; 15(89): 139–51.
23. Lin, X., Zhang, Y., Pan, Y., He, S., Dai, Y., Zhu, B., et al. (2018). Endometrial stem cell-derived granulocyte-colony stimulating factor attenuates endometrial fibrosis via sonic hedgehog transcriptional activator Gli2 \uparrow . *Biology of Reproduction*. 2018; 98(4): 480–90.
24. Jang, H., Myoung, S., Choe, J., Kim, T., Cheon, Y., Kim, Y., et al. Effects of Autologous Platelet-Rich Plasma on Regeneration of Damaged Endometrium in Female Rats. *Yonsei Medical Journal*. 2017; 58(6): 1195.
25. Xiangzhen W., Nana Ma., Qiannan S., Chenlingzi H., Yanmei L., Xin Lu. Elevated NF- κ B signaling in Asherman syndrome patients and animal models. *Oncotarget*. 2017; 8: 15399–406.
26. Kilic S., Yuksel B., Pinarli F., Albayrak A., Boztok B., Delibasi T. Effect of stem cell application on Asherman syndrome, an experimental rat model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2014; 31(8): 975–82.
27. Römer T., Müller J., and Foth D. Hydrothermal ablation. A new simple method for coagulating endometrium in patients with therapyresistant recurring hypermenorrhea. *Contrib. Gynecol. Obstet*. 2000; 20: 154–60.
28. Xiao L., Song Y., Huang W., Yang S., Fu J., Feng X., et al. Expression of SOX2, NANOG and OCT4 in a mouse model of lipopoly-saccharide-induced acute uterine injury and intrauterine adhesions. *Reprod. Biol. Endocr*. 2017; 15(1): 1423.
29. Liu F., Zhu Z.-J., Li P., He Y. Creation of a female rabbit model for intrauterine adhesions using mechanical and infectious injury. *Journal of Surgical Research*. 2013; 183(1): 296–303.
30. Kaya C., Sever N., Cengiz H., Yıldız Ş., Ekin M., Yaşar, L. A randomized controlled study of the efficacy of misoprostol and hyaluronic acid in preventing adhesion formation after gynecological surgery: a rat uterine horn model. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2014; 176: 44–9.
31. Hu J., Zeng B., Jiang X., Hu L., Meng Y., Zhu, Y., et al. The expression of marker for endometrial stem cell and fibrosis was increased in intrauterine adhesions. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2015; 8(2): 1525–34.
32. Gargett C., Schwab K., Deane, J. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum. Reprod. Update*. 2016; 22(2): 137–63.
33. Miyazaki K., Maruyama T. Partial regeneration and reconstruction of the rat uterus through recellularization of a decellularized uterine matrix. *Biomaterials*. 2014; 35: 8791–800.
34. Wiesenfeld H., Hillier SL., Krohn M., Amortegui A., Heine R., Landers D., Sweet R. Lower genital tract infection and endometriosis: insight into subclinical pelvic inflammatory disease. *Obstet. Gynecol*. 2002; 100 (3): 456–63.

35. Atkins H., Bharadwaj M., O'Brien Cox A., Furdui C., Appt S., Caudell D. Endometrium and endometriosis tissue mitochondrial energy metabolism in a nonhuman primate model. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2019; 17(1): 7.
36. Kuznetsova A.V. Chronic endometritis. *Arkhiv patologii*. 2000; 3: 48–52. (in Russian)
37. Aylamazyan E.K., Gzgyan A.M., Savinov P.A. et al. The endometrial implants reaction after the experimental mechanical tissue damage. *Zurn. Akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2012; LXI(3): 24–30. (in Russian)
38. Li, R., Maimai, T., Yao, H., Liu, X., He, Z., Xiao, C., Xie, G. (2019). Protective effects of polydatin on LPS-induced endometritis in mice. *Microbial Pathogenesis*, 137, 103720. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103720>
39. Hu, X., Li, D., Wang, J., Guo, J., Li, Y., Cao, Y., Fu, Y. (2018). Melatonin inhibits endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced endometritis in mice. *International Immunopharmacology*, 64, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.08.028>
40. Liang, Y., Shen, T., Ming, Q., Han, G., Zhang, Y., Liang, J., & Zhu, D. (2018). Alpinetin ameliorates inflammatory response in LPS-induced endometritis in mice. *International Immunopharmacology*, 62, 309–312. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.07.010>
41. Zhao, G., Zhang, T., Wu, H., Jiang, K., Qiu, C., & Deng, G. (2019). MicroRNA let-7c Improves LPS-Induced Outcomes of Endometritis by Suppressing NF- κ B Signaling. *Inflammation*, 42(2), 650–657. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0922-4>
42. Wu, Haichong, Zhao Gan, Kangfeng Jiang, Chengye Li, Changwei Qiu, and Ganzhen Deng. (2016). Engeletin alleviates lipopolysaccharide-induced endometritis in mice by inhibiting TLR4-mediated NF- κ B activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64 (31): 6171–78. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02304>.
43. Zhang, H., Wu, Z., Yang, Y., Shaukat, A., Yang, J., Guo, Y., Shi, D. (2019). Catalpol ameliorates LPS-induced endometritis by inhibiting inflammation and TLR4/NF- κ B signaling. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 20(10), 816–27. doi:10.1631/jzus.b1900071
44. Guo, J., Wang, Y., Jiang, P., Yao, H., Zhao, C., Hu, X., Shen, H. (2019). Sodium butyrate alleviates lipopolysaccharide-induced endometritis in mice through inhibiting inflammatory response. *Microbial Pathogenesis*, 103792. doi:10.1016/j.micpath.2019.103792
45. Zhang, Z., Guo, Y., Liu, Y., Li, C., Guo, M., & Deng, G. (2017). IFN- τ Displays Anti-Inflammatory Effects on Staphylococcus aureus Endometritis via Inhibiting the Activation of the NF- κ B and MAPK Pathways in Mice. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/23350482>
46. Hu, X., Guo, J., Xu, M., Jiang, P., Yuan, X., Zhao, C., Fu, Y. (2019). Clostridium tyrobutyricum alleviates Staphylococcus aureus -induced endometritis in mice by inhibiting endometrial barrier disruption and inflammatory response. *Food & Function*. <https://doi.org/10.1039/c9fo00654k>
47. Jiang, K., Chen, X., Zhao, G., Wu, H., Mi, J., Qiu, C., Deng, G. (2017). IFN- τ plays an anti-inflammatory role in staphylococcus aureus-induced endometritis in mice through the suppression of NF- κ B pathway and MMP9 expression. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 37(2), 81–89. <https://doi.org/10.1089/jir.2016.0058>
48. Wang, X., Yuan, T., Yin, N., Ma, X., Zhang, Z., Zhu, Z., Deng, G. (2018). Luteolide Protects the Uterus from Staphylococcus aureus-Induced Inflammation, Apoptosis, and Injury. *Inflammation*, 41(5), 1702–1716. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0814-7>
49. Liu, Y., Qiu, C., Li, W., Mu, W., Li, C., & Guo, M. (2016). Selenium Plays a Protective Role in Staphylococcus aureus-Induced Endometritis in the Uterine Tissue of Rats. *Biological Trace Element Research*, 173(2), 345–353. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0659-6>
50. Asano, K., Narita, K., Hirose, S., & Nakane, A. (2018). Contribution of toxic shock syndrome toxin-1 to systemic inflammation investigated by a mouse model of cervicovaginal infection with Staphylococcus aureus. *Medical Microbiology and Immunology*, 207(5–6), 297–306. <https://doi.org/10.1007/s00430-018-0551-4>
51. Cuevas, M., Cruz, M.L., Ramirez, A.E., Flores, I., Thompson, K.J., Bayona, M., Appleyard, C.B. (2018). Stress During Development of Experimental Endometriosis Influences Nerve Growth and Disease Progression. *Reproductive Sciences*, 25(3), 347–57. <https://doi.org/10.1177/1933719117737846>
52. Hernandez, S., Cruz, M.L., Seguinot, I.I., Torres-Reveron, A., & Appleyard, C.B. (2017). Impact of Psychological Stress on Pain Perception in an Animal Model of Endometriosis. *Reproductive Sciences*, 24(10), 1371–81. <https://doi.org/10.1177/1933719116687655>
53. Hernandez, S., Cruz, M.L., Torres-Reveron, A., & Appleyard, C.B. (2015). Impact of physical activity on pain perception in an animal model of endometriosis. *Journal of Endometriosis*, 7(3), 100–108. <https://doi.org/10.5301/je.5000231>
54. Appleyard, C.B., Cruz, M. L., Hernández, S., Thompson, K.J., Bayona, M., & Flores, I. (2015). Stress management affects outcomes in the pathophysiology of an endometriosis model. *Reproductive Sciences*, 22(4), 431–441. <https://doi.org/10.1177/1933719114542022>
55. Cuevas, M., Flores, I., Thompson, K.J., Ramos-Ortolaza, D.L., Torres-Reveron, A., & Appleyard, C.B. (2012). Stress exacerbates endometriosis manifestations and inflammatory parameters in an animal model. *Reproductive Sciences*, 19(8), 851–862. <https://doi.org/10.1177/1933719112438443>

Сведения об авторах:

Денисова Юлия Вадимовна, студентка 5-го курса Международной школы «Медицина будущего» Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета), e-mail: yuliya.sheveleva.97@mail.ru;

Мандра Екатерина Владимировна, студентка 5-го курса Международной школы «Медицина будущего» Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета), e-mail: emandra97@mail.ru;

Люндуп Алексей Валерьевич, канд. мед. наук, директор департамента по направлению «Фармацевтическая отрасль» АО «Национальная инжиниринговая корпорация», e-mail: lyundup@gmail.com;

Александров Леонид Семёнович, доктор мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии № 1 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета), e-mail: leonid.aleks@bk.ru;

Ищенко Анатолий Иванович, доктор мед. наук, проф., директор клиники акушерства и гинекологии им. И.Ф. Снегирёва Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, зав. каф. акушерства и гинекологии № 1 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета), e-mail: liubella.2011@mail.ru;

Никонов Андрей Павлович, доктор мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии № 1 Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовского Университета), e-mail: nikonov2ao@yandex.ru