

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 28.07.2020
Подписано к печати 05.08.2020
Опубликовано 21.08.2020

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. № 3. 1–162

Перепечатка материалов и использование их в любой форме, в том числе и в электронных СМИ, возможны только с письменного разрешения издателя. За содержание рекламных публикаций ответственность несет рекламодатель.

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2020.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

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

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

Том 64 № 3 · 2020

Июль–Сентябрь

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 07/28/2020
Signed for publication on 08/05/2020
Published on 08/21/2020

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 3. 1-162

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

© IE Irishkin Dmitry Andreevich, 2020.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

Russian Academy of Sciences

Russian Society of Pathophysiologists

With the support of the Research Institute of General Pathology and Pathophysiology

PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

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

Vol. 64 № 3 · 2020
July–September

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*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Невидимова Т.И., Ветрилэ Л.А., Давыдова Т.В., Захарова И.А., Савочкина Д.Н., Галкин С.А., Бохан Н.А.** Цитокиновый профиль и антитела к нейромедиаторам при коморбидном течении депрессии и алкогольной зависимости у женщин..... 5
- Галкин С.А., Пешковская А.Г., Кисель Н.И., Рощина О.В., Мандель А.И., Иванова С.А., Бохан Н.А.** Нарушения пространственной рабочей памяти и ее нейрофизиологические корреляты при алкогольной зависимости..... 12
- Маркелова Е.В., Зенина А.А., Шуматов В.Б., Силаев А.А.** Роль нейропептидов в развитии послеоперационной когнитивной дисфункции у пациентов с ишемической болезнью сердца после аортокоронарного шунтирования .. 20
- Иванова Н.А., Бурденный А.М., Логинов В.И., Кураева Т.Л., Носиков В.В.** Роль полиморфных маркеров гена IL10 в патогенезе сахарного диабета 1-го типа 29
- Демяшкин Г.А., Шаповалова Е.Ю., Маланичев М.Ю., Погосян Д.А., Батов М.А., Зорин И.А., Щекин В.И.** Молекулярно-биологическая характеристика промежуточных филаментов кератиноцитов интактной кожи в условиях системного воспаления..... 34
- Морозов С.Г., Копасов А.Е.** Киназа mTOR и ассоциированные с ней белки в клетках кожи, выделенных при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением..... 40
- Копасов А.Е., Волкова Е.Н., Блохин С.Н., Морозов С.Г.** Уровень хемокинов, продуцируемых кератиноцитами и фибробластами кожи, при абдоминопластике у пациентов с нормальной массой тела и ожирением..... 47
- Силина Е.В., Мантурова Н.Е., Артюшкова Е.Б., Литвицкий П.Ф., Васин В.И., Синельникова Т.Г., Гладченко М.П., Крюков А.А., Аниканов А.В., Каплин А.Н., Наумзада М.Д.З., Ступин В.А.** Динамика заживления кожной раны при применении инъекционных стимуляторов регенерации у крыс..... 54
- Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н., Гусева Е.С., Давыдов С.О., Файн И.В.** Влияние умеренной физической нагрузки на взаимосвязь вариабельности сердечного ритма с уровнем кровяного давления и гемодинамическими функциями у женщин, страдающих гипертонической болезнью 64
- Левин Г.Я., Поповичева А.Н., Соснина Л.Н.** Гемореологические нарушения у детей после термической травмы ... 74
- Оганесян Д.Х., Брин В.Б., Кабисов О.Т.** Изменение параметров системной гемодинамики на фоне гиперкальциемии в условиях сочетанного и изолированного введения кобальта и цинка 80
- Фефелова Е.В., Терешков П.П., Цыбиков Н.Н., Максименя М.В.** Изменение фенотипа лимфоцитов периферической крови здоровых и больных ишемической болезнью сердца при экзогенной гипергомоцистеинемии 87
- Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Воронина Т.А.** Влияние гимантана в наружной лекарственной форме на вызванную полным адьювантом Фрейнда неспецифическую воспалительную реакцию у крыс при разных схемах применения 93

ORIGINAL ARTICLES

- Nevidimova T.I., Vetrile L.A., Davydova T.V., Zakharova I.A., Savochkina D.N., Galkin S.A., Bokhan N.A.** Cytokine profile and antibodies to neurotransmitters during comorbid depression and alcohol dependence in women
- Galkin S.A., Peshkovskaya A.G., Kisel N.I., Roshchina O.V., Mandel A.I., Ivanova S.A., Bokhan N.A.** Disturbance of spatial working memory and its neurophysiological correlates in alcohol dependence
- Markelova E.V., Zenina A.A., Shumatov V.B., Silaev A.A.** The role of neuropeptides in the development of postoperative cognitive dysfunction in patients with coronary heart disease after coronary artery bypass grafting
- Ivanova N.A., Burdenny A.M., Loginov V.I., Kuraeva T.L., Nosikov V.V.** The pathogenic role of IL10 gene polymorphisms in type 1 diabetes mellitus
- Demyashkin G.A., Shapovalova E.Yu., Malanichev M.Yu., Pogoyan D.A., Batov M.A., Zorin I.A., Shchekin V.I.** Molecular and biological characteristics of keratin intermediate filaments in intact skin under systemic inflammation
- Morozov S.G., Kopasov A.E.** The mTOR kinase and its associated proteins in skin cells isolated during abdominoplasty in patients with normal body weight and obesity
- Kopasov A.E., Volkova E.N., Blokhin S.N., Morozov S.G.** Levels of keratinocyte- and fibroblast-derived chemokines in skin cells isolated from abdominoplasty surgical materials from patients with normal weight and obesity
- Silina E.V., Manturova N.E., Artyushkova E.B., Litvitskiy P.F., Vasin V.I., Sinelnikova T.G., Gladchenko M.P., Kryukov A.A., Anikanov A.V., Kaplin A.N., Naimzada M.D.Z., Stupin V.A.** Dynamics of skin wound healing with the use of injectable regeneration stimulators in rats
- Kuznik B.I., Smolyakov Yu.N., Guseva E.S., Davydov S.O., Fine I.V.** Effect of moderate physical exercises on the relationship of variability of the heart rhythm with the level of blood pressure and hemodynamic functions in women with essential hypertension
- Levin G.Ya., Popovicheva A.N., Sosnina L.N.** Hemorheological disorders in children with thermal trauma
- Oganesyan D.H., Brin V.B., Kabisov O.T.** Changes in parameters of systemic hemodynamics associated with hypercalcemia in combined and isolated administration of cobalt and Z
- Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Tsybikov N.N., Maximenya M.V.** Changes in the phenotype of peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and patients with ischemic heart disease in exogenous hyperhomocysteinemia
- Ivanova E.A., Matyushkin A.I., Voronina T.A.** Effect of different dosage regimens of a topical formulation of Hemantane on complete Freund's adjuvant-induced nonspecific inflammation in rats

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

- Афанасьевская Е.В., Медведева Е.В., Газимиева Б.М., Куренкова А.Д., Кытько О.В., Панюшкин П.В., Истранов Л.П., Истранова Е.В., Шехтер А.Б., Лычагин А.В., Чагин А.С., Тельпухов В.И.** Сравнение хондропластических свойств коллагеновых мембран Chondro-Gide® и Хондротек не выявило различий в условиях модели полнослойного повреждения артикулярного хряща у крыс..... 102
- Касатова А.И., Каныгин В.В., Разумов И.А., Таскаев С.Ю., Касатов Д.А., Бывальцев В.А.** Исследование биологической эффективности бор-нейтронозахватной терапии на клетках глиомы и меланомы человека 110
- Тучина Т.П., Розога О.В., Скотникова К.П., Лебедев Д.А., Грозов Р.В., Бабенко А.Ю., Галагудза М.М.** Морфологические особенности эндокриноцитов поджелудочной железы крыс с сахарным диабетом 2-го типа при разной длительности терапии инкретиномиметиками 117

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Плотников М.Б., Алиев О.И., Сидехменова А.В., Шаманаев А.Ю., Анищенко А.М.** Влияние дигидрокверцетина на артериальное давление и гемореологические параметры крыс SHR в периоды развития и стабильной артериальной гипертензии..... 126
- Осиков М.В., [Симонян Е.В.], Бакеева А.Е., Огнева О.И.** Динамика показателей перекисного окисления липидов в толстом кишечнике при экспериментальной болезни Крона в условиях применения ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ куркумы длинной 131

ОБЗОРЫ

- Степанов И.А., Белобородов В.А., Шамеева М.А.** Молекулярные и клеточные механизмы резистентности глиобластомы к ингибиторам фактора роста эндотелия сосудов .. 137
- Гаврилов Г.В., Станишевский А.В., Гайдар Б.В., Свистов Д.В.** Идиопатическая нормотензивная гидроцефалия. Ретроспектива гипотез патогенеза и современные теории... 146

МЕТОДИКА

- Гришачёва Т.Г., Михайлова И.А., Петрищев Н.Н., Кривченко А.И., Струй А.В.** Мониторинг скорости кровотока в венулах брыжейки крыс..... 156

- Afanasyevskaya E.V., Medvedeva E.V., Gazimieva B.M., Kurenkova A.D., Kytko O.V., Panyushkin P.V., Istranov L.P., Istranova E.V., Shekhter A.B., Lychagin A.V., Chagin A.S., Telpukhov V.I.** Comparison of chondro-plastic properties of the chondrogide and chondro-teck collagen membranes did not reveal reparative differences in the rat model of full thickness defect of articular cartilage
- Kasatova A.I., Kanygin V.V., Razumov I.A., Taskaev S.Yu., Kasatov D.A., Byvaltsev V.A.** Biological effectiveness of boron neutron capture therapy in human glioma and melanoma cells
- Tuchina T.P., Rogoza O.V., Skotnikova K.P., Lebedev D.A., Grozov R.V., Babenko A.Yu., Galagudza M.M.** Morphological features of pancreatic endocrinocytes in rats with type 2 diabetes mellitus receiving the incretin mimetic therapy of different duration

BRIEF REPORTS

- Plotnikov M.B., Aliev O.I., Sidekhmenova A.V., Shamanaev A.Y., Anishchenko A.M.** Effects of dihydroquercetin on blood pressure and hemorheological parameters in SHR rat during early and stable arterial hypertension
- Osikov M.V., [Simonyan E.V.], Bakeeva A.E., Ogneva O.I.** Dynamics of lipid peroxidation in the large intestine during experimental Crohn's disease and the use of rectal suppositories with long turmeric extract

REVIEWS

- Stepanov I.A., Beloborodov V.A., Shameeva M.A.** Molecular and cellular mechanisms of glioblastoma resistance to vascular endothelial growth factor inhibitors
- Gavrilov G.V., Stanishevskiy A.V., Gaydar B.V., Svistov D.V.** Idiopathic normal pressure hydrocephalus. Retrospective review of pathogenesis and modern theories

METHODS

- Grishacheva T. G., Mikhailova I.A., Petrishchev N.N., Krivchenko A.I., Strui A.V.** Monitoring blood flow velocity in rat mesenteric venules

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

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

Цитокиновый профиль и антитела к нейромедиаторам при коморбидном течении депрессии и алкогольной зависимости у женщин

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

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

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

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

Цель исследования – сравнительный анализ содержания про- и противовоспалительных цитокинов и аутоантител к нейромедиаторам дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК в сыворотке крови пациенток с алкогольной зависимостью и депрессией разной степени тяжести.

Методика. Клиническое обследование и создание банка биологического материала выполнены на базе отделений аффективных расстройств и аддиктивных состояний и лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН. Исследована сыворотка крови 52 женщин в возрасте 40-55 лет: 17 условно здоровых лиц, и 35 пациенток с аффективными и аддиктивными расстройствами. В соответствии с МКБ-10 у 6 пациенток диагностирован синдром зависимости от алкоголя (F10.2). У 29 пациенток диагностирована депрессия разной степени тяжести. В подгруппу легкой депрессии (сумма баллов по шкале Гамильтона HDRS до 16 баллов включительно) вошли 13 пациенток: 5 с депрессивным эпизодом легкой степени F32.0 и 8 с дистимией F34.1. В подгруппу умеренной депрессии (сумма баллов по шкале Гамильтона выше 16 баллов) вошли 16 пациенток: 7 с депрессивным эпизодом средней степени F32.1 и 9 с рекуррентной депрессией F33.1. Антитела к нейромедиаторам дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа на полистироловых планшетах, активированных соответствующими тест-антигенами. Интерлейкины в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем производства ООО Цитокин (Санкт-Петербург). Определяли баланс провоспалительных цитокинов – интерлейкинов (ИЛ 1β, ИЛ 6) и противовоспалительных – ИЛ 10.

Результаты. Уровень аутоантител к нейромедиаторам связан с тяжестью депрессии. При легкой депрессии отличия от контрольного уровня незначительны. При умеренной депрессии повышен уровень антител к серотонину, глутамату и ГАМК. Спектр антител при алкоголизме сходен с таковым при умеренной депрессии. Можно предполагать, что данные паттерны отражают коморбидное течение депрессии и аддикции. Соотношение содержания провоспалительного (ИЛ 6) и противовоспалительного (ИЛ 10) цитокинов в сыворотке крови при алкоголизме незначительно отличалось от контрольного уровня, в то время как при отягощении депрессии это соотношение существенно повышалось и у 20% обследованных в явной форме указывало на преобладание воспаления над компенсаторными процессами.

Заключение. Феномен нейровоспаления не является достаточным для понимания нейроиммунных механизмов коморбидной патологии. Иммунорегуляция нейромедиаторного обмена является новым источником информации о нейроиммунном дисбалансе при сочетанных расстройствах.

Ключевые слова: алкоголизм; депрессия; антитела к нейромедиаторам; цитокины.

Для цитирования: Невидимова Т.И., Ветрилэ Л.А., Давыдова Т.В., Захарова И.А., Савочкина Д.Н., Галкин С.А., Бохан Н.А. Цитокиновый профиль и антитела к нейромедиаторам при коморбидном течении депрессии и алкогольной зависимости у женщин. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 5-11.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.5-11

Для корреспонденции: Давыдова Татьяна Викторовна, e-mail: dav-ta@yandex.ru

Участие авторов: Невидимова Т.И. – написание статьи и статистическая обработка результатов исследования; Ветрилэ Л.А., Захарова И.А. – синтез тест-антигенов, иммуноферментный анализ антител к нейромедиаторам, определение интерлейкинов; Савочкина Д.Н., Галкин С.А. – сбор материала, создание банка клинических данных; Давыдова Т.В. – руководство по проведению исследований, редактирование статьи; Бохан Н.А. – общее консультативное руководство по проблеме депрессии и алкогольной зависимости. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (отделение гуманитарных и общественных наук) Грант № 19-06-330.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.04.2020

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

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

Cytokine profile and antibodies to neurotransmitters during comorbid depression and alcohol dependence in women

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya 8, Moscow 125315, Russia;

²Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Aleutskaya Str. 4, Tomsk 634014, Russia

Aim. Comparative analysis of concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines and autoantibodies to the neurotransmitters dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine, glutamate, and GABA in the blood serum of female patients with alcohol dependence and depression of different severity.

Methods. Clinical examination and creation of a bank of biological material were performed at the Departments of Affective Disorders and Addictive Conditions and the Laboratory of Clinical Psychoneuroimmunology and Neurobiology of the Mental Health Institute, Tomsk Scientific Research Center of the Russian Academy of Sciences. Blood serum of 52 women aged 40-55 years was studied, including 17 conditionally healthy individuals, and 35 patients with affective and addictive disorders. In accordance with ICD-10, 6 patients were diagnosed with alcohol dependence syndrome (F10.2), and 29 patients were diagnosed with depression of different severity. The subgroup of mild depression with a Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) score ≤ 16 included 13 patients (5 with a mild depressive episode F32.0 and 8 with dysthymic disorder F34.1). The subgroup of moderate depression with a total HDRS score > 16 included 16 patients (7 with a moderate depressive episode F32.1 and 9 with recurrent depression F33.1). Serum antibodies to the neurotransmitters dopamine (DA), norepinephrine (NA), 5-hydroxytryptamine (5-HT), glutamate (GLU), and GABA were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on polystyrene plates activated with the respective test antigens. Serum interleukins (IL) were measured using ELISA test systems. The balance of pro-inflammatory (IL 1 β and IL 6) and anti-inflammatory (IL 10) cytokines was determined. Statistical analysis was performed with the ϕ Fisher criteria, and data were graphically presented as mean values.

Results. Concentrations of autoantibodies to neurotransmitters were related with the severity of depression. In mild depression, differences from the control values were negligible. In moderate depression, levels of antibodies to 5-hydroxytryptamine, glutamate, and GABA were increased. In alcohol dependence, the array of antibodies was similar to that in moderate depression. These patterns apparently reflect the comorbid course of depression and addiction. The ratio of pro-inflammatory (IL 6) to anti-inflammatory (IL 10) cytokine serum concentrations in alcohol dependence was slightly different from the control ratio. At the same time in more severe depression, this ratio significantly increased and clearly indicated prevalence of inflammation over compensatory processes in 20% of the patients.

Conclusion. The phenomenon of neuroinflammation is not sufficient to understand neuroimmune mechanisms of the comorbid pathology. Immunoregulation of neurotransmitter metabolism is a new source of information about neuroimmune imbalance in combined disorders.

Keywords: alcohol dependence; depression; antibodies to neurotransmitters; cytokines.

For citation: Nevidimova T.I., Vetrile L.A., Davydova T.V., Zakharova I.A., Savochkina D.N., Galkin S.A., Bokhan N.A. Cytokine profile and antibodies to neurotransmitters during comorbid depression and alcohol dependence in women. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 5-11. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.5-11

For correspondence: Davydova Tatyana Viktorovna,

Doctor of Medical Science, Chief Researcher, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow; e-mail: dav-ta@yandex.ru

Contribution: statistical processing, writing a text – Nevidimova T.I.; synthesis of test antigens, enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to neurotransmitters, determination of interleukins – Vetrile L.A., Zakharova I.A.; collecting material, creating a clinical data bank – Savochkina D.N., Galkin S.A.; research guide, article editing – Davydova T.V.; general advisory guide for depression and alcohol dependence – Bokhan N.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

Acknowledgment. The study was supported by a RFBR grant № 19-013-00330.

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

Information about the authors:Nevidimova T.I., <http://orcid.org/0000-0002-5084-9200>Vetrile L.A., <http://orcid.org/0000-0001-9783-4711>Davydova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-3176-1035>Savochkina D.N., <http://orcid.org/0000-0003-1263-5516>Bokhan N.A., <http://orcid.org/0000-0002-1052-855X>

Received 14.04.2020

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

В настоящее время патогенетические нейроиммунные механизмы коморбидности депрессии и расстройств, связанных с употреблением алкоголя, рассматриваются чаще всего через призму нейровоспаления и соответствующего ему каскада цитокиновых реакций. В современной литературе большое внимание уделяется повышенной проницаемости слизистой кишечника с последующей активацией иммунной системы как важному патогенетическому звену психопатологии [1]. Алкоголь делает эти ворота иммуноопосредованной психопатологии еще более уязвимыми. Этанол, бактериальные липополисахариды, пищевые антигены программируют иммунные клетки на периферии, а также глиальные клетки на продукцию провоспалительных цитокинов. Провоспалительные цитокины в мозге активируют ферментативные реакции, переключающие метаболизм триптофана с выработки серотонина на потенциально нейротоксический кинурениновый путь. Депрессия (сама по себе и связанная с хроническими воспалительными состояниями) подпитывает нейроиммунную дисрегуляцию, вызывая дальнейшую нейродегенерацию, аффективные расстройства, симптомы тревоги и потерю поведенческого контроля – все признаки, характерные для расстройств, связанных с приемом алкоголя [2]. Нейровоспаление и устойчивый нейроиммунный дисбаланс при алкоголизме, депрессии и посттравматическом расстройстве изменяют поведение, которое по принципу порочного круга может увеличивать дальнейший риск развития нейровоспаления, которое делает пациентов уязвимыми для коморбидных психических расстройств. При всей правдоподобности гипотеза нейровоспаления не находит в настоящее время существенных подтверждений: уровень AUDIT (теста риска злоупотребления алкоголем) связан не с уровнем цитокинов, а с уровнем депрессии, равно как и депрессия не связана с уровнем циркулирующих цитокинов [3]. Вместе с тем цитокины, не имея диагностического значения, могут быть связаны с определенными подтипами или с симптомами депрессии [4]. Фармакотерапия, направленная на нейровоспаление, является

возможным вариантом лечения заболеваний, а феномен нейровоспаления при всей его важности не является достаточным для изучения нейроиммунных механизмов коморбидной патологии. Иммунорегуляция нейромедиаторного обмена является новым источником информации о нейроиммунном дисбалансе при сочетанных расстройствах. Вероятным общим патогенетическим звеном, обеспечивающим коморбидность синдрома зависимости и аффективных расстройств, является система вознаграждения, причем в качестве её медиаторов, в том числе при алкоголизме, все чаще называется не только дофамин, но и глутамат, ГАМК, интерлейкин-6 [5-7]. У лиц женского пола, начавших злоупотреблять алкоголем во второй половине жизни, отмечается особый тип коморбидности. Во всех случаях причиной алкоголизма в этой группе называется ситуация эмоциональной утраты. Депрессия способствует развитию аддикции с предпочтением алкоголя всем другим психоактивным веществам, что актуализирует поиск биомаркеров риска и превенции формирования зависимости на фоне депрессии [8, 9].

Исследуемый нами профиль антинейромедиаторных антител в совокупности с цитокиновым профилем позволит оценивать риск формирования и/или рецидивирования зависимого поведения при депрессии, что способствует прерыванию порочного круга этих расстройств и переходу нейроиммунного анализа на прогностический уровень.

Цель исследования – сравнительный анализ содержания про- и противовоспалительных цитокинов и аутоантител к нейромедиаторам дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК в сыворотках крови пациенток с алкогольной зависимостью и депрессией разной тяжести.

Методика

Клиническое обследование и создание банка биологического материала выполнены на базе отделений аффективных расстройств и аддиктивных состояний и лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН. Исследования выполнены в соот-

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

Исследована сыворотка крови 52 женщин в возрасте 40–55 лет: 17 условно здоровых лиц и 35 пациенток с аффективными и аддиктивными расстройствами. В соответствии с МКБ-10 у 6 пациенток диагностирован синдром зависимости от алкоголя (F10.2). У 29 пациенток диагностирована депрессия разной степени тяжести. В подгруппу легкой депрессии с суммой баллов по шкале Гамильтона HDRS до 16 баллов включительно вошли 13 пациенток (5 с депрессивным эпизодом легкой степени F32.0 и 8 с дистимией F34.1). В подгруппу умеренной депрессии с суммой баллов по шкале Гамильтона выше 16 баллов вошли 16 пациенток (7 с депрессивным эпизодом средней степени тяжести F32.1 и 9 с рекуррентной депрессией F33.1). Критерием включения явилось информированное согласие пациента (добровольца) на участие в исследовании, критерием исключения – наличие неврологической патологии, соматических расстройств в стадии обострения. Кровь для исследования у больных и лиц группы сравнения брали однократно.

Антитела (АТ) к нейромедиаторам (НМ) дофамину (ДА), норадреналину (НА), серотонину, глутамату (ГЛУ) и гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на полистироловых планшетах, активированных соответствующими тест-антигенами [9]. В качестве тест-антигенов использовали конъюгаты нейромедиатора с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Тест-антигены ДА-БСА и серотонин-БСА синтезировали с использованием диазотированного белка, тест-антигены НА-БСА, ГЛУ-БСА и ГАМК-БСА – с использованием бифункционального реагента глутарового альдегида. В качестве вторичных диагностических антител использовали антитела к иммуноглобулинам человека, меченные пероксидазой хрена (Serva). Содержание АТ оценивали по оптической плотности сыворотки при $\lambda=492$ нм с использованием считывающего устройства Mini-reader (ImmunoChem-2100, США) и выражали в условных единицах активности (усл. ед.) показателем «К» – отношением оптической плотности сыворотки каждого больного к среднему значению оптической плотности сывороток здоровых доноров.

Интерлейкины в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием

тест-систем производства ООО Цитокин (Санкт-Петербург). Чувствительность тест-систем составляет 4–5 пг/мл. Определяли баланс провоспалительных (ИЛ 1 β и ИЛ 6) и противовоспалительных (ИЛ 10) цитокинов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием углового преобразования Фишера, а графически представляли в виде средних значений.

Результаты

Как показали наши исследования уровень аутоантител к нейромедиаторам связан с тяжестью депрессии (**рис. 1**).

При легкой депрессии отличия от контрольного уровня незначительны, хотя прослеживается тенденция к снижению уровня антител к дофамину и норадреналину, обнаруженная нами ранее в группах риска по употреблению психоактивных веществ. При умеренной депрессии повышен уровень антител к серотонину, глутамату и ГАМК. Малый размер группы пациенток с алкоголизмом не позволил получить статистически значимых отличий, однако спектр антител в этой группе указывает на ее родство с группой умеренной депрессии. Можно предполагать, что данные паттерны отражают коморбидное течение депрессии и аддикции.

Соотношение содержания провоспалительного (ИЛ 6) и противовоспалительного (ИЛ 10) цитокинов в сыворотке крови при алкоголизме незначительно отличалось от контрольного уровня, в то время как при умеренной депрессии это соотношение существенно изменялось (**рис. 2**). Так, у 20% обследованных соотношение в явной форме указывало на преобладание воспаления над компенсаторными процессами. Ранее нами было показано, что формирование зависимости от психоактивных веществ сопровождается ростом продукции про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ 6, ИЛ 10). Продукция ИЛ-10 повышается уже на этапе эпизодического употребления психоактивных веществ, равно как и внутриклеточный синтез ИЛ-6 [10]. Не исключено, что это связано с коморбидными аффективными расстройствами.

Обсуждение

В контексте профилактики формирования алкогольной зависимости и/или ее рецидива наибольший интерес представляет общность иммунонейромедиаторного профиля при коморбидной патологии. Можно предполагать, что полученные нами ранее [8, 9] сведения о снижении уровня АТ к норадреналину и до-

фамину у больных алкоголизмом отражают развитие у них депрессивной симптоматики с дефицитом моноаминов, которая в свою очередь может быть причиной патологического влечения к алкоголю. Было обнаружено также увеличение содержания антител к се-

ротонину при алкоголизме и депрессии, сочетанной с алкоголизмом. Рост уровня антител к серотонину на фоне сниженного уровня антител к катехоламинам указывает на переход от обострения патологического влечения к его реализации, т. е. к систематическо-

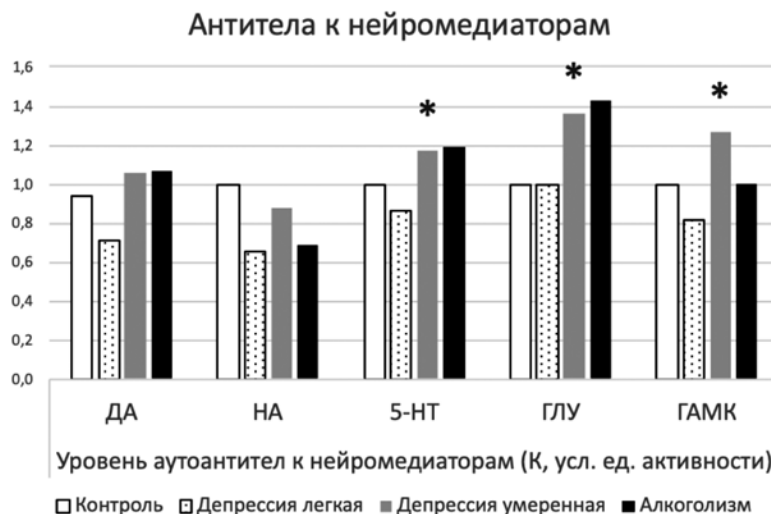


Рис. 1. Аутоантитела к нейромедиаторам при депрессии разной тяжести и алкоголизме.

По оси ординат – уровень аутоантител к нейромедиаторам в сыворотке крови (показатель «К» – отношение оптической плотности сыворотки каждого больного к среднему значению оптической плотности сывороток здоровых доноров, условные единицы активности). По оси абсцисс – вид нейромедиатора: ДА – дофамин; НА – норадреналин; 5-НТ – серотонин; ГЛУ – глутамат; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота.

* $p < 0,05$ – статистическая значимость различий при сравнении с контролем.

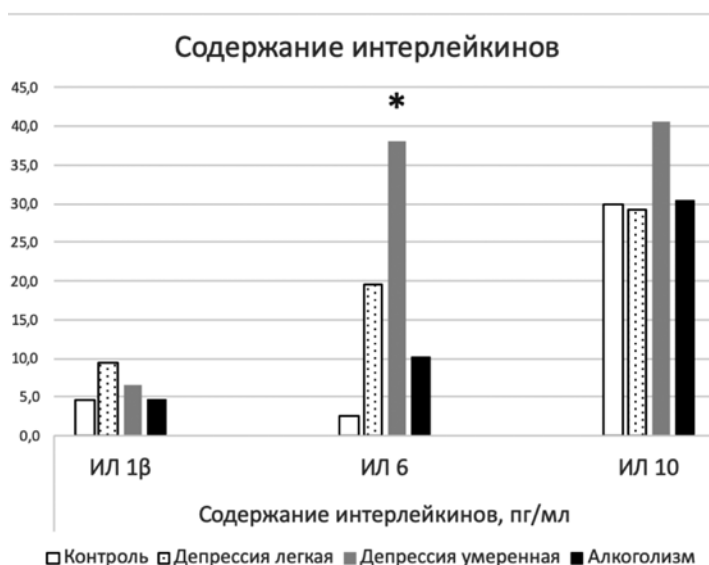


Рис. 2. Сывороточные интерлейкины при депрессии разной тяжести и алкоголизме.

По оси ординат – уровень интерлейкинов в сыворотке крови, пг/мл.

* $p < 0,05$ – статистическая значимость различий при сравнении с контролем.

му употреблению алкоголя, сопровождающемуся выбросом серотонина. Не исключено также, что подобная реакция характерна только для респондеров: чем большее антидепрессивное действие оказывает алкоголь, тем больше риск формирования зависимости от него. Хроническая алкогольная интоксикация приводит к изменению функционального состояния практически всех нейромедиаторных систем мозга и сопровождается серьезными нарушениями нейроиммунных взаимодействий, что выражается в увеличении продукции провоспалительных цитокинов и индукции синтеза аутоантител к нейромедиаторам, их рецепторам и другим антигенам мозга [10, 11]. Нон-респондеры могут в течение продолжительного времени оставаться на стадии эпизодического употребления или употребления алкоголя с вредными последствиями без формирования синдрома зависимости, что не исключает поиск такими пациентами иных средств снятия эмоционального напряжения. Оба прогностических сценария указывают на необходимость своевременной коррекции антидепрессивной терапии на основании клинико-нейроиммунного анализа. Участие нейровоспаления в коморбидной патологии требует дальнейшего изучения. Особенности коморбидности депрессии и алкогольной зависимости у женщин зрелого возраста могут заключаться в том, что запуск цитокинового механизма воспаления и нейровоспаления является маркером депрессии и точкой приложения противовоспалительной терапии для профилактики формирования алкогольной зависимости. Возможно, препараты на основе антител к интерлейкину-6 целесообразны при депрессии как патологии с воспалительным и аутоиммунным компонентами.

Заключение

Фармакотерапия, направленная на нейровоспаление, является возможным вариантом лечения аффективных и аддиктивных расстройств, но феномен нейровоспаления, при всей его важности, не является достаточным для понимания нейроиммунных механизмов коморбидной патологии. Иммунорегуляция нейромедиаторного обмена является новым источником информации о нейроиммунном дисбалансе при сочетанных расстройствах.

Литература

(п.п. 1-7; 11 см. References)

8. Невидимова Т.И., Давыдова Т.В., Ветрилэ Л.А., Савочкина Д.Н., Захарова И.А., Галкин С.А. Нейроиммунная характеристика коморбидности депрессии и алкоголизма. *Медицинский академический журнал*. 2019 (спецвыпуск): 94-6.

9. Ветрилэ Л.А., Невидимова Т.И., Давыдова Т.В., Захарова И.А., Савочкина Д.Н., Галкин С.А. и др. Аутоантитела к нейромедиаторам дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК при коморбидном течении депрессии и алкогольной зависимости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(4): 5-12. DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.5-12
10. Невидимова Т.И., Давыдова Т.В., Савочкина Д.Н., Мастерова Е.И., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А. и др. Анализ сопряженности иммунорегуляторных, нейромедиаторных и вегетативных параметров при формировании зависимости от психоактивных веществ. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(2): 4-10.

References

1. Rudzki L., Szulc A. "Immune Gate" of Psychopathology - The Role of Gut Derived Immune Activation in Major Psychiatric Disorders. *Front Psychiatry*. 2018 May 29; 9: 205. doi: 10.3389/fpsy.2018.00205. eCollection 2018.
2. Neupane S.P. Neuroimmune Interface in the Comorbidity between Alcohol Use Disorder and Major Depression. *Front Immunol*. 2016 Dec 27; 7: 655. doi: 10.3389/fimmu.2016.00655. eCollection 2016. Review
3. Toft H., Neupane S.P., Bramness J.G., Tilden T., Wampold B.E., Lien L. The effect of trauma and alcohol on the relationship between level of cytokines and depression among patients entering psychiatric treatment. *BMC Psychiatry*. 2018 Apr 10; 18(1): 95. doi: 10.1186/s12888-018-1677-z.
4. Himmerich H., Patsalos O., Lichtblau N., Ibrahim M.A.A., Dalton B. Cytokine Research in Depression: Principles, Challenges, and Open Questions. *Front Psychiatry*. 2019 Feb 7; 10: 30. doi: 10.3389/fpsy.2019.00030. eCollection 2019.
5. Erickson E.K., Grantham E.K., Warden A.S., Harris R.A. Neuroimmune signaling in alcohol use disorder. *Pharmacol Biochem Behav*. 2019 Feb; 177: 34-60. doi: 10.1016/j.pbb.2018.12.007
6. Heberlein A., Schuster R. Joint Effects of the Epigenetic Alteration of Neurotrophins and Cytokine Signaling: A Possible Exploratory Model of Affective Symptoms in Alcohol-Dependent Patients? *Alcohol Alcohol* 2017 May 1; 52(3): 277-81. doi: 10.1093/alcalc/agw100
7. Jacobson L.H., Vlachou S., Slattery D.A., Li X., Cryan J.F. The Gamma-Aminobutyric Acid B Receptor in Depression and Reward. *Biol Psychiatry*. 2018 Jun 1; 83(11): 963-76. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.02.006
8. Nevidimova T.I., Davydova T.V., Vetrile L.A., Savochkina D.N., Zakharova I.A. et al. Neuroimmune pattern in the comorbidity between depression and alcohol use disorder. *Meditinskiy akademicheskiy zhurnal*. 2019 (special issue): 94-6. (in Russian)
9. Vetrile L.A., Nevidimova T.I., Davydova T.V., Zakharova I.A., Savochkina D.N., Galkin S.A. et al. Autoantibodies to neurotransmitters dopamine, norepinephrine, serotonin, glutamate and GABA in the comorbid course of depression and alcohol dependence. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(4): 5-12. doi: 10.25557/0031-2991.2019.04.5-12. (in Russian)
10. Nevidimova T.I., Davydova T.V., Savochkina D.N., Vetrile L.A., Zakharova I.A. et al. Analysis of the relationship of immunoregulatory, neurotransmitter and autonomic nervous system parameters and in the formation of dependence on psychoactive substances. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(2): 4-10. (in Russian)
11. Crews F.T., Lawrimore C.J., Walter T.J., Coleman L.G. The Role of Neuroimmune Signaling in Alcoholism. *Neuropharmacology*. 2017; 122: 56-73. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.01.031.

Сведения об авторах:

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

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

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

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

Савочкина Дарья Николаевна, науч. сотр., лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, «НИИ психического здоровья» ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»;

Галкин Станислав Алексеевич, аспирант, «НИИ психического здоровья» ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»;

Бохан Николай Александрович, акад. РАН, проф., доктор мед. наук, директор, «НИИ психического здоровья» ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН».

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Галкин С.А.¹, Пешковская А.Г.¹, Кисель Н.И.¹, Рощина О.В.¹, Мандель А.И.¹, Иванова С.А.^{1,2}, Бохан Н.А.^{1,2}

Нарушения пространственной рабочей памяти и ее нейрофизиологические корреляты при алкогольной зависимости

¹Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,

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

²Сибирский государственный медицинский университет,

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

Введение. У пациентов с алкогольной зависимостью наблюдаются нарушения в широком диапазоне когнитивных функций. Это приводит к неспособности контролировать употребление алкоголя, рецидивированию или постоянному употреблению алкоголя, несмотря на негативные физические, психологические и социальные последствия. Исполнительный контроль относится к группе когнитивных функций, который позволяют людям самостоятельно регулировать свое поведение и выбирать соответствующие действия в зависимости от долгосрочных целей. При этом рабочая память является одной из главных составляющих исполнительного контроля.

Цель исследования – изучение пространственной рабочей памяти у пациентов с синдромом алкогольной зависимости с использованием метода количественной ЭЭГ и компьютерного теста Corsi.

Методика. Обследовано 50 пациентов с диагнозом алкогольной зависимости (F10.2 по МКБ-10) после детоксикации. Группу контроля составили 30 психически и соматически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту. Исследование пространственной рабочей памяти осуществляли с помощью компьютерного теста Корси (Corsi Block-Tapping). Регистрировали 16-канальную ЭЭГ: фон с открытыми глазами и во время выполнения теста Corsi. Анализировали абсолютные значения спектральной мощности θ -, α - и β -ритмов.

Результаты. Согласно результатам теста Corsi, при алкогольной зависимости наблюдается выраженное снижение объема рабочей памяти относительно здоровой группы контроля. Изменения ЭЭГ в процессе выполнения теста Corsi у пациентов с синдромом алкогольной зависимости сопровождалась десинхронизацией альфа-ритма в префронтальной коре мозга и левом височном локусе, что не выявлялось у обследуемых здоровой группы контроля. Было обнаружено снижение бета-ритма в центральной и теменной коре у пациентов с синдромом алкогольной зависимости в ответ на когнитивный стимул. У пациентов с синдромом алкогольной зависимости существенно повышалась тета-мощность в затылочной коре в ответ на когнитивный стимул, а также регистрировалась статистически значимо большая тета-активность в правом височном локусе.

Заключение. Полученные результаты могут служить дополнительными диагностическими критериями когнитивных нарушений у пациентов с синдромом зависимости от алкоголя.

Ключевые слова: алкогольная зависимость; рабочая память; тест Корси; электроэнцефалография.

Для цитирования: Галкин С.А., Пешковская А.Г., Кисель Н.И., Рощина О.В., Мандель А.И., Иванова С.А., Бохан Н.А. Нарушения пространственной рабочей памяти и ее нейрофизиологические корреляты при алкогольной зависимости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 12-19.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.12-19

Для корреспонденции: Галкин Станислав Алексеевич, e-mail: s01091994@yandex.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Галкин С.А., Пешковская А.Г.; сбор и обработка материала – Галкин С.А., Кисель Н.И., Рощина О.В.; статистическая обработка – Галкин С.А.; написание текста – Галкин С.А., Пешковская А.Г.; редактирование – Мандель А.И., Иванова С.А., Бохан Н.А.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Администрации Томской области и гранта РФФИ 19-413-703007.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.02.2020

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Galkin S.A.¹, Peshkovskaya A.G.¹, Kisel N.I.¹, Roshchina O.V.¹, Mandel A.I.¹, Ivanova S.A.^{1,2}, Bokhan N.A.^{1,2}**Disturbance of spatial working memory and its neurophysiological correlates in alcohol dependence**¹Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Aleutskaya Str. 4, Tomsk 634014, Russian Federation;²Siberian State Medical University, Moskovsky Trakt Str. 2, Tomsk 634050, Russian Federation

Patients with alcohol dependence have disorders of multiple cognitive functions. This leads to inability to control alcohol consumption, relapse or continued use of alcohol despite negative physical, psychological, and social consequences. Executive control refers to a group of cognitive functions that allow people to regulate independently their behavior and to choose appropriate actions depending on their long-term goals. Working memory (WM) is one of the main components of the executive control. **The aim of the study** was to evaluate indexes of spatial working memory in patients with alcohol dependence syndrome using the quantitative EEG method and the Corsi computer test.

Methods. 50 patients diagnosed with alcohol dependence (F10.2 on MKB-10) were evaluated after detoxification. The control group consisted of 30 mentally and somatically healthy, age-matched subjects. The study of spatial working memory was performed by a Corsi computer test (Corsi Block-Tapping). 16-channel EEGs were recorded at background with open eyes and during the Corsi test. Spectral power absolute values of θ – , α – and β – rhythms were analyzed.

Results. According to the Corsi test in alcohol dependence, the WM volume was markedly decreased compared to the healthy control group. Changes in EEG during the Corsi test in patients with alcohol dependence syndrome were associated with alpha-rhythm desynchronization in the prefrontal cortex and left temporal locus, which was not observed in the healthy control group. Decreased beta rhythm was observed in the central and parietal cortex of patients with alcohol dependence syndrome in response to a cognitive stimulus. In patients with alcohol dependence syndrome, theta power was significantly increased in the occipital cortex in response to a cognitive stimulus, and theta activity was significantly greater in the right temporal locus.

Conclusion. The results of this study may serve as additional diagnostic criteria for cognitive disorders in patients with alcohol dependence syndrome.

Keywords: alcohol dependence; working memory; Corsi test; electroencephalography.

For citation: Galkin S.A., Peshkovskaya A.G., Kisel N.I., Roshchina O.V., Mandel A.I., Ivanova S.A., Bokhan N.A. Disturbance of spatial working memory and its neurophysiological correlates in alcohol dependence. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 12–19. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.12-19

For correspondence: Galkin S.A., e-mail: s01091994@yandex.ru

Acknowledgment. The study was supported by the Administration of the Tomsk Region and the Russian Foundation for Basic Research grant #19-413-703007.

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

Information about the authors:Galkin S.A., <https://orcid.org/0000-0002-7709-3917>Peshkovskaya A.G., <https://orcid.org/0000-0002-3951-395X>Kisel N.I., <https://orcid.org/0000-0002-5607-7491>Roshchina O.V., <https://orcid.org/0000-0002-2246-7045>Mandel A.I., <https://orcid.org/0000-0002-6020-6604>Ivanova S.A., <https://orcid.org/0000-0001-7078-323X>Bokhan N.A., <https://orcid.org/0000-0002-1052-855X>

Received 11.02.2020

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Хроническое употребление алкоголя оказывает комплексное воздействие на головной мозг человека, проявляющееся в виде нарушений высших психических функций [1, 2]. Как показывают многочисленные исследования, люди с алкогольной зависимостью нередко выбирают действия, которые явно нецелесообразны [2]. Неспособность контролировать употребление алкоголя, повторное рецидивирование и по-

стоянное употребление алкоголя, несмотря на негативные физические, психологические и социальные последствия, являются не только диагностическими критериями расстройства, но также могут свидетельствовать о нарушенной способности делать рациональный выбор. Это отчасти объясняется тем фактом, что у пациентов с алкогольной зависимостью наблюдаются нарушения в широком диапазоне когнитивных

функций [3]. Существует предположение, что новая стратегия в лечении расстройств, связанных с употреблением психоактивных веществ, может заключаться в сокращении употребления психоактивных веществ путем улучшения когнитивной дисфункции посредством фармакологического или поведенческого вмешательства [4].

Исполнительный контроль относится к группе когнитивных функций, который позволяет людям самостоятельно регулировать свое поведение и выбирать соответствующие действия в зависимости от их долгосрочных целей [5, 6]. Рабочая память (РП), определяемая как способность сохранять и управлять информацией в течение короткого периода времени, является критической оценкой исполнительного контроля, она необходима для саморегуляции психических функций высшего порядка и принятия решений [6]. Существует несколько различных теоретических моделей РП, но одна из наиболее значимых моделей предполагает, что РП включает центральный исполнительный орган и 2 системы: словесную/непространственную (например, повторение числовой последовательности, читаемой вслух) и визуально-пространственную (например, запоминание последовательности предметов) [7].

Рядом исследований показано, что у пациентов с синдромом алкогольной зависимости присутствует нарушение когнитивного функционирования, включая такие психические функции, как ингибирование, РП и когнитивная гибкость [8, 9]. Нарушения исполнительных функций при алкогольной зависимости проявляются в виде усиления импульсивного поведения (склонность к ненадлежащему поведению без учета будущих последствий) [10]. Более низкая базовая емкость РП предсказывает употребление алкоголя у подростков [11].

Для оценки пространственной РП многие исследователи используют тест Корси (Corsi Block-Tapping Test), который показал высокую чувствительность и специфичность при выявлении дефектов РП [12].

Исследования нейровизуализации показали, что префронтальная и теменная кора участвуют в обеспечении пространственной рабочей памяти. В частности, дорсолатеральная префронтальная кора участвует в манипулировании пространственной информацией, а теменная кора – в ее хранении [14]. Повышенная активность в дорсолатеральной префронтальной коре, задней теменной коре и мозжечке наблюдается у здоровой группы контроля при выполнении задач на пространственную РП [13, 14]. Поскольку хроническое употребление алкоголя связано с дисфункцией как

префронтальной, так и теменной коры, во многих исследованиях изучался дефицит пространственной РП у пациентов с алкогольной зависимостью [13, 15].

Хотя исследования нейровизуализации определили области мозга, вовлеченные в пространственную рабочую память, эти данные предоставляют ограниченную информацию о последовательности этапов формирования пространственной рабочей памяти. Электроэнцефалография (ЭЭГ) – метод оценки биоэлектрической активности, вызванной синхронизированными по времени стимулами, широко используется для оценки когнитивных функций, включая рабочую память, из-за высокого временного разрешения ЭЭГ. Однако, исследования, в которых бы использовался тест Corsi и изучались параметры ЭЭГ особенно в отношении пациентов с алкогольной зависимостью, ограничены.

Цель исследования – изучение пространственной рабочей памяти у пациентов с синдромом алкогольной зависимости с использованием метода количественной ЭЭГ и компьютерного теста Corsi.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена этическим комитетом университета. Исследование проводилось на базе отделения аддиктивных расстройств клиники НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Было обследовано 50 пациентов (18 женщин и 32 мужчины) с диагнозом: психические расстройства и расстройства поведения, связанные с употреблением психоактивных веществ, синдром алкогольной зависимости (F10.2 по МКБ-10) после снятия интоксикации. Критерии включения: верифицированный диагноз аддиктивного расстройства по МКБ-10, информированное согласие пациента на участие в исследовании, возраст 18–50 лет. Критерии исключения: наличие выраженных органических нарушений головного мозга, умственная отсталость, эпилепсия, беременность. В качестве группы контроля было обследовано 30 психически и соматически здоровых лиц (20 женщин и 10 мужчин), сопоставимых по возрасту.

Исследование рабочей памяти. Исследование пространственной рабочей памяти осуществлялось с помощью компьютерного теста Корси (Corsi Block-Tapping). Приводим пример задания. На экране компьютера появляются 9 кубиков, которые по очереди загораются желтым цветом. Каждому участнику исследования необходимо запомнить и воспроизвести эту последовательность. Тест начинается с последователь-

ности из двух кубиков, при правильном ответе длина последовательности увеличивается. Проба прекращается в случае двух подряд ошибочных воспроизведений последовательности.

Регистрация ЭЭГ. Регистрация и анализ биоэлектрической активности головного мозга осуществлялась при помощи 16 канального энцефалографа «Неврополиграф» по международной системе «10-20», монополярно от фронтальных (Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8), центральных (C3, C4), теменных (P3, P4), затылочных (O1, O2) и височных (T3, T4, T5, T6) отведений (**рис. 1**). В качестве референта использовались объединенные электроды, расположенные на мочках ушей, заземляющий электрод – в отведении Fpz. Сопротивление электродов не превышало 10 кОм. Частоты среза фильтров верхних и нижних частот составляли 1,5 и 30 Гц, частота квантования 250 Гц.

Вначале проводилась 2-минутная проба с открытыми глазами (фон), после чего участник исследования выполнял тест Corsi одновременно с регистрацией ЭЭГ. На полученных ЭЭГ-записях удалялись артефактные фрагменты путем обнуления независимых компонент ЭЭГ (ICA) [16]. Дополнительно с помощью автоматической процедуры из дальнейшего анализа исключались эпохи, в которых наблюдались чрезмерно большие потенциалы (более 100 мкВ). Сигналы обрабатывались с помощью быстрого преобразования Фурье, анализировались значения абсолютной спектральной мощности (мкВ²) θ – (4–7 Гц), α – (8–13 Гц) и β – (14–30 Гц) ритмов. Длительность анализируемых участков равнялась продолжительности всей пробы.

Статистический анализ. Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программы Statistica 10.0. Проверка согласия с нормальным законом распределения проводилась с помощью критерия Шапиро – Уилка. Полученные данные не подчинялись нормальному закону распределения. Использовался непараметрический W-критерий Вилкоксона для оценки различий между двумя зависимыми выборками (фон vs. тест) и U-критерий Манна–Уитни для оценки различий между двумя независимыми выборками (контроль vs. пациенты). Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования

При анализе массива данных были получены статистически значимые различия по уровню когнитивного функционирования и электроэнцефалографическим показателям.

Результаты теста Corsi в исследуемых группах. Результаты теста Corsi в группе контроля и группе пациентов с синдромом алкогольной зависимости представ-

лены в **табл. 1**. Показано статистически значимое снижение максимального количества правильно воспроизведенной последовательности (объем РП) у пациентов с синдромом алкогольной зависимости по сравнению с контролем.

Результаты нейрофизиологического исследования. Анализ фоновой активности коры головного мозга при открытых глазах не выявил статистически значимых различий между пациентами с алкогольной зависимостью и группой контроля во всех частотных диапазонах ЭЭГ ($p > 0,05$).

Альфа-ритм

При статистическом анализе спектральной мощности альфа-ритма было выявлено статистически значимое снижение альфа-мощности в центральной ($p = 0,012$) и теменной ($p = 0,04$) зонах коры в группе контроля при выполнении теста Corsi. В группе пациентов с синдромом алкогольной зависимости в ответ на когнитивную нагрузку обнаружено статистически значимое снижение альфа-мощности во фронтальной ($p = 0,002$), центральной ($p = 0,0001$), теменной ($p = 0,0002$) и левой височной ($p = 0,002$) зонах коры головного мозга (**рис. 2**).

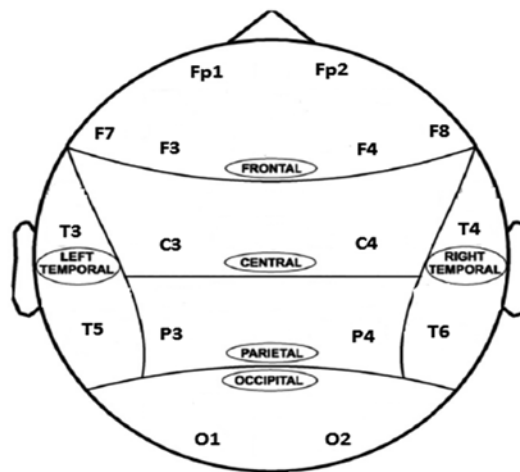


Рис. 1. Схема ЭЭГ-отведений.

Таблица 1

Результаты теста Corsi в исследуемых группах

Показатель	Контроль	Пациенты	<i>p</i>
Максимальное количество правильно воспроизведенной последовательности	6 [5; 7]	4 [2; 5]	0,006

Примечание. Median [Q1; Q3]. *p* – уровень статистической значимости при сравнении групп с использованием U-критерия Манна–Уитни.

Бета-ритм

В ответ на когнитивный стимул в группе контроля обнаружено статистически значимое повышение бета-мощности во всех регионах коры головного мозга ($p < 0,05$). В группе пациентов с синдромом алкогольной зависимости выявлено статистически значимое снижение бета-ритма в центральной ($p = 0,004$) и теменной ($p = 0,007$) зонах коры, а также увеличение бета-мощности в левом ($p = 0,001$) и правом ($p = 0,002$) височном и затылочном ($p = 0,0001$) регионах коры больших полушарий. При межгрупповом сравнении ЭЭГ-мощности бета-ритма обнаружено, что у пациентов с синдромом алкогольной зависимости в ответ на когнитивный стимул наблюдаются статистически значимо более низкие значения мощности в центральных ($p = 0,007$), теменных ($p = 0,004$), левых ($p = 0,004$) и правых ($p = 0,02$) височных, затылочных ($p = 0,031$) участках коры головного мозга (рис. 3).

Тета-ритм

При статистическом анализе спектральной мощности тета-ритма выявлено статистически значимое

увеличение тета-мощности во фронтальной коре в группе контроля ($p = 0,0014$) при выполнении теста Corsi. У пациентов с синдромом алкогольной зависимости в ответ на когнитивный стимул выявлено статистически значимое увеличение тета-ритма в фронтальной ($p = 0,0006$) и затылочной ($p = 0,046$) коре мозга. При межгрупповом сравнении спектральной мощности тета-ритма в ответ на когнитивный стимул обнаружены статистически значимо более высокие значения тета-активности в правой височной коре ($p = 0,03$) у пациентов с синдромом алкогольной зависимости (рис. 4).

Обсуждение

В исследовании была проведена оценка уровня пространственной РП и ее электрофизиологических характеристик у пациентов с синдромом алкогольной зависимости. Согласно результатам теста Corsi, при алкогольной зависимости наблюдается выраженное снижение объема РП относительно здоровой группы контроля. Медиана максимального количества правильно воспроизведенной последовательности у пациентов с синдромом алкогольной зависимости составила 4, что ниже грани-

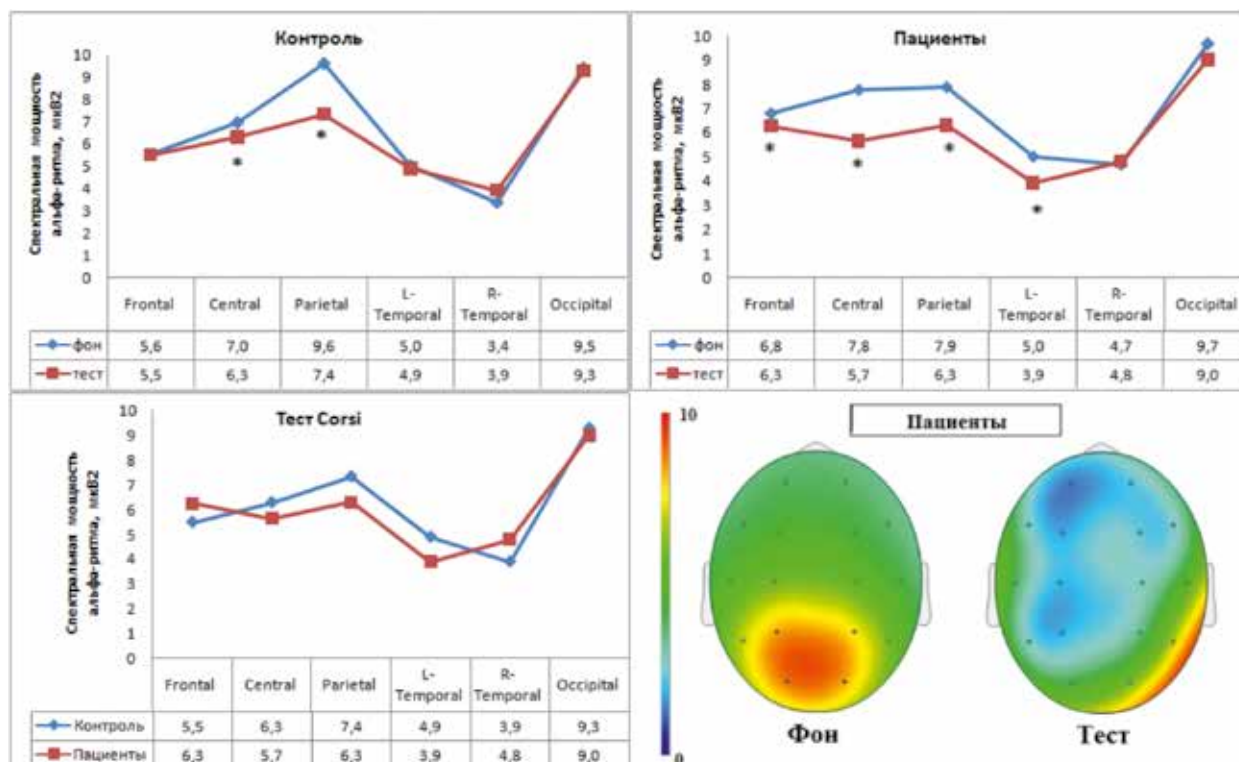


Рис. 2. Графики спектральной мощности альфа-ритма.

Median. * – уровень статистической значимости при $p < 0,05$.

цы нормы – 5–8. Данные изменения проявляются в виде затруднения фиксации внимания и удержания в памяти последовательности предъявляемых при тестировании предметов и явлений. Эти результаты согласуются с предыдущими исследованиями, указывающими на связь между хроническим употреблением алкоголя и нарушением исполнительных функций [4, 9].

Изменения ЭЭГ в процессе выполнения теста Corsi у пациентов с синдромом алкогольной зависимости сопровождались десинхронизацией альфа-ритма в префронтальной коре мозга и левом височном локусе, что не обнаружено у здоровой группы контроля. Как известно альфа-ритм связан с селективной обработкой поступающей информации [17]. Префронтальная кора является одной из главных ассоциативных зон головного мозга (центр воли и инициативы), с учетом сенсорных сигналов, сигналов от центров потребностей, памяти и мышления участвует в принятии решения о запуске поведенческих программ [18]. Таким образом, статистически значимое снижение альфа-мощности в этом локусе у пациентов с синдромом алкогольной зависимости может отражать дефицит исполнительного контроля. С дру-

гой стороны, снижение альфа активности (десинхронизация) отражает процесс активации коры, однако в группе пациентов с алкогольной зависимостью в ответ на выполнение когнитивной задачи происходит активация больших отделов головного мозга по сравнению с контролем, что может указывать на повышенную потребность мозговых ресурсов для выполнения задания.

Кроме того, обнаружено атипичное снижение бета-ритма в центральной и теменной коре у пациентов с синдромом алкогольной зависимости в ответ на когнитивный стимул. Подобное снижение бета-мощности может указывать на выраженное нарушение обработки сигналов от разных сенсорных систем и центров мышления. Это подтверждается более низкими значениями вызванной бета-мощности по всей конвексимальной поверхности головного мозга у пациентов с синдромом алкогольной зависимости относительно здоровой группы контроля и согласуется с результатами выполняемого теста. Считается, что увеличение тета-активности отражает процессы рабочей памяти. Например, в нескольких нейрофизиологических исследованиях показано, что повышение фронтального

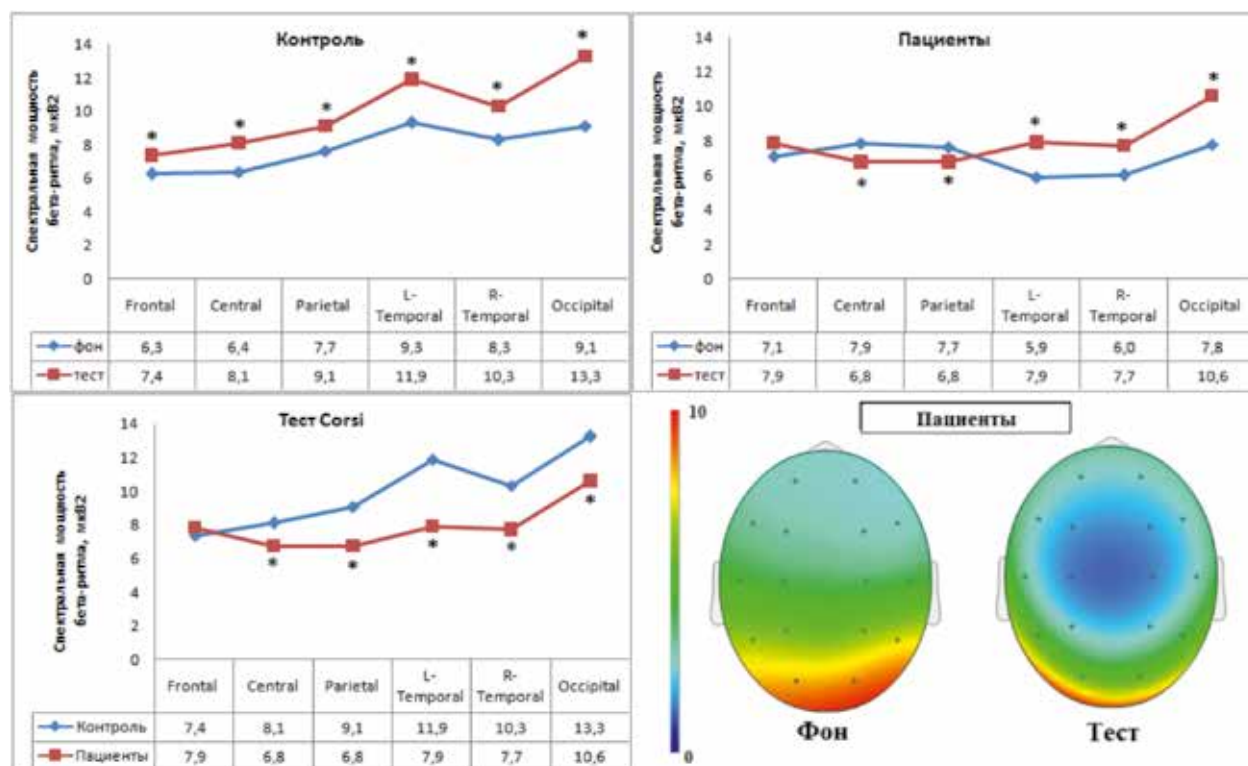


Рис. 3. Графики спектральной мощности бета-ритма. Median. * – уровень статистической значимости при $p < 0,05$.

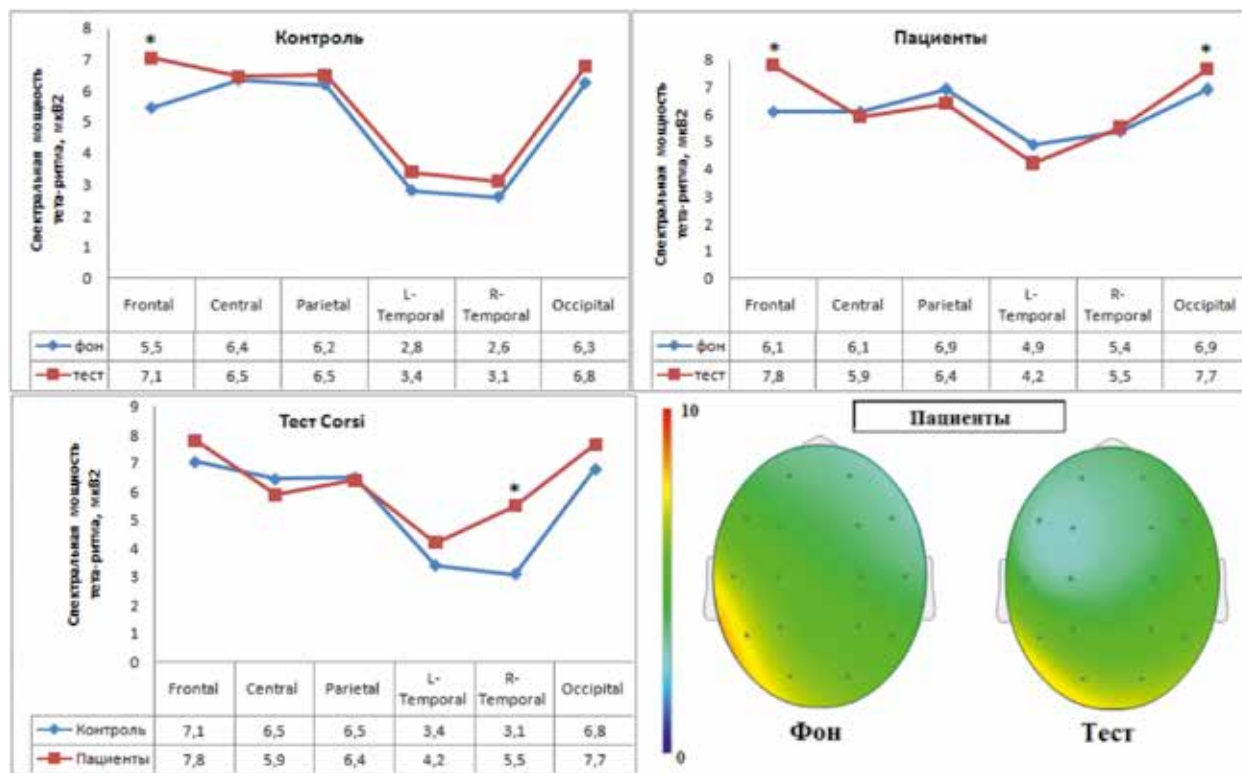


Рис. 4. Графики спектральной мощности тета-ритма. Median. * – уровень статистической значимости при $p < 0,05$.

тета-ритма коррелировало с нагрузкой на рабочую память и потребностями внимания [19]. Однако у пациентов с синдромом алкогольной зависимости существенно повышалась тета-мощность в затылочной коре в ответ на когнитивный стимул, а также была обнаружена статистически значимо большая тета-активность в правом височном локусе. Выявленные изменения у пациентов с синдромом алкогольной зависимости указывают на активацию дополнительных регионов головного мозга, что требует больших затрат ресурсов внимания и мышления. У здоровых лиц эти регионы обычно существенно не участвуют в когнитивной обработке данных (РП).

Заключение

Полученные результаты дополняют известные данные о нарушении исполнительного контроля у пациентов с синдромом зависимости от алкоголя. В параметрах ЭЭГ находят отражение изменения когнитивной функции, что проявляется различиями в спектральных характеристиках ЭЭГ-ритмов у пациентов с алкогольной зависимостью и здоровых лиц.

Полученные результаты могут служить дополнительными диагностическими критериями когнитивных нарушений у пациентов с синдромом зависимости от алкоголя.

Литература

(п.п. 4; 6-8; 11; 12; 14; 18; 19 см. References)

- Невидимова Т.И., Савочкина Д.Н., Мастерова Е.И., Бохан Н.А. Итоги и перспективы взаимодействия сенсорных и иммунной систем при аддитивных расстройствах. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2018; (2): 56-63.
- Бохан Н.А., Мандель А.И., Иванова С.А., Прокопьева В.Д., Артемьев И.А., Невидимова Т.И. и др. Старые и новые проблемы наркологии в контексте междисциплинарных исследований. *Вопросы наркологии*. 2017; (1): 26-62.
- Максимова И.В. Когнитивные и электроэнцефалографические изменения у пациентов с алкогольной зависимостью, перенесших судорожный припадок. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2018; (2): 89-92.
- Величковский Б.Б. Возможности когнитивной тренировки как метода коррекции возрастных нарушений когнитивного контроля. *Экспериментальная психология*. 2009; (3) 78-91.
- Пешковская А.Г., Галкин С.А. Когнитивный контроль при алкогольной зависимости и его нейрокорреляты. *Вопросы наркологии*. 2018; (12): 65-80.

10. Сомкина О.Ю. Алкогольная зависимость у женщин и аутоагрессивное поведение. *Здравоохранение Югры: опыт и инновации*. 2018; (3): 47-52.
13. Тарумов Д.А., Ятманов А.Н., Мананцев П.А. Нейровизуализационные аспекты некоторых психических нарушений. *Вестник новых медицинских технологий*. 2017; (4): 56-65.
15. Востриков В.В., Зеленцов К.Е., Майорова О.В., Востриков М.В., Павленко В.П., Шабанов П.Д. Методы диагностики алкогольной зависимости. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2008; (4): 26-50.
16. Монахова Ю.Б., Цикин А.М., Муштакова С.П. Метод независимых компонент как альтернатива методу главных компонент и дискриминантным алгоритмам в обработке спектрометрических данных. *Журнал аналитической химии*. 2015; (9): 925-32.
17. Данилова Н.Н. Активность мозга и ее изучение в психофизиологической школе Е.Н. Соколова. *Вестник Московского университета*. 2010; (4): 79-109.
7. Hills T., Todd P., Goldstone R. The central executive as a search process: priming exploration and exploitation across domains. *J. Exp. Psychol. Gen.* 2010; (4): 590-609. doi: 10.1037/a0020666
8. Bernardin F., Maheut-Bosser A., Paille F. Cognitive impairments in alcohol-dependent subjects. *Front. Psychiatry*. 2014; (5). doi: 10.3389/fpsy.2014.00078
9. Peshkovskaya A.G., Galkin S.A. Cognitive control in alcohol dependence and its neurocorrelates. *Voprosy narkologii*. 2018; (12): 65-80. (In Russian)
10. Somkina O.Yu. Alcohol dependence in women and autoaggressive behavior. *Zdravookhranenie Jugry: opyt i innovatsii*. 2018; (3): 47-52. (In Russian)
11. Squeglia L., Jacobus J., Nguyen-Louie T., Tapert S. Inhibition during early adolescence predicts alcohol and marijuana use by late adolescence. *Neuropsychology*. 2014; (5): 782-90. doi: 10.1037/neu0000083
12. Brunetti R., Del Gatto C., Delogu F. eCorsi: implementation and testing of the Corsi block-tapping task for digital tablets. *Front. Psychol.* 2014; (5). doi: 10.3389/fpsyg.2014.00939
13. Tarumov D.A., Yatmanov A.N., Manantsev P.A. Neuroimaging aspects of some mental disorders. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2017; (4): 56-65. (In Russian)
14. Cannon T., Glahn D., Kim J., Van T., Karlsgodt K., Cohen M. et al. Dorsolateral prefrontal cortex activity during maintenance and manipulation of information in working memory in patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*. 2005; (10): 1071-80. doi: 10.1001/archpsyc.62.10.1071
15. Vostrikov V.V., Zelentsov K.E., Mayorova O.V., Vostrikov M.V., Pavlenko V.P., Shabanov P.D. Methods for diagnosing alcohol dependence. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2008; (4): 26-50. (In Russian)
16. Monakhova Yu.B., Tsikin A.M., Mushtakova S.P. the independent component Method as an alternative to the principal component method and discriminant algorithms in processing spectrometric data. *Zhurnal analiticheskoy khimii*. 2015; (9): 925-32. (In Russian)
17. Danilova N.N. brain Activity and its study in the psychophysiological school of E.N. Sokolov. *Vestnik Moskovskogo universiteta*. 2010; (4): 79-109. (In Russian)
18. Kennerley S., Walton M. Decision making and reward in frontal cortex. *Behav. Neurosci.* 2011; (3): 297-317. doi: 10.1037/a0023575
19. Alekseichuk I., Pabel S., Antal A., Paulus W. Intrahemispheric theta rhythm desynchronization impairs working memory. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2017; (2): 147-57. doi: 10.3233/RNN-160714.

References

1. Nevidimova T.I., Savochkina D.N., Masterova E.I., Bokhan N.A. Results and prospects of interaction of sensory and immune systems in addictive disorders. *Sibirskiy vestnik psikiatrii i narkologii*. 2018; (2): 56-63. (In Russian)
2. Bokhan N.A., Mandel A.I., Ivanova S.A., Prokopenko V.D., Artemev I.A., Nevidimova T.I. et al. Old and new problems of narcology in the context of interdisciplinary research. *Voprosy narkologii*. 2017; (1): 26-62. (In Russian)
3. Maximova I.V. Cognitive and electroencephalographic changes in patients with alcohol dependence who suffered a seizure. *Sibirskiy vestnik psikiatrii i narkologii*. 2018; (2): 89-92. (In Russian)
4. Sofuoglu M., DeVito E., Waters A., Carroll K. Cognitive enhancement as a treatment for drug addictions. *Neuropharmacology*. 2013; (1): 452-63. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.021
5. Velichkovsky B.B. Possibilities of cognitive training as a method of correction of age-related disorders of cognitive control. *Ekspериментal'naya psikhologiya*. 2009; (3) 78-91. (In Russian)
6. Buckley J., Cohen J., Kramer A., McAuley E., Mullen S. Cognitive control in the self-regulation of physical activity and sedentary behavior. *Front. Hum. Neurosci.* 2014; (8). doi: 10.3389/fnhum.2014.00747

Сведения об авторах:

Галкин Станислав Алексеевич, аспирант, «НИИ психического здоровья», Томский НИМЦ;
Пешковская Анастасия Григорьевна, мл. науч. сотр., «НИИ психического здоровья», Томский НИМЦ;
Кисель Наталья Игоревна, канд. мед. наук, «НИИ психического здоровья», Томский НИМЦ;
Рощина Ольга Вячеславовна, мл. науч. сотр., «НИИ психического здоровья», Томский НИМЦ;
Мандель Анна Исаевна, доктор мед. наук, проф., «НИИ психического здоровья», Томский НИМЦ;
Иванова Светлана Александровна, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. молекулярной генетики и биохимии, зам. директора по научной работе, «НИИ психического здоровья», Томский НИМЦ;
Бохан Николай Александрович, акад. РАН, доктор мед. наук, проф., Заслуженный деятель науки РФ, директор «НИИ психического здоровья», зав. каф. психиатрии, психотерапии, наркологии с курсом мед. психологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Маркелова Е.В.¹, Зенина А.А.^{1,2}, Шуматов В.Б.¹, Силаев А.А.²

Роль нейропептидов в развитии послеоперационной когнитивной дисфункции у пациентов с ишемической болезнью сердца после аортокоронарного шунтирования

¹ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 690002, г. Владивосток, Россия, пр. Острякова, д. 4;

²ФГБОУ ВО «Дальневосточный Федеральный университет» 690922, г. Владивосток, Россия, о. Русский, п. Аякс 10, корпус 25

В настоящее время активно ведется поиск чувствительных методов диагностики повреждения мозга. Среди биохимических маркеров активно исследуется содержание нейроспецифических белков в различных биологических жидкостях.

Цель исследования – анализ уровня нейропептидов у пациентов с ишемической болезнью сердца с послеоперационной когнитивной дисфункцией после аортокоронарного шунтирования.

Методика. Исследованы показатели уровня белка S100 ($S100\beta$), нейронспецифической енолазы (NSE), основного белка миелина (MBR), мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и фактора роста нервов (NGF) в сыворотке крови 40 пациентов от 52 до 75 лет после аортокоронарного шунтирования (АКШ). Для выявления когнитивных нарушений использована Монреальская шкала когнитивного обследования (MoCa-тест) до операции и на 7-е сут после операции. В I-ю группу вошли 23 пациента с снижением показателей MoCa-теста после АКШ (менее 3 баллов), 2-ю – 17 пациентов со снижением более 3 баллов. Уровень нейропептидов определяли методом ИФА в сыворотке крови до операции, непосредственно после операции, а также через 24 ч и на 7-е сут после операции.

Результаты. Показано более выраженное повышение уровня $S100\beta$ и NSE во все периоды мониторинга после операции у пациентов 2-й группы, что обусловлено активацией провоспалительной реакции, поддержанием нейровоспаления с существенным повреждением нейронов при послеоперационной когнитивной дисфункции. Содержание NGF после операции во 2-й группе постепенно повышалось и достигло максимума на 7-е сут после операции, что может свидетельствовать о реализации компенсаторных процессов в ответ на действие повреждающих факторов. Выявлено более высокое содержание BDNF у пациентов 1-й группы до и после операции, что позволяет говорить о нейропротекторных свойствах этого белка. Более высокая концентрация MBR у пациентов 2-й группы на всех этапах исследования может свидетельствовать о более выраженном повреждении олигодендроцитов по сравнению с пациентами 1-й группы.

Заключение. Повреждение центральной нервной системы у пациентов с послеоперационной когнитивной дисфункцией обусловлено избыточной активацией провоспалительной реакции и более длительным поддержанием нейровоспаления, выраженным повреждением нейронов, олигодендроцитов, а также недостаточностью BDNF, что приводит к снижению нейропластичности нейронов. Значительное повышение уровня основного белка миелина и дефицит мозгового нейротрофического фактора до операции у пациентов с послеоперационной когнитивной дисфункцией требует дальнейшего изучения с целью использования этих показателей перед операцией АКШ в качестве предикторов и маркеров развития послеоперационной когнитивной дисфункции.

Ключевые слова: послеоперационная когнитивная дисфункция; нейропептиды; аортокоронарное шунтирование.

Для цитирования: Маркелова Е.В., Зенина А.А., Шуматов В.Б., Силаев А.А. Роль нейропептидов в развитии послеоперационной когнитивной дисфункции у пациентов с ишемической болезнью сердца после аортокоронарного шунтирования. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3):20-28.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.20-28

Для корреспонденции: Зенина Александра Александровна, e-mail: zenina.aa@dvfu.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Маркелова Е.В., Зенина А.А.; сбор и обработка материала – Зенина А.А., Силаев А.А.; статистическая обработка – Зенина А.А., Шуматов В.Б.; написание текста – Зенина А.А.; редактирование – Маркелова Е.В., Шуматов В.Б. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.08.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Markelova E.V.¹, Zenina A.A.^{1,2}, Shumatov V.B.¹, Silaev A.A.²

The role of neuropeptides in the development of postoperative cognitive dysfunction in patients with coronary heart disease after coronary artery bypass grafting

¹Pacific State Medical University,

Prospekt Ostryakova 4, Vladivostok 690002, Russia;

²Far-Eastern Federal University, Ayaks 10, Bld. 25, Russian Island, Vladivostok 25, 690922, Russia

Currently, a search is underway for sensitive methods for diagnosing brain damage. Among biochemical markers, concentrations of neurospecific proteins in various biological fluids is being actively studied.

The **aim** of this study was to analyze concentrations of neuropeptides in patients with coronary heart disease (CHD) who developed postoperative cognitive dysfunction after coronary artery bypass grafting (CABG).

Methods. Serum concentrations of protein S100 (S100 β), neuron-specific enolase (NSE), basic myelin protein (MBP), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in blood serum were studied in 40 patients aged 52 to 75 years after CABG. To identify cognitive impairment, the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) scale was used before the surgery and on postoperative day 7. The first group included 23 patients with a decrease in MoCA scale scores after CABG by less than 3; the second group included 17 patients with decreased scores by more than 3. Serum concentrations of neuropeptides were measured by ELISA before and after surgery, and at 24 h and 7 days after surgery.

Results. During the entire period of monitoring, patients of group 2 had more pronounced increases in S100 β and NSE, which was due to activation of the pro-inflammatory response, prolonged neuroinflammation, and significant damage to neurons in postoperative cognitive dysfunction. In group 2, the content of NGF gradually increased after surgery and reached a maximum by postoperative day 7 days, which may indicate activation of compensatory processes in response to the action of damaging factors. The BDNF concentration was higher in patients of group 1 both before and after surgery, which suggested neuroprotective properties of this protein. Patients of group 2 had higher MBP concentrations throughout the study, which may indicate more significant damage to oligodendrocytes than in group 1.

Conclusion. The damage to the central nervous system in patients with postoperative cognitive dysfunction results from excessive activation of the proinflammatory response and longer maintenance of neuroinflammation, pronounced injury of neurons and oligodendrocytes, and insufficiency of BDNF, which results in reduced neuronal neuroplasticity. A considerable increase in MBP and shortage of BDNF in patients with postoperative cognitive dysfunction before the surgery requires further study of these indexes as predictors and markers for development of postoperative cognitive dysfunction in CHD patients before CABG.

Keywords: postoperative cognitive dysfunction; neuropeptides; coronary artery bypass surgery.

For citation: Markelova E.V., Zenina A.A., Shumatov V.B., Silaev A.A. The role of neuropeptides in the development of postoperative cognitive dysfunction in patients with coronary heart disease after coronary artery bypass grafting. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 20-28. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.20-28

For correspondence: **Zenina Aleksandra Aleksandrovna**, graduate student of the Department of Normal and Pathological Physiology of FSBEI HE «Pacific State Medical University», e-mail: zenina.aa@dvmu.ru

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Contribution: conception and dizain – Markelova E.V., Zenina A.A.; collection and processing of material – Zenina A.A., Silaev A.A.; writing a text – Zenina A.A.; editing – Markelova E.V., Shumatov V.B. 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:

Markelova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-5846-851X>Zenina A.A., <https://orcid.org/0000-0001-6121-7498>Shumatov V.B., <https://orcid.org/0000-0002-9645-3471>Silaev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-7663-4768>

Resived 20.08.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Развитие церебральных осложнений всегда представляло серьезную проблему для пациентов с ишемической болезнью сердца после аортокоронарного шунтирования. Совершенствование методов реваскуляризации миокарда, искусственного кровообращения, анестезиологического обеспечения, мониторинга и применяемых лекарственных препаратов позволило значительно снизить количество грубых неврологических осложнений. В настоящее время активно проявляется интерес к проблеме послеоперационных когнитивных дисфункций (ПКД), которые являются более легким проявлением неврологических нарушений, но приводят к увеличению сроков пребывания в стационаре, ухудшению качества жизни пациентов, снижению производительности труда и увеличению затрат на лечение [1].

Четких диагностических критериев ПКД не разработано. Диагностика осуществляется на основании сравнения баллов при нейропсихическом тестировании пациентов по различным шкалам до и после операции [1, 2]. Для оценки когнитивных функций используются многочисленные нейропсихологические тесты и пробы на запоминание и воспроизведение слов и рисунков, узнавание объектов, решение интеллектуальных задач. Из них наиболее популярны для скринингового обследования Монреальская шкала когнитивных оценок (MoCA) и шкала MMSE (Mini Mental State Examination). MoCA позволяет оценить память, внимание, исполнительные навыки, речь, ориентацию в пространстве и другие сложные интеллектуальные функции, в связи с чем она более чувствительна для обнаружения умеренных когнитивных нарушений у пациентов перед операцией АКШ чем MMSE [2].

Послеоперационные когнитивные дисфункции – это многофакторное осложнение, являющееся результатом различных патофизиологических процессов, в основе которых лежат нейровоспаление и нейрогормональные изменения. Активация микроглии сопровождается мощным иммунным ответом с выбросом провоспалительных цитокинов, что способствует нарушению функционирования нейронов и развитию когнитивной дисфункции [1, 2].

В настоящее время активно ведется поиск чувствительных методов диагностики повреждений мозга. Среди биохимических маркеров активно изучается содержание нейроспецифических белков в разных биологических средах. Большинство этих белков является аутоантигенами и их попадание в кровоток может сопровождаться появлением аутоантител, которые из кровеносного сосуда проникают в мозг при нарушении проницаемости гематоэнцефалического барьера,

вызывают развитие воспаления, отека и морфологические изменения в нейронах [1, 3, 4].

Цель исследования – анализ уровня нейропептидов у пациентов с ишемической болезнью сердца с послеоперационной когнитивной дисфункцией после аортокоронарного шунтирования.

Методика

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

В исследование включено 40 пациентов обоего пола от 52 до 75 лет с ишемической болезнью сердца (ИБС), перенесших аортокоронарное шунтирование (АКШ) в условиях искусственного кровообращения (ИК). Для выявления когнитивных нарушений использовали Монреальскую шкалу когнитивного обследования (MoCa-тест) до операции и на 7-е сут после операции. Пациенты были разделены на 2 группы на основании данных MoCa-теста: 1-ю группу составили 23 пациента (14 мужчин и 9 женщин), у которых наблюдалось снижение показателей MoCa-теста после АКШ менее 3 баллов (1-я группа без ПКД), 2-ю – 17 пациентов (11 мужчин и 6 женщин) со снижением этого показателя более 3 баллов (2-я группа с ПКД). Индекс массы тела в 1-й и 2-й группах был сопоставим – 26,4–30,2 и 26,9–29,8 соответственно. Время искусственного кровообращения в 1-й группе было в пределах 60–78 мин, во 2-й – 63–80 мин. Время операции в обеих группах составляло от 175 до 188 мин. Из исследования исключались пациенты с сахарным диабетом, существенной дисфункцией почек на уровне хронической болезни почек III стадии и выше, дыхательной недостаточностью выше II стадии, печеночной недостаточностью, а также лица с инфарктом миокарда, острой дыхательной и почечной недостаточностью в послеоперационном периоде.

Определение уровня протеина S100 β , NSE, MBR, BDNF и NGF в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (R & D Systems, США). Биологический материал исследовали в динамике: до операции, сразу после операции, через 24 ч и на 7-е сут после операции. Статистический анализ выполнен с помощью непараметрических критериев. Результаты представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей. Сравнение значений в выборках проводили с помощью критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Статистическая значимость наиболее информативных показателей подтверждена ROC-анализом.

Результаты

Результаты исследования нейропептидов у пациентов исследованных групп отражены в **таблице** и на **рис. 1–5**.

Содержание S100β у пациентов 1-й группы до операции было несколько ниже, чем во 2-й группе (**рис. 1**).

В дальнейшем сразу после операции концентрация S100β значительно повышалась в обеих группах. Однако во 2-й группе она была статистически значимо выше, чем в 1-й группе ($p < 0,05$). Через 24 ч после операции концентрация этого нейропептида су-

щественно снижалась у пациентов обеих групп ($p < 0,01$), но его уровень оставался значимо выше во 2-й группе ($p < 0,05$). На 7-е сут после операции содержание S100β продолжало снижаться. При этом в 1-й группе его значение стало ниже, чем до операции, тогда как во 2-й группе, напротив – выше чем до операции ($p < 0,05$).

Уровень NSE в сыворотке крови до операции был значимо ниже в 1-й группе ($p < 0,05$), чем во 2-й (**рис. 2**). Сразу после операции его концентрация возрастала в обеих группах, но во 2-й группе она была значимо выше ($p < 0,05$). Через 24 ч после операции значение это-

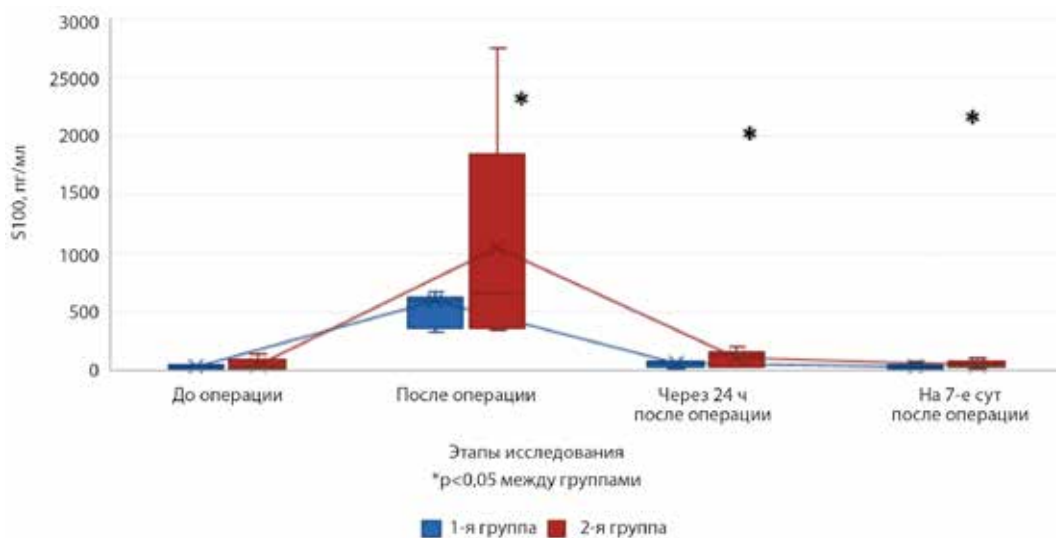


Рис. 1. Динамика изменений концентрации протеина S100β в сыворотке крови.

По вертикали – концентрация S100β, пг/мл; по горизонтали – этапы исследования. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия концентрации белка между группами.

Таблица

Сывороточный уровень нейропептидов у обследованных пациентов в динамике до и после оперативного вмешательства

Показатель	1-я группа, n=23				2-я группа, n=17			
	до операции	после операции	через 24 ч после операции	7-е сут после операции	до операции	после операции	через 24 ч после операции	7-е сут после операции
S100β, пг/мл	19,85 [12,72;33,86]	584,83 [368,0;651,68]	62,9 [31,76;70,4]	17,71 [15,56;36,20]	21,44 [15,67;58,06]	1006,71* [389,2;1748,4]	113,84* [50,82;134,06]	43,08* [31,82;59,41]
NSE, нг/мл	4,19 [2,67;5,15]	5,61 [4,64;6,16]	4,01 [3,44;4,7]	4,55 [3,65;5,28]	5,41* [4,3;6,05]	6,25* [5,76;6,84]	5,25* [4,28;5,97]	4,52 [2,95;6,28]
NGF, пг/мл	4,34 [3,75;5,6]	6,26 [4,9;7,88]	7,08 [4,9;7,8]	6,09 [4,8;6,95]	4,84 [3,74;8,6]	6,1 [4,1;7,5]	11,06* [6,93;14,61]	10,3* [5,82;12,98]
BNDF, пг/мл	18,08 [13,84;20,92]	10,18 [2,72;15,86]	8,25 [3,16;14,61]	14,24 [9,12;17,97]	8,46* [7,86;11,48]	8,75 [5,64;14,13]	10,1* [4,82;16,68]	14,63 [12,24;16,90]
MBR, пг/мл	18,8 [15,94;25,1]	4,06 [2,31;8,49]	5,51 [3,63;8,71]	8,48 [3,73;14,02]	38,05* [15,16;62,06]	5,12 [2,25;10,8]	20,48* [8,2;32,08]	36,08* [8,64;60,8]

Примечание. * – статистическая значимость различий показателей между группами 1-й и 2-й в динамике, $p < 0,05$.

го показателя снижалось в обеих группах. Однако в 1-й группе снижение было более существенным ($p < 0,05$). На 7-е сут после операции содержание NSE продолжало снижаться во 2-й группе, тогда как в 1-й группе, напротив, несколько повышалось.

Значение NGF до оперативного вмешательства у пациентов в группе без ПКД (1-я группа) было ниже,

чем у пациентов 2-й группы с когнитивной дисфункцией (рис. 3). После оперативного вмешательства уровень этого нейропептида значимо не различался между группами. Через 24 ч после операции содержание NGF нарастало в обеих группах, однако во 2-й группе оно было статистически значимо выше, чем в 1-й ($p < 0,05$). На 7-е сут после операции отмечено сниже-

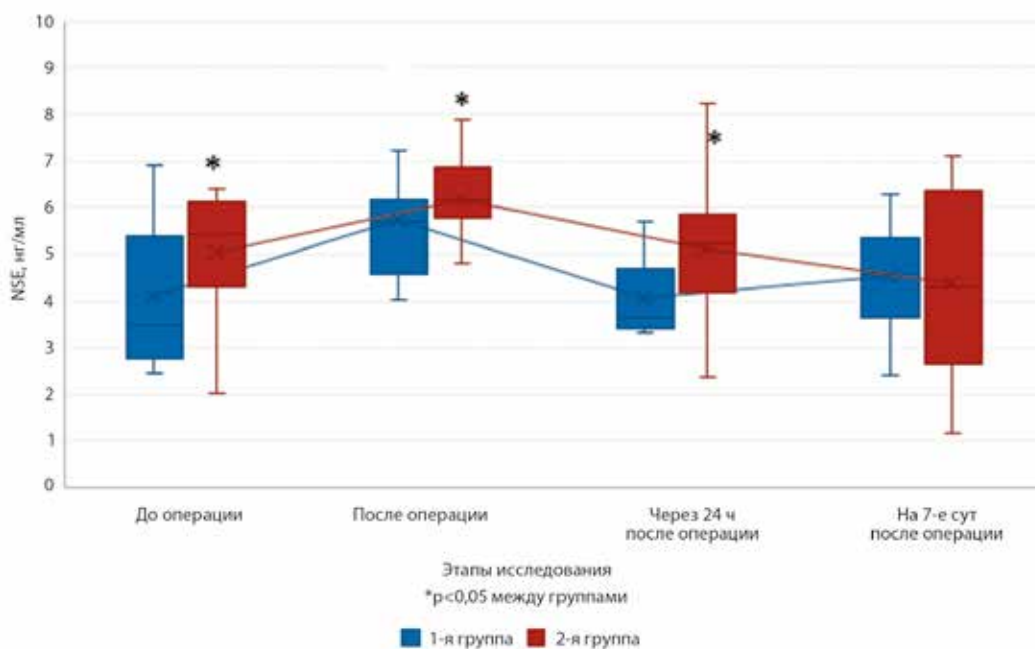


Рис. 2. Динамика изменений нейрон-специфической енолазы (NSE) в сыворотке крови.

По вертикали концентрация NSE, нг/мл, по горизонтали – этапы исследования. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия концентрации белка между группами.

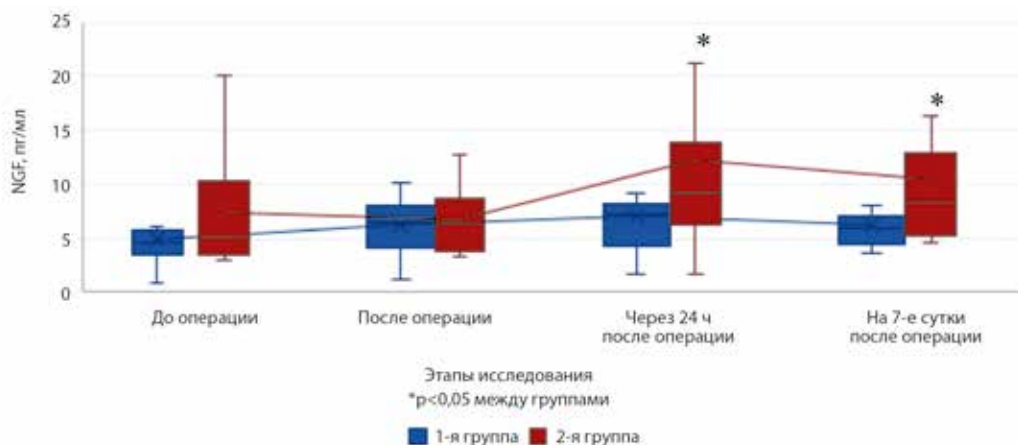


Рис. 3. Динамика изменений фактора роста нервов (NGF) в сыворотке крови.

По вертикали концентрация NGF, пг/мл, по горизонтали – этапы исследования. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия концентрации белка между группами.

ние этого показателя в обеих группах, но его значение оставалось все же выше, чем до операции ($p < 0,05$).

Концентрация BDNF до операции была исходно статистически значимо выше у пациентов 1-й группы, чем во 2-й группе ($p < 0,01$) (рис. 4), что подтверждается данными ROC-анализа (рис. 6). После операции отмечено некоторое снижение этого показателя в обеих группах. Через 24 ч после операции содержание BDNF в сыворотке крови, напротив, оказалось значимо выше во 2-й группе ($p < 0,05$). На 7-е сут после операции

концентрация этого нейропептида увеличилась и значимо не различалась между группами.

Содержание MBR до операции было выше в группе у пациентов с ПКД, чем в группе без послеоперационных когнитивных нарушений ($p < 0,05$) (рис. 5), что подтверждается данными ROC-анализа (рис. 7). В дальнейшем происходило значимое снижение этого показателя после операции в обеих группах ($p < 0,05$) (рис. 5), его значение существенно не различалось между группами. Через 24 ч после операции уровень MBR увели-

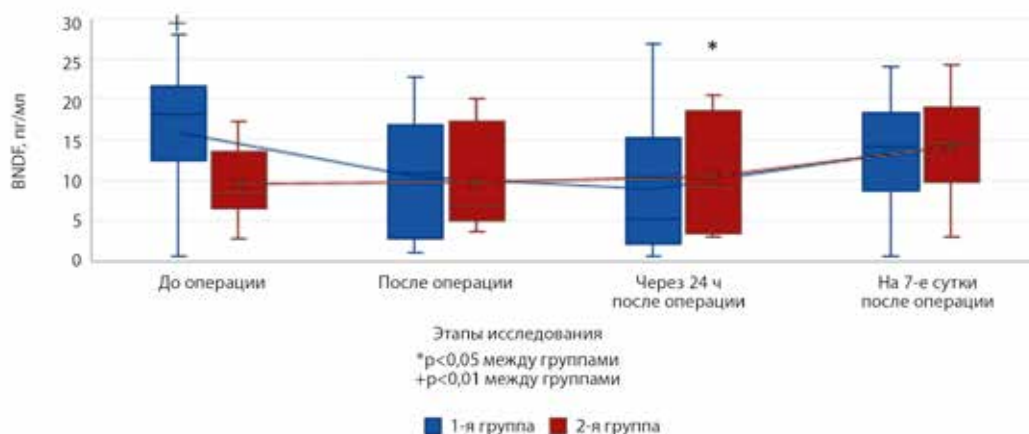


Рис. 4. Динамика изменений мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в сыворотке крови. По вертикали концентрация BDNF, пг/мл, по горизонтали – этапы исследования.

* $p < 0,05$, + $p < 0,01$ – статистически значимые различия концентрации белка между группами.

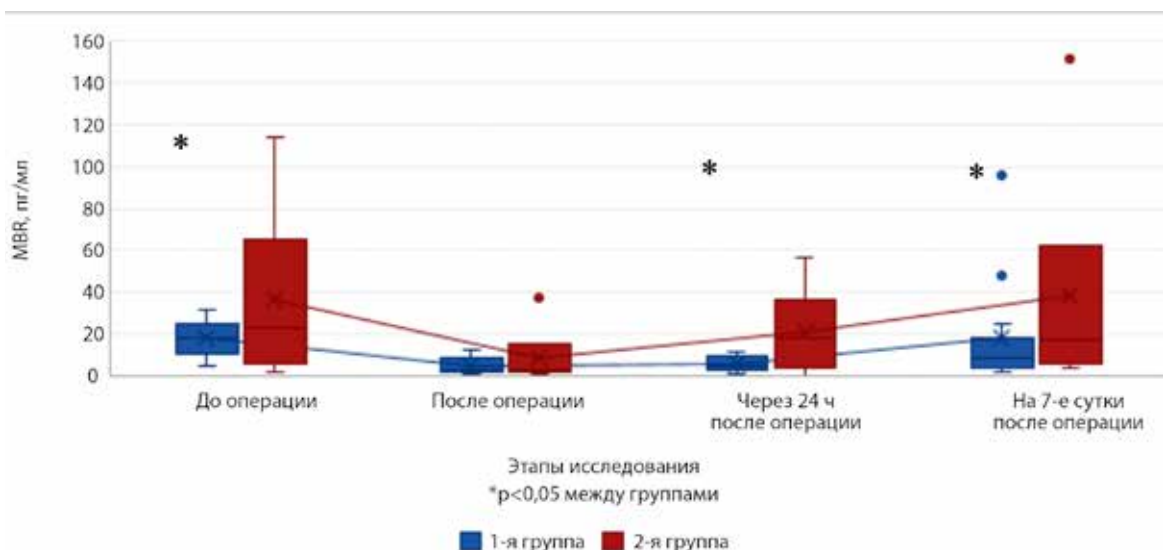


Рис. 5. Динамика изменений основного белка миелина (MBR). По вертикали концентрация MBR, пг/мл, по горизонтали – этапы исследования.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия концентрации белка между группами.

чивался в обеих группах, но в 1-й группе его значение было значимо ниже, чем во 2-й ($p < 0,05$). На 7-е сут после операции продолжался рост концентрации основного белка миелина в сыворотке крови пациентов обеих группах, тогда как его уровень во 2-й группе существенно не отличался от дооперационного уровня.

Обсуждение

Протеин S100 β считается маркером генерализованного повреждения гематоэнцефалического барьера [3]. В низких концентрациях в сыворотке крови он блокирует NMDA-рецепторы и действует как фактор роста и дифференцировки нейронов и глии, оказывая нейротрофический эффект. Кроме этого, он влияет на формирование мозга, пролиферацию глиальных клеток и созревание нейронов, способствует выживанию клеток в стрессовых условиях и противодействует эффектам нейротоксинов. При высоком содержании этот белок оказывает провоспалительное действие и запускает синтез провоспалительных цитокинов, что приводит к апоптозу нейронов [5]. В нашем исследовании отмечено более выраженное повышение уровня S100 β в сыворотке крови во все периоды после операции у пациентов с ПКД в отличие от пациентов 1-й группы, что обусловлено более выраженной провоспалительной реакцией и длительным поддержанием нейровоспаления. Однако обращает внимание большой разброс значений между нижним и верхним квартилем, это, возможно, связано с тем, что данный нейропептид отражает повреждение определенных когнитивных функций (например, память или внимание), что отдельно не выделяется суммой баллов MoCA-теста и требует дополнительных исследований.

Нейронспецифическая енолаза — нейропептид, являющийся гликолитическим ферментом из семейства енолаз. При ишемическом повреждении ЦНС определение уровня NSE в сыворотке крови дает ценную информацию о степени выраженности повреждений нейронов и нарушении мембранной функции гематоэнцефалического барьера [3, 6]. В исследовании, проведенном нами, отмечено более высокое содержание этого нейропептида в сыворотке крови во все периоды после операции у пациентов 2-й группы, что свидетельствует о более значительном повреждении нейронов при ПКД.

Фактор роста нервов относится к семейству нейротрофинов и принимает участие в регуляции процессов пролиферации, дифференциации, миелинизации, апоптоза, синаптической пластичности, а также в поддержании функциональной активности центральных и периферических нейронов [7]. Этот белок широко представлен в различных тканях и может оказывать

нейротрофический эффект на поврежденные нейроны и способствовать нейрогенезу [7, 8]. В современной литературе наибольшее количество исследований посвящено изучению нейротрофических свойств этого пептида. Встречаются единичные сведения об исследовании содержания NGF в сыворотке крови при оценке выраженности неврологического дефицита и исходов перинатального повреждения ЦНС у детей первого года жизни [8].

В нашем исследовании уровень NGF в сыворотке крови до операции у пациентов в группе без ПКД был ниже, чем у пациентов с когнитивной дисфункцией. После операции уровень NGF постепенно повышался во 2-й группе, достигая максимума через 24 ч и на 7-е сут, что может свидетельствовать о реализации компенсаторных процессов в ответ на действие повреждающих факторов, тогда как в группе больных без ПКД этот показатель повышался менее значимо, а на 7-е сут начинал снижаться.

В современной литературе встречаются единичные противоречивые сообщения по использованию BDNF в качестве маркера повреждения головного мозга у людей. Этот пептид стимулирует экспрессию NMDA-рецепторов, приводит к увеличению притока кальция в клетку и активации внутриклеточных механизмов, формирующих долговременную потенциацию, и вызывает модуляцию синаптической пластичности [9]. У пациентов с хронической ишемией головного мозга выявлено, что снижение когнитивных функций, возникших в результате ухудшения мозговой активности в условиях сниженного кровотока в головном мозге, связано с низким содержанием BDNF в сыворотке крови [10]. Ранее была установлена сопряженность уровня этого нейропептида с возрастом. Отмечено, что у молодых людей когнитивные нарушения коррелируют с повышением содержания BDNF в сыворотке крови, а в группе среднего возраста со стенозирующим атеросклерозом брахиоцефальных сосудов зарегистрировано снижение содержания этого нейротрофина [8]. У больных с черепно-мозговой травмой содержание BDNF в сыворотке крови в острый период зависит от выраженности клинических симптомов. При этом восстановление когнитивных функций при травмах легкой и средней степени связано с активацией этого белка, а его содержание может служить прогностическим критерием развития когнитивных нарушений в отдаленном периоде [11].

По результатам нашего исследования выявлено более высокое содержание BDNF в сыворотке крови у пациентов без ПКД по сравнению с пациентами 2-й группы в период до и после операции, что подтверждает мнение ряда авторов и позволяет говорить о нейротрофическом

ных свойствах этого белка. Тогда как у пациентов с когнитивными нарушениями отмечено умеренное повышение этого показателя лишь через 24 ч после операции и на 7-е сут после операции. Абсолютный и относительный дефицит этого нейропептида у пациентов приводит к уменьшению нейропластичности нейронов при воздействии гипоксии и операционной травмы. Это позволяет рассматривать недостаток BDNF до операции как предиктор развития ПКД, что подтверждено ROC- анализом концентрации BDNF до операции AUC=0,974 (отличное качество модели, **рис. 6**).

Основной миелиновый белок считается маркером повреждения олигодендроцитов, главная функция которых миелинизация аксонов ЦНС [12]. В экспериментальных исследованиях выявлено, что блокиро-

вание этого белка антителами и октапептидом вызывает воспалительный процесс в мозге, демиелинизацию и паралич конечностей [13]. Однако, мало данных об использовании этого пептида в качестве биомаркера повреждения головного мозга у людей. В настоящее время появляются единичные публикации о повышении концентрации этого нейропептида в сыворотке крови при хронической ишемии головного мозга [12], ревматоидном артрите [13], когнитивной дисфункции у больных с сахарным диабетом [14], при ишемическом инсульте и демиелинизирующих заболеваниях [5].

В нашей работе отмечена более высокая концентрация этого пептида в сыворотке крови у пациентов с ПКД на всех этапах исследования, что может свидетельствовать о более значительном повреждении у них олигодендроцитов, чем у пациентов 1-й группы. Повышенное содержание этого белка у пациентов 2-й группы, возможно, при дальнейших исследованиях на больших когортах пациентов позволит считать его предиктором ПКД, что подтверждается данными ROC-анализа AUC=0,728 (хорошее качество модели, **рис. 7**). Однако большой разброс между квартилями у пациентов 2-й группы наводит на мысль об участии этого белка в нарушении какой-то отдельной функции нервной системы.

Заключение

Таким образом, повреждение центральной нервной системы у пациентов с ПКД обусловлено избыточной активацией провоспалительной реакции и более длительным поддержанием нейровоспаления, выраженным повреждением нейронов, олигодендроцитов, а также недостаточностью BDNF, что приводит к снижению нейропластичности нейронов. Значительное повышение уровня MBR и дефицит BDNF до операции у пациентов с ПКД требует дальнейшего исследования с целью установления возможности использования этих показателей перед операцией АКШ в качестве предикторов и маркеров развития послеоперационной когнитивной дисфункции у больных с ИБС.

Литература

1. Алексеевич Г.Ю., Родиков М.В., Можейко Е.Ю., Петрова М.М., Еремина О.В., Алексеевич Г.В. Проблемы когнитивной дисфункции после аортокоронарного шунтирования. *Сибирское медицинское обозрение*. 2015; 6: 30-6.
2. Новицкая-Усенко Л.В. Послеоперационная когнитивная дисфункция в практике врача-анестезиолога. *Медицина неотложных состояний*. 2017; 4(83): 9-15. DOI: 10.22141/2224-0586.4.83.2017.107418
3. Храпов Ю.В., Поройский С.В. Роль биомаркеров повреждения вещества головного мозга в диагностике, оценке эффективности лечения и прогнозировании исходов тяжелой черепно-мозговой травмы. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2013; 2: 10-20.

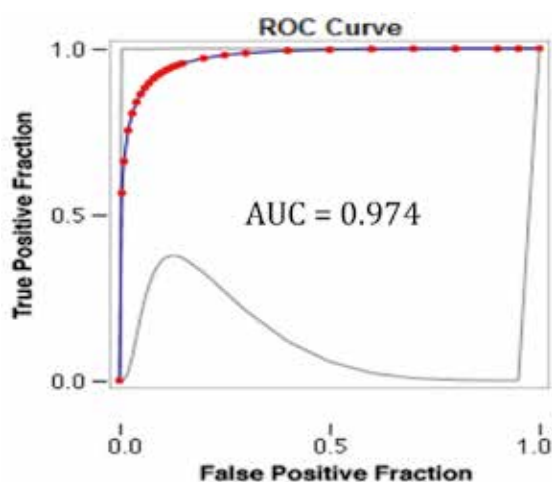


Рис. 6. Рос-кривая BDNF.

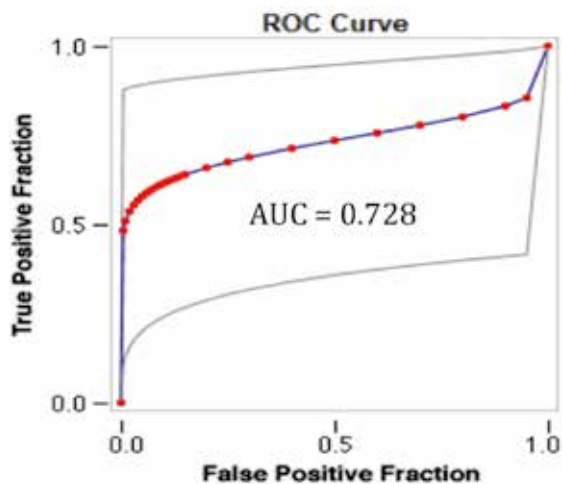


Рис. 7. Рос-кривая MBR.

4. Дюйзен И.В., Иванис В.А., Михайлов А.С., Менчинская Е.С., Манжуло И.В., Огурцова О.С. Изучение содержания нейрональных маркеров при некоторых инфекционных заболеваниях. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015; 2: 27-30.
5. Кадырова И.А., Миндубаева Ф.А., Гржибовский А.М. Систематический обзор методов прогнозирования исхода мозгового инсульта. *Экология человека*. 2015; 10: 55-64.
6. Блинов Д.В. Оценка проницаемости ГЭБ для нейроспецифической енолазы при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС. *Акушерство, гинекология и репродукция*. 2013; 4: 15-9.
7. Педелькина Е.С., Николаев С.В., Антипова Т.А., Крыжановский С.А. Изучение ангиотропной активности фактора роста нервов в опытах на культуре эндотелиальных клеток человека. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2018; 1: 32-5.
8. Красноручская О.Н., Балакирева Е.А., Бугримов Д.Ю., Зуйкова А.А., Котова Ю.А. Роль фактора роста нервов в оценке степени тяжести клинических проявлений и исходов перинатального поражения ЦНС у детей первого года жизни. *Смоленский медицинский альманах*. 2016; 3: 83-8.
9. Белоусова Н.П., Громова О.А., Пепеляев Е.Г. Взаимосвязь когнитивных нарушений и уровня BDNF у лиц молодого возраста. *Медицина в Кузбассе*. 2017; 16(4): 39-43.
10. Цепилов С.В., Каракулова Ю.В. Нейротрофины крови при хронической ишемии головного мозга. *Пермский медицинский журнал*. 2016; 33(6): 60-5.
11. Селянина Н.В. Мозговой нейротрофический фактор как прогностический критерий развития когнитивных нарушений у больных острой черепно-мозговой травмой. *Медицинский альманах*. 2013; 1(25): 127-9.
12. Усманова Д.Д., Маджидова Е.Н. Участие нейроспецифического белка S100 и основного белка миелина в патогенезе развития хронической ишемии мозга. *Сибирское медицинское обозрение*. 2017; 1: 60-3. DOI: 10.20333/2500136-2017-1-60-63
13. Баранов Е.В., Парамонова О.В., Гонтарь И.П. Иммунологический подход к диагностике поражения нервной системы у больных ревматоидным артритом. *Медицинский альманах*. 2013; 1(25): 155-8.
14. Новоселова М.В., Самойлова Ю.Г., Жукова Н.Г. Содержание нейроспецифических белков при когнитивных нарушениях у пациентов с сахарным диабетом 1 типа. *Клиническая медицина*. 2014; 8: 46-9.
2. Novickaya-Usenko L.V. Postoperative cognitive dysfunction in the practice of an anesthetist. *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy*. 2017; 4(83): 9-15. (in Russian) DOI: 10.22141/2224-0586.4.83.2017.107418
3. Khrapov Y.V., Poroyksy S.V. Role of brain damage biomarker in diagnostics, treatment assessment and outcome prediction in severe craniocerebral injury. *Volgogradskiy Nauchnyy Meditsinskiy Zhurnal*. 2013; 2: 10-20. (in Russian)
4. Dyuzhen I.V., Ivanis V.A., Mihajlov A.S., Menchinskaya E.S., Manzhulo I.V., Ogurcova O.S. Study of the content of neuronal markers in certain infectious diseases. *Tikhookeanskiy Meditsinskiy Zhurnal*. 2015; 2: 27-30. (in Russian)
5. Kadyrova I.A., Mindubaeva F.A., Grzhibovky A.M. A systematic review of methods for predicting the outcome of cerebral stroke. *Ekologiya cheloveka*. 2015; 10: 55-64. (in Russian)
6. Blinov D.V. Estimation of the BBB permeability for a neurospecific enolase in perinatal hypoxic-ischemic CNS damage. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduktiya*. 2013; 4: 15-9. (in Russian)
7. Pedelkina E.S., Nikolaev S.V., Antipova T.A., Kryzhanovsky S.A. The study of the angiotropic activity of nerve growth factor in experiments on the culture of human endothelial cells. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018; 1: 32-5. (in Russian)
8. Krasnorutskaya O.N., Balakireva Ye.A., Bugrimov D.Yu., Zuykova A.A., Kotova Yu.A. The role of nerve growth factor in assessing the severity of clinical manifestations and outcomes of perinatal CNS damage in children in the first year of life. *Smolenskiy meditsinskiy al'manakh*. 2016; 3: 83-8. (in Russian)
9. Belousova N.P., Gromova O.A., Pepeliaev E.G. The relationship of cognitive impairment and the level of BDNF in young people. *Meditsina v Kuzbasse*. 2017; 16(4): 39-43. (in Russian)
10. Tsepilov S.V., Karakulova Yu.V. Blood neurotrophins in chronic cerebral ischemia. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2016; 33(6): 60-5. (in Russian)
11. Selyanina N.V. Brain neurotrophic factor as a prognostic criterion for the development of cognitive impairment in patients with acute traumatic brain injury. *Meditsinskiy al'manakh*. 2013; 1(25): 127-9. (in Russian)
12. Usmanova D.D., Madzhidova E.N. Involvement of neuro-specific protein S100 and myelin basic protein in the pathogenesis of chronic brain ischemia. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie*. 2017; 1: 60-63. (in Russian)
13. Baranov E.V., Paramonova O.V., Gontar I.P. Immunological approach to the diagnosis of damage to the nervous system in patients with rheumatoid arthritis. *Meditsinskiy al'manakh*. 2013; 1(25): 155-8. (in Russian)
14. Novoselova M.V., Samoilova Yu.G., Zhukova N.G. The content of neurospecific proteins in cognitive impairment in patients with type 1 diabetes. *Klinicheskaya meditsina*. 2014; 8: 46-9. (in Russian)

References

1. Alekseevich G.Yu., Rodikov M.V., Mozhejko E.Yu., Petrova M.M., Eremina O.V., Alekseevich G.V. Problem of cognitive dysfunction after coronary artery bypass grafting. *Sibirskoye meditsinskoye obozreniye*. 2015; 6: 30-6. (in Russian)

Сведения об авторах:

Маркелова Елена Владимировна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нормальной и патологической физиологии, ФГБОУ ВО ТГМУ, Владивосток, e-mail: markev2010@mail.ru;

Зенина Александра Александровна, аспирант каф. нормальной и патологической физиологии, ФГБОУ ВО ТГМУ, Владивосток, врач анестезиолог-реаниматолог ФГБОУ ВО «Дальневосточный Федеральный университет», Владивосток, e-mail: zenina.aa@dvfu.ru;

Шуматов Валентин Борисович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. анестезиологии и реаниматологии, ректор ФГБОУ ВО ТГМУ, Владивосток;

Силаев Андрей Анатольевич, канд. мед. наук, зав. отд-нием анестезиологии и реанимации ФГБОУ ВО «Дальневосточный Федеральный университет», Владивосток, e-mail: silaev.aa@dvfu.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Иванова Н.А.¹, Бурденный А.М.^{1,2}, Логинов В.И.^{1,3}, Кураева Т.Л.⁴, Носиков В.В.²

Роль полиморфных маркеров гена *IL10* в патогенезе сахарного диабета 1-го типа

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

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

²ФГБНУ «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля» РАН,

119334, г. Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени акад. Н.П. Бочкова»,

115478, г. Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1;

⁴ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России,

117036, г. Москва, ул. Дм. Ульянова, д. 11

Сахарный диабет типа 1 (СД1) представляет собой многофакторное заболевание, которое характеризуется аутоиммунной природой. Важным фактором в патогенезе СД1 является генетическая предрасположенность, характеризующаяся наличием функциональных однонуклеотидных замен (SNP) в генах цитокинов, ответственных за воспаление. Предполагают, что длительное хроническое воспаление приводит к необратимому разрушению β -клеток поджелудочной железы и может быть объяснено наличием функциональных полиморфных маркеров в генах-антагонистах.

Цель исследования – изучение частоты аллельных вариантов ряда полиморфных маркеров гена *IL10* при СД1 у жителей Москвы и Московской области.

Методика. В работу включено 366 больных СД 1 типа и 526 здоровых индивидов русского происхождения. Группу больных составили пациенты с наличием сахарного диабета 1 типа различной манифестации с общей медианой 41 ± 5 лет. Обе группы выравнены по полу и возрасту. Определение генотипов полиморфных маркеров *rs1800896*, *rs1800872* и *rs3024505* гена *IL10* проводилось с помощью ПЦР «в реальном времени» на амплификаторе «Real-time CFX96 Touch» (Bio-Rad, США) с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS (Евроген, Россия) и уникальных праймеров и зондов.

Результаты. В результате проведенного исследования выявлена статистически значимая ассоциация полиморфного маркера *rs1800896* гена *IL10* с повышенным риском развития СД1 ($\chi^2=15.52$, $OR=1.48$, $CI_{95\%}=1.23-1.79$, $p=0,0004$).

Заключение. Полученные результаты дополняют информацию о механизмах возникновения СД типа 1. Внедрение в практику анализа полиморфных вариантов гена *IL10* позволит выявить предрасположенность к развитию этого заболевания, его прогрессированию у пациентов с аутоиммунными заболеваниями и у лиц, находящихся в группе риска.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа; цитокины; ген *IL10*; полиморфизм.

Для цитирования: Иванова Н.А., Бурденный А.М., Логинов В.И., Кураева Т.Л., Носиков В.В. Роль полиморфных маркеров гена *IL10* в патогенезе сахарного диабета 1 типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64 (3): 29-33.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.29-33

Для корреспонденции: Бурденный Алексей Михайлович, e-mail: burdenny@gmail.com

Участие авторов: дизайн эксперимента – Носиков В.В.; получение и анализ результатов – Иванова Н.А., Бурденный А.М.; сбор образцов – Кураева Т.Л.; концепция и дизайн статьи – Бурденный А.М., Иванова Н.А.; написание и редактирование статьи – Бурденный А.М., Логинов В.И., Носиков В.В., Иванова Н.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.03.2020

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Ivanova N.A.¹, Burdennyu A.M.^{1,2}, Loginov V.I.^{1,3}, Kuraeva T.L.⁴, Nosikov V.V.²

The pathogenic role of *IL10* gene polymorphisms in type 1 diabetes mellitus

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation;²N.M. Emanuel Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygina Str. 4, Moscow 119334, Russian Federation;³Academician N.P. Bochkov Research Center of Medical Genetics, Moskvorechje Str. 1, Moscow 115478, Russian Federation;⁴National Medical Research Center for Endocrinology, Dmitriya Uljyanova Str. 11, Moscow 117036, Russian Federation

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a multifactorial disease of an autoimmune origin. An important factor in the pathogenesis of T1DM is genetic predisposition characterized by the presence of functional single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the cytokine genes contributing to inflammation. Long-standing, chronic inflammation is considered to result in irreversible destruction of all pancreatic β -cells and may be due to the presence of functional polymorphic markers in genes of inflammation antagonists, such as the interleukin 10 (*IL10*) gene.

Aim. The aim of this study was to determine the frequency of allelic variants in a number of *IL10* gene polymorphic markers in residents of Moscow and the Moscow Region with T1DM.

Methods. The study includes 366 patients with T1DM with different manifestations and a median duration of 41 ± 5 years and 526 healthy individuals. The groups were gender- and age-matched. Genotypes of the *rs1800896*, *rs1800872*, and *rs3024505* polymorphic markers of the *IL10* gene were determined with real-time PCR on a Real-Time CFX96 Touch amplifier (Bio-Rad, USA) with a qPCRMix-HS ready-mixed PCR kit (Eurogen, Russia) and unique primers and probes.

Results. The *rs1800896* polymorphic marker of the *IL10* gene statistically significantly correlated with increased risk of T1DM ($\chi^2=15.52$, OR=1.48, CI_{95%}=1.23-1.79, $p=0.0004$). **Conclusion.** The study results complement the information about T1DM mechanisms of origin and pathogenesis. Implementation in practice of the methods for analyzing polymorphic variants of the *IL10* gene will allow revealing a predisposition to this disease and/or its progression in patients with autoimmune diseases or in people at risk.

Keywords: type 1 diabetes mellitus; cytokines; *IL10* gene; polymorphism.

For citation: Ivanova N.A., Burdenny A.M., Loginov V.I., Kuraeva T.L., Nosikov V.V. The pathogenic role of *IL10* gene polymorphisms in type 1 diabetes mellitus. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy, Russian Journal)*. 2020; 64 (3):29-33. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.29-33

For correspondence: *Burdenny Alexey Mihailovitch*, Ph.D., I.s.s. of Pathogenomics and Transcriptomics laboratory of Institute of General Pathology and Pathophysiology, e-mail: burdenny@gmail.com

Contribution: experiment design – Nosikov V.V.; obtaining and analysis of results – Ivanova N.A., Burdenny A.M.; sample collection – Kuraeva T.L.; article concept and design – Burdenny A.M., Ivanova N.A.; writing and editing an article – Burdenny A.M., Loginov V.I., Nosikov V.V., Ivanova N.A. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

Burdenny A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>

Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Received 15.03.2020

Accepted 24.06.2020

Published 10.08.2020

Введение

В настоящее время в клинической медицине благодаря современным молекулярно-биологическим методам исследования, наблюдается значительный прогресс в понимании патогенеза многофакторных заболеваний, в том числе и сахарного диабета типа 1 (СД1). Основной причиной возникновения СД1 является органоспецифическое аутоиммунное разрушение продуцирующих инсулин β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы [1]. Центральная роль при этом отводится провоспалительным цитокинам. В ряде работ показано, что провоспалительные цитокины, в том числе и интерлейкин 1 (*IL1*), цитотоксичны для β -клеток, они участвуют в развитии эндотелиальной дисфункции, *IL1* в организме запускает локальную воспалительную реакцию в ткани поджелудочной железы, а также каскад продукции других цитокинов, что в конечном счёте приводит к активации Т- и В-лимфоцитов. «Хроническая» секреция *IL1* приводит к модификации Т-хелперов, которые в свою очередь активируют цито-

токсические Т-лимфоциты, воздействие которых приводит к необратимому разрушению β -клеток поджелудочной железы [2–5]. Прямым антагонистом *IL1* с противовоспалительными свойствами и со способностью ингибировать производство воспалительных цитокинов и хемокинов является *IL10*, кодируемый одноимённым геном. Данный белок действует на адаптивный и врожденный иммунитет, подавляет *IL1*, что существенно снижает производство Т-клеток. При этом должны увеличиваться выживание и пролиферация β -клеток поджелудочной железы [6].

В настоящее время опубликовано ряд работ, свидетельствующих о влиянии полиморфных маркеров генов, кодирующих противовоспалительные цитокины, в том числе и *IL10*, на риск развития СД1 [7]. Следует отметить, что в гене *IL10* таких функциональных полиморфных маркеров, влияющих на экспрессию гена, найдено около 10, в том числе наиболее значимые: G(-592)T – *rs1800872*, T(-1082)C – *rs1800896* и G(10936)

A – *rs3024505* [8, 9]. Также имеются данные о снижении количества и функциональной активности IL10 у больных с аутоиммунными заболеваниями, являющихся носителями аллеля T полиморфного маркера *rs1800872*, расположенного в промоторной области гена [10].

Полиморфный маркер *rs3024505* в отличие от двух других маркеров, расположен в 3'-нетранслируемой области (3'UTR) гена IL10, и было высказано предположение, что он также может влиять на уровень экспрессии IL10 [11]. В последующих исследованиях, связанных с изучением хронических воспалительных заболеваний, была показана ассоциация *rs3024505* с синдромом Шегрена [12], болезнью Крона [13] и язвенным колитом [14]. Тем не менее вклад этих маркеров в риск развития СД типа 1 остается невыясненным.

Цель исследования – изучение частоты аллельных вариантов ряда полиморфных маркеров гена IL10 при СД типа 1 у жителей Москвы и Московской области.

Методика

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288). Работа выполнена на образцах крови жителей Москвы и Московской области. Протокол исследования одобрен этическим комитетом института.

В настоящую работу включено 2 группы лиц, выравненных по полу и возрасту. Группа больных включала 366 лиц русского происхождения (возраст 41 ± 5 лет) с верифицированным сахарным диабетом 1-го типа с различной манифестацией. Контрольная группа включала 526 здоровых индивидов, (пациенты ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва). Выборки были этнически однородны и составлены из рус-

ских (на основании паспортных данных), не являющихся родственниками.

Для исследования ассоциации полиморфных маркеров гена IL10 использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов венозной крови стандартным методом с использованием фенол-хлороформной очистки. Определение генотипов полиморфных маркеров гена IL10 проводилось с помощью ПЦР «в реальном времени» на амплификаторе «Real-time CFX96 Touch» (Bio-Rad, США) в 25 мкл реакционной смеси с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS (Евроген, Россия) и уникальных праймеров и зондов (табл. 1). Обозначения полиморфных маркеров даны в соответствии с базой данных dbSNP [15].

Используемые в зондах флуоресцентные красители – FAM (карбоксифлуоресцеин) и HEX(VIC) (гексахлорофлуоресцеин), тушитель флуоресценции – BHQ-1.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием закона генетического равновесия Харди-Вайнберга для аутосомных признаков. Вся статистическая обработка результатов проводилась с помощью калькулятора для расчёта статистики, написанного в программе excel, в соответствии с формулами, предлагаемыми для расчета статистики согласно выбранному критерию. При сравнении частот встречаемости генотипов применяли критерий Пирсона. Комплексную оценку взаимосвязей между исследуемыми генотипами и риском заболевания проводили с помощью логистической регрессии, определяя отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал ($CI_{95\%}$), при значении $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В работе исследовано 3 полиморфных маркера *rs1800872*, *rs1800896* и *rs3024505* гена IL10 с риском развития СД типа 1. Результаты распределения частот ал-

Таблица 1

Праймеры и зонды

Локус	Праймеры/зонды	Температура отжига
<i>rs1800872*</i>	F: ACAATCCAAGACAACACTACTAAG	60°
	R: ATGAATACCCAAGACTTCTCCTTGCTA	
	VIC/FAM: CCTACAG[G/T]ACAGGCG	
<i>rs1800896*</i>	F: ACAATCCAAGACAACACTACTAAG	60°
	R: ATGAATACCCAAGACTTCTCCTTGCTA	
	VIC/FAM: CTTCCCC[T/C]TCCCAAAG	
<i>rs3024505**</i>	F: ATTTGCTTATTTCAACTCTGTTGG	60°
	R: AATGAATTCTGCATTTTCAGAGAAAG	
	VIC/FAM: GTGAGGG[G/A]GACTAGTGT	

Примечание. *Праймеры и зонды взяты из: [16]. **Праймеры и зонды взяты из: [17].

Распределение частот исследованных полиморфных маркеров гена IL10

rs1800872						
Аллель и генотип	Частота		χ^2	p	OR	
	случай	контроль			знач.	CI _{95%}
Аллель G	0.779	0.816	1.84	0.175	0.80	0.57-1.11
Аллель T	0.222	0.184			1.25	0.90-1.75
GG	0.618	0.674	3.51	0.173	0.79	0.63-1.00
GT	0.321	0.284			1.04	0.86-1.27
TT	0.061	0.042			1.26	1.00-1.59
rs1800896						
Аллель и генотип	Частота		χ^2	p	OR	
	случай	контроль			знач.	CI _{95%}
Аллель T	0.467	0.566	8.21	0.004	0.67	0.52-0.88
Аллель C	0.534	0.435			1.48	1.13-1.93
TT	0.234	0.344	15.52	0.0004	0.67	0.56-0.81
TC	0.466	0.443			0.87	0.72-1.06
CC	0.301	0.213			1.48	1.23-1.79
rs3024505						
Аллель и генотип	Частота		χ^2	p	OR	
	случай	контроль			знач.	CI _{95%}
Аллель G	0.853	0.883	1.68	0.195	0.77	0.52-1.14
Аллель A	0.148	0.118			1.30	0.88-1.92
GG	0.724	0.776	3.45	0.179	0.77	0.59-1.02
GA	0.257	0.213			1.08	0.89-1.31
AA	0.019	0.011			1.30	0.98-1.71

лелей и генотипов этих полиморфных маркеров в контрольной группе и группе больных представлены в табл. 2.

Для полиморфных маркеров rs1800872 и rs3024505 гена IL10 статистически значимых ассоциаций с риском развития СД типа 1 выявлено не было.

В то же время нами выявлено статистически значимое увеличение частоты предрасполагающего генотипа CC полиморфного маркера rs1800896 гена IL10 в группе больных СД1 по сравнению с контрольной группой ($\chi^2=15.52$, $p=0,0004$). Следует подчеркнуть, что по данному полиморфному маркеру в мировой литературе опубликовано крайне мало печатных работ [18, 19]. Данный полиморфный вариант IL10 приводит к снижению синтеза цитокина, что ведет к снижению противовоспалительной активности [20]. Таким образом, наши результаты расширяют представления о роли изученных полиморфных маркеров в патогенезе СД типа 1.

Заключение

Современные способы исследования генома GWAS (Genome-wide association study) [21] позволили выявить множество новых генов, которые могут быть ассоциированы с СД 1 типа, в том числе и IL10. Полученные

данные об ассоциации полиморфного маркера rs1800896 с риском развития СД1 дополняют информацию о механизмах его возникновения. Раскрытие этих механизмов поможет понять основы патофизиологии СД1 и определить группы людей с высоким риском развития СД1 для проведения профилактических мероприятий. Разработка и внедрение в практику методов анализа полиморфных вариантов генов, используемых для диагностики СД типа 1, позволят выявить возможность развития этой болезни и/или её прогрессирование у пациентов с аутоиммунными заболеваниями или у людей, находящихся в группе риска.

Литература

(п.п. 1; 3; 4; 6-21 см. References)

2. Нелаева А.А., Хасанова Ю.В., Хоботова Е.С. Роль провоспалительных цитокинов в развитии и прогрессировании микро- и макроангиопатий у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2013; 19(3): 9-12.
5. Супрун Э.В., Терещенко С.В. Особенности антиоксидантного эффекта рецепторного антагониста интерлейкина-1 в условиях моделирования сахарного диабета. *Университетская наука: взгляд в будущее. Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 81-летию Курского государственного медицинского университета и 50-летию фармацевтического факультета*. В 3-х томах. 2016: 393-7.

References

- DiMeglio L.A., Evans-Molina C., Oram R.A. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018; 391(10138): 2449-62. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5
- Nelaeva A.A., Khasanova Yu.V., Khobotova E.S. Role of proinflammatory cytokines in the development and progression of micro- and macroangiopathies in patients with type 2 diabetes mellitus. *Angiologiya i sosudistaya khirurgiya*. 2013; 19(3): 9-13. PMID: 24300485. (in Russian)
- Urbanovych A.M., Suslyk H.I., Kozlovska Kh.Yu. Content of sP-selectin and Cytokines in Blood of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Arterial Hypertension Depending on Diabetes Compensation Condition. *International Journal of Chemistry*. 2016; 8(2): 123-8. DOI: 10.5539/ijc.v8n2p123
- Chen L., Deng H., Cui H., Fang J., Zuo Z., Deng J. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017; 9(6): 7204-18. doi: 10.18632/oncotarget.23208
- Suprun E.V., Tereshhenko S.V. *The antioxidant effect features of the interleukin-1 antagonist receptor in diabetes mellitus modeling. The University science: a view into the future. The content of the international scientific-practical conference devoted to the 81st anniversary of the Kursk State Medical University and the 50th anniversary of the Faculty of Pharmacy. In 3 volumes. [Osobennosti antioksidantnogo effekta retseptornogo antagonista interleukina-1 v usloviyakh modelirovaniya sakharnogo diabeta. Universitetskaya nauka: vzglyad v budushchee. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 81-letiyu Kurskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta i 50-letiyu farmatsevticheskogo fakul'teta]. Kursk; 2016: 393-7. (in Russian)*
- Akdis M., Aab A., Altunbulakli C., Azkur K., Costa R.A., Cramer R. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 138(4): 984-1010. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.033
- Blanter M., Sork H., Tuomela S., Flodström-Tullberg M. Genetic and Environmental Interaction in Type 1 Diabetes: a Relationship Between Genetic Risk Alleles and Molecular Traits of Enterovirus Infection? *Curr Diab Rep*. 2019; 19(9): 82. doi: 10.1007/s11892-019-1192-8
- Baxter A.G., Jordan M.A. From markers to molecular mechanisms: type 1 diabetes in the post-GWAS era. *Rev Diabet Stud*. 2012; 9(4): 201-23. doi: 10.1900/RDS.2012.9.201
- Shu Y., Chen Y., Luo H., Li H., Tang J., Liang Y. et al. The Roles of IL-10 Gene Polymorphisms in Diabetes Mellitus and Their Associated Complications: A Meta-Analysis. *Horm Metab Res*. 2018; 50(11): 811-5. doi: 10.1055/a-0651-5051
- Ying B., Shi Y., Pan X., Song X., Huang Z., Niu Q. et al. Association of polymorphisms in the human IL-10 and IL-18 genes with rheumatoid arthritis. *Mol. Biol. Rep*. 2011; 38(1): 379-85.
- Doecke J.D., Simms L.A., Zhao Z.Z., Huang N., Hanigan K., Krishnaprasad K. et al. Genetic susceptibility in IBD: overlap between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis*. 2013; 19: 240-5.
- Colafrancesco S., Ciccacci C., Priori R., Latini A., Picarelli G., Arienzo F. et al. STAT4, TRAF3IP2, IL10, and HCP5 Polymorphisms in Sjögren's Syndrome: Association with Disease Susceptibility and Clinical Aspects. *J Immunol Res*. 2019; 2019: 7682827. doi: 10.1155/2019/7682827
- Mijac D., Petrovic I.V., Djuranovic S., Perovic V., Bojic D., Culafic D. et al. The Polymorphism rs3024505 (C/T) Downstream of the IL10 Gene Is Associated with Crohn's Disease in Serbian Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Tohoku J Exp Med*. 2016; 240(1): 15-24. doi: 10.1620/tjem.240.15
- Andersen V., Ernst A., Christensen J., Østergaard M., Jacobsen B.A., Tjønneland A. et al. The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohn's disease in a Danish case-control study. *BMC Med Genet*. 2010; 11: e82. doi: 10.1186/1471-2350-11-82
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, Build 153, Released: July 9, 2019.
- Armingohar Z., Jørgensen J.J., Kristoffersen A.K., Schenck K., Dembic Z. Polymorphisms in the interleukin-10 gene and chronic periodontitis in patients with atherosclerotic and aortic aneurysmal vascular diseases. *Journal of Oral Microbiology*. 2015; 7:1, 26051. DOI: 10.3402/jom.v7.26051
- Franke A., Balschun T., Karlsen T.H., Sventoraityte J., Nikolaus S., Mayr G. et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet*. 2008; 40(11): 1319-23. doi: 10.1038/ng.221.
- Mohebbatikaljahi H., Menevse S., Yetkin I., Demirci H. Study of interleukin-10 promoter region polymorphisms (-1082A/G, -819T/C and -592A/C) in type 1 diabetes mellitus in Turkish population. *J Genet*. 2009; 88(2): 245-8.
- Reynier F., Cazalis M.A., Lecoq A., Paye M., Rosa A., Durand A. et al. Lack of association of IL-10 promoter gene variants with type 1 diabetes in a French population. *Hum Immunol*. 2006; 67(4-5): 311-7.
- Posadas-Sánchez R., Angeles-Martínez J., Pérez-Hernández N., Rodríguez-Pérez J.M., López-Bautista F., Flores-Domínguez C. et al. The IL-10-1082 (rs1800896) G allele is associated with a decreased risk of developing premature coronary artery disease and some IL-10 polymorphisms were associated with clinical and metabolic parameters. The GEAS study. *Cytokine*. 2018; 106: 12-8. doi: 10.1016/j.cyto.2018.02.028
- Gao P., Uzun Y., He B., Salamati S.E., Coffey J.K.M., Tsalikian E., Tan K. Risk variants disrupting enhancers of TH1 and TREG cells in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116(15): 7581-90. doi: 10.1073/pnas.1815336116

Сведения об авторах:

Иванова Наталья Анатольевна, мл. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Бурденный Алексей Михайлович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; ФГБНУ «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН;

Логинов Виталий Игоревич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» РАН;

Кураева Тамара Леонидовна, доктор мед. наук, проф., руководитель отд-ния сахарного диабета детей и подростков ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России;

Носиков Валерий Вячеславович, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. постгеномных молекулярно-генетических исследований ФГБНУ «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.5-002

Демяшкин Г.А.¹, Шаповалова Е.Ю.², Маланичев М.Ю.^{2,3}, Погосян Д.А.^{2,3}, Батов М.А.⁴, Зорин И.А.¹, Щекин В.И.¹

Молекулярно-биологическая характеристика промежуточных филаментов кератиноцитов интактной кожи в условии системного воспаления

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет),

119048, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8/2;

²ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского», 295051, г. Симферополь, Россия, бульвар Ленина, д. 5/7;

³Клиника пластической хирургии и косметологии «Фрау Клиник»,

111116, г. Москва, Россия, Лефортовский вал, д. 5, стр. 7;

⁴ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России; 117997, г. Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Введение. Несмотря на определенный прогресс в изучении патоморфологических механизмов сепсиса и усовершенствовании методов терапии критических состояний, летальность при сепсисе сохраняется на высоком уровне. При тяжелом системном воспалении нарушается морфофункциональное состояние кожного покрова, однако обуславливающие этот эффект механизмы описаны поверхностно. Нуждается в уточнении роль изменения экспрессии генов кератиноцитов цитоскелета, приводящая к нарушению их дифференцировки и миграции на фоне действия эндогенного фактора, индуцированного тяжелым системным воспалением.

Цель работы – оценка молекулярно-генетического профиля дифференцировки и миграции кератиноцитов на фоне системного воспаления.

Методика. Фрагменты интактной кожи пациентов с подтвержденным сепсисом ($n=46$) были изучены методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для определения экспрессии генов промежуточных филаментов кератиноцитов *KRT1*, *KRT10*, *KRT5*, *KRT14* и *KRT16*.

Результаты. У пациентов в условии системного воспаления относительная экспрессия *KRT1*, *KRT10*, *KRT5*, *KRT14* и *KRT16* в интактной коже снижена, несмотря на сохранение уровня экспрессии генов, продукты которых поддерживают агрегацию филаментов и стабильность цитоскелета – *FLG*, *IVL*.

Заключение. В интактной коже на фоне системного воспаления в отсутствие внешнего повреждающего фактора отмечается разобщение дифференцировки и пролиферации кератиноцитов, способное привести к нарушению барьерной функции кожи.

Ключевые слова: сепсис; кератиноциты; *KRT1*; *KRT10*; *KRT5*; *KRT14*; *KRT16*.

Для цитирования: Демяшкин Г.А., Шаповалова Е.Ю., Маланичев М.Ю., Погосян Д.А., Батов М.А., Зорин И.А., Щекин В.И. Молекулярно-биологическая характеристика промежуточных филаментов кератиноцитов интактной кожи в условии системного воспаления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(3): 34-39.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.34-39

Для корреспонденции: Демяшкин Григорий Александрович, e-mail: dr.dga@mail.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Демяшкин Г.А., Шаповалова Е.Ю.; сбор и обработка материала – Маланичев М.Ю., Погосян Д.А., Зорин И.А., Щекин В.И.; статистическая обработка – Маланичев М.Ю., Погосян Д.А., Батов М.А.; написания текста – Батов М.А., Зорин И.А., Щекин В.И.; редактирование – Демяшкин Г.А., Шаповалова Е.Ю. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.05.2020

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Demyashkin G.A.¹, Shapovalova E.Yu.², Malanichev M.Yu.^{2,3}, Pogosyan D.A.^{2,3}, Batov M.A.⁴, Zorin I.A.¹, Shchekin V.I.¹**Molecular and biological characteristics of keratin intermediate filaments in intact skin under systemic inflammation**¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,
Moscow, Russia;²S.I. Georgievsky Medical Academy of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University,
Simferopol, Russia;³Clinic of Plastic Surgery and Cosmetology «Frau Klinik»,
Moscow, Russia;⁴N.I. Pirogov Russian National Research Medical University,
Moscow, Russia

Introduction. Despite some progress in studying pathomorphological mechanisms of sepsis and improvement of therapy for critical conditions, mortality in sepsis remains high. In severe systemic inflammation, the morpho-functional state of skin is compromised; however, the mechanisms responsible for this effect are not completely understood. The role of mutations in keratinocyte cytoskeletal genes leading to disorders of keratinocyte differentiation and migration under the action of an endogenous factor induced by severe systemic inflammation, needs to be clarified.

The aim of this work was to assess the molecular genetic profile of keratinocyte differentiation and migration under systemic inflammation.

Methods. Fragments of intact skin from patients with confirmed sepsis (n=46) were studied with real-time polymerase chain reaction to determine the expression of keratin intermediate filament *KRT1*, *KRT10*, *KRT5*, *KRT14*, and *KRT16* genes.

Results. In patients with systemic inflammation, the relative expression of *KRT1*, *KRT10*, *KRT5*, *KRT14*, and *KRT16* in intact skin was reduced, despite the normal expression of genes whose products support filament aggregation and cytoskeletal stability (*FLG* and *IVL*).

Conclusion. In the intact skin under systemic inflammation in the absence of an external damaging factor, uncoupling of the keratinocyte differentiation from the keratinocyte proliferation was observed, which may lead to dysfunction of the skin barrier.

Keywords: sepsis; keratinocytes; *KRT1*; *KRT10*; *KRT5*; *KRT14*; *KRT16*.

For citation: Demyashkin G.A., Shapovalova E.Yu., Malanichev M.Yu., Pogosyan D.A., Batov M.A., Zorin I.A., Shchekin V.I. Molecular and biological characteristics of keratin intermediate filaments in intact skin under systemic inflammation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 34-39. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.34-39

For correspondence: **Grigory Demyashkin**, PhD, MD; ass. professor of the Department of Pathology of Sechenov University (Moscow, Russia). 119048, Moscow, st. Trubetskaya, 8, e-mail: dr.dga@mail.ru

Contribution. The concept and design of the study – Demyashkin G.A., Shapovalova E.Yu.; collection and processing of material – Malanichev M.Yu., Pogosyan D.A., Zorin I.A., Shchekin V.I.; statistical processing – Malanichev M.Yu., Pogosyan D.A., Batov M.A.; text writing – Batov M.A., Zorin I.A., Shchekin V.I.; editing – Demyashkin G.A., Shapovalova E.Yu. Approval of the final version of the article, responsibility of the integrity of all parts of the article – all co-authors.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:Demyashkin G., <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>Shapovalova Ye., <http://orcid.org/0000-0003-2544-7696>Malanichev M., <https://orcid.org/0000-0003-3043-2739>Pogosyan D., <https://orcid.org/0000-0003-3304-0968>Batov M., <https://orcid.org/0000-0002-3780-4358>Zorin I., <https://orcid.org/0000-0002-1621-7015>Shchekin I., <https://orcid.org/0000-0003-3763-7454>

Received 13.05.2020

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Сепсис остается одной из ведущих причин смерти среди пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии. Несмотря на определенный прогресс в изучении патогенеза сепсиса и усовершенствовании

методов терапии критических состояний, летальность при сепсисе сохраняется на высоком уровне – 30–90% [1-3]. В отечественных и зарубежных клинико-эпидемиологических исследованиях сообщается о влиянии

значительного количества факторов на течение и исходы сепсиса [3-5].

При тяжелом системном воспалении происходят дистрофические и некротические изменения внутренних органов. В том числе нарушается морфофункциональное состояние кожного покрова, однако обуславливающие этот эффект механизмы описаны поверхностно. У пациентов с тяжелым сепсисом часто обнаруживают различные формы поражения интактных кожных покровов вне инфекционного очага (формирование пролежней, гематом или серозных пузырей) [5-7].

Стабильность, дифференцировка и миграция кератиноцитов является одной из главных составляющих гомеостаза эпидермиса. Механическая целостность и прочность кератиноцитов напрямую зависят от состояния цитоскелета, образованного актиновыми микрофиламентами, промежуточными филаментами и микротрубочками. Каждая филаментная система построена из определенных белков, кодируемых соответствующими семействами генов. Так, промежуточные филаменты построены по меньшей мере 60 различными белками, наиболее распространенным из которых является кератин, кодируемый мультигенным семейством. Номенклатура генов и белков включает 28 кератинов I типа (*K9, K10, K12 – K20, K23 – K28, K31 – K40*) и 26 II типа (*K1 – K8; K71 – K86*), которые вместе образуют два кластера из 27 генов каждый. В геноме человека гены, кодирующие кератины I и II типов, в основном сгруппированы в двух разных локусах в хромосомных областях *17q12-q21* и *12q11-q13* соответственно [8, 9]. Мутации в этих генах, в частности *K1* и *K10*, могут приводить к нарушению целостности кератиноцитов, повреждая защитный барьер, что увеличивает риск бактериальных кожных инфекций. При этом, нельзя исключить, что подобное изменение экспрессии генов, приводящее к нарушению дифференцировки и миграции кератиноцитов, может возникать в интактной коже на фоне действия эндогенного фактора, индуцированного тяжелым системным воспалением. Данная гипотеза нуждается в уточнении для понимания механизмов сепсиса.

Цель исследования – оценка молекулярно-генетического профиля дифференцировки и миграции кератиноцитов на фоне системного воспаления.

Методика

На основании анамнестических, клинических и морфологических данных были сформированы две группы: 1-я группа ($n = 46$) – аутопсийный материал кожи пациентов с установленным патолого-анатоми-

ческим диагнозом: тяжелый бактериальный сепсис, синдром полиорганной недостаточности согласно консенсусу ACCP/SCCM. Критерии включения: возрастной интервал 18 – 45 лет, клинически и морфологически верифицированные признаки гипоперфузии внутренних органов, повышение сывороточного лактата выше 4 ммоль/л, олигурия, нарушение сознания. 2-я группа (контрольная; $n = 10$) – аутопсийный материал кожи пациентов, умерших по причинам, не связанным с инфекционным заболеванием. Критерии исключения: беременность, установленное онкологическое заболевание, нозокомиальная этиология сепсиса, наследственные и приобретенные заболевания с поражением кожи и/или соединительной ткани (синдром Марфана, синдром Элерса–Данлоса, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, дерматомиозит, склеродермия, анкилозирующий спондилит, псориаз, фолликулярный гиперкератоз), хроническое заболевание печени, хроническая почечная недостаточность, иммуносупрессивная и гормональная терапия, патология системы гемостаза в анамнезе.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Выделение тотальной РНК производили из полученных фрагментов кожи пациентов с использованием готового реагента Trizol (Invitrogen, США). Синтез комплементарной ДНК (кДНК) с матрицы изолированной РНК осуществляли с помощью набора SuperScript™ VIL0™ master mix (Invitrogen, США). Выделенные кДНК подверглись ПЦР-РВ с использованием готовой смеси реагентов Absolute blue QPCR mix (Thermo scientific, США) с флуоресцентным красителем SYBR green I. ПЦР-РВ проводилась с использованием StepOne System (Applied Biosystems, США) и штатного программного обеспечения. Анализ экспрессии генов проведен с использованием метода определения порогового цикла (ΔCt) и вычисления относительной экспрессии генов согласно протоколу [11]. Нормирование и внутренний контроль выполнены относительно гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Статистический контроль проводился относительно контрольной группы. Подбор праймеров был осуществлён на основании общедоступных материалов о последовательностях ДНК и мРНК генов в базе данных NCBI с использованием программы Primer-BLAST.

Изучаемые гены кератиноцитов у пациентов на фоне системного воспаления: *KRT1, KRT5, KRT6A, KRT10, KRT14, KRT16, FLG, IVL*.

Результаты

Для исследования экспрессии целевых генов нормализованные уровни мРНК, измеренные в образцах

интактной кожи пациентов с тяжелым системным воспалением (1-я группа), сравнивали с образцами кожи, полученными в контрольной группе.

Несмотря на расположение генов *KRT1* и *KRT10* на разных хромосомах их экспрессия скоординирована. В ходе терминальной дифференцировки кератиноцитов продукты генов образуют белковый димер *KRT1/10* с формированием промежуточных филаментов. Аналогичный признак справедлив для экспрессии *KRT5* и *KRT14*, а также для *KRT16* и *KRT6A/KRT6B*.

В ходе анализа результатов ПЦР-РВ *KRT1*, *KRT10*, *KRT5* и *KRT14* показали схожие паттерны экспрессии нормализованные по *GAPDH*. Однако относительная экспрессия *KRT10* и *KRT14* была выше *KRT1* и *KRT5* в исследуемых группах соответственно (рис. 1).

Уровни экспрессии *KRT1* и *KRT10* статистически значимо отличались между группами сепсиса и контроля ($p=0.003$). Отмечали снижение относительной экспрессии *KRT1* и *KRT10* в образцах кожи пациентов в условиях системного воспаления по сравнению с контролем — 4.12 ± 0.73 vs 6.54 ± 0.89 и 5.23 ± 0.96 vs 8.12 ± 0.37 , $p < 0.01$ соответственно. Относительная экспрессия *KRT5* и *KRT14* также была ниже в экспериментальной группе по сравнению с контролем — 2.34 ± 0.94 vs 5.71 ± 0.87 и 3.32 ± 0.96 vs 7.31 ± 0.96 , $p < 0.01$ соответственно (рис. 2).

Несмотря на более низкий уровень экспрессии *KRT16* в 1-й группе по сравнению с 2-й (1.34 ± 0.15 vs 2.15 ± 0.47 , $p < 0.01$), экспрессия *KRT6A* статистически значимо не отличалась между исследуемыми группами, однако наиболее низкая экспрессия была определена в группе пациентов сепсисом — 0.87 ± 0.11 , $p < 0.01$.

Вместе с тем результаты, указывающие на изменение профиля экспрессии кератиноцитов, не коррелируют с изменением экспрессии генов, продукты которых непосредственно задействованы в организации и поддержании барьерной функции эпидермиса. Различия в экспрессии *FLG*, *IVL* не имели статистической значимости между группами контроля и пациентов с сепсисом, что, возможно, обусловлено высокой степенью базовой экспрессии вне зависимости от состояния макроорганизма (рис. 3).

Обсуждение

Кератиновые промежуточные филаменты (КПФ) являются наиболее распространенными среди элементов цитоскелета кератиноцитов, образующих эпидермис. Они образуют плотную, трехмерную транссклеточную и высокодинамичную сеть, охватывающую ядро, простирающуюся до периферии клетки, где они закрепляются и взаимодействуют с десмосомами и другими адгезионными комплексами [5, 12, 13].

Частичная или полная дезорганизация элементов цитоскелета, приводящая к нарушению целостности кератиноцитов и снижению барьерной функции эпидермиса, может быть результатом мутаций определенных генов, ответственных за сборку КПФ. Эпидермальные гены кератина I типа, например *KRT1*, *KRT2* и *KRT5* содержат по 9 экзонов каждый, а гены, кодирующие эпидермальные кератины II типа, например *KRT10* и *KRT14*, состоят из 8 экзонов [9].

Сравнивая полученные в ходе настоящего исследования результаты с литературными данными об ответных реакциях кожи на повреждение, физиологическое повышение уровня *KRT14* и *KRT5* при поражении

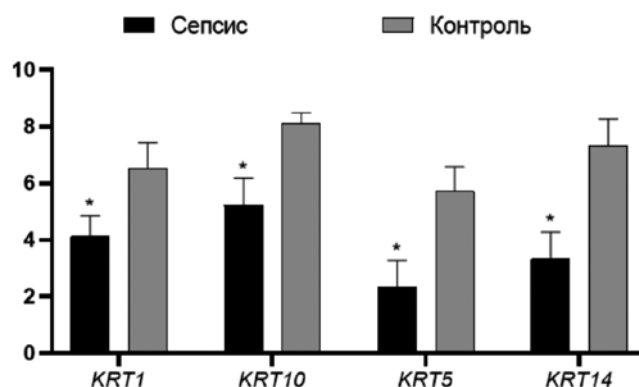


Рис. 1. Экспрессия генов кератиноцитарного профиля димеров *KRT1/10* и *KRT5/14* в интактной коже пациентов с сепсисом по сравнению с контрольной группой. По вертикали: нормализованный уровень относительной экспрессии мРНК, усл. ед.

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0.01$.

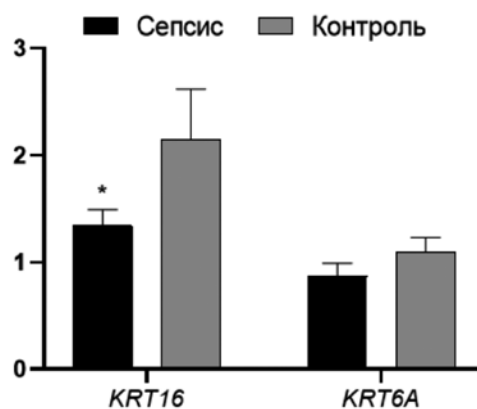


Рис. 2. Экспрессия генов кератиноцитарного профиля димеров *KRT16/6A* в интактной коже пациентов с сепсисом по сравнению с контрольной группой. По вертикали: нормализованный уровень относительной экспрессии мРНК, усл. ед.

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0.01$.

кожных покровов может быть ограничено или вовсе отсутствовать в условиях сепсиса.

По нашим данным, экспрессия генов кератиноцитарного профиля интактной кожи снижена у пациентов с системным воспалением по сравнению с образцами контрольной группы. В основе обнаруженных признаков может лежать следующий каскад биохимических реакций.

На фоне системного воспаления происходит избыточная активация Т-хелперов, продуцирующих различные интерлейкины, в первую очередь IL4 или IL13 [14, 15]. Последние снижают экспрессию мРНК *KRT1*, *KRT10* и других генов, кодирующих структурные компоненты кератиноцитов на ранних стадиях, уменьшая когезивность рогового слоя и экспрессию *DSG1* [12]. Снижение или отсутствие филагрина, лорикрина и инволюкрина (экспрессии *FLG* и *IVL*) приводит к нарушению барьера и, следовательно, снижает воспалительный порог для местных раздражителей и гаптенов, что в свою очередь влияет на пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов.

Таким образом, исследование прямо продемонстрировало, что действие эндогенного фактора, индуцированного системным воспалением, способно приводить к нарушению защитного барьера эпидермиса. Наши результаты будут полезны для понимания механизмов появления кожных осложнений при сепсисе.

Заключение

У пациентов в условии системного воспаления относительная экспрессия *KRT1*, *KRT10*, *KRT5*, *KRT14* и *KRT16* в интактной коже снижена, что характеризует разобщение процессов дифференцировки и пролифе-

рации кератиноцитов и способно привести к нарушению барьерной функции кожи в отсутствие внешнего повреждающего фактора, несмотря на сохранение уровня экспрессии генов, продукты которых поддерживают агрегацию филаментов и стабильность цитоскелета — *FLG*, *IVL*.

Литература

(п.п. 1; 2; 4-15 см. References)

3. Сажин В.П., Карсанов А.М., Кульчиев А.А., Ремизов О.В., Маскин С.С., Юдин В.А. Реальность и перспективы изучения эпидемиологии сепсиса. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2018; (8): 85-9. DOI: 10.17116/hirurgia2018885

References

1. Fleischmann C., Thomas-Rueddel D.O., Hartmann M., Hartog C.S., Welte T., Heublein S. et al. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2016; 113(10): 159-66. doi:10.3238/arztebl.2016.0159
2. Fedeli U., Piccinni P., Schievano E., Saugo M., Pellizzer G. Growing burden of sepsis-related mortality in northeastern Italy: a multiple causes of death analysis. *BMC infectious diseases*. 2016; 16, 330. doi: 10.1186/s12879-016-1664-2
3. Sazhin V.P., Karsanov A.M., Kulchiev A.A., Remizov O.V., Maskin S.S., Yudin V.A. Reality and prospects of sepsis epidemiology research. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova*. 2018; (8): 85-9. doi: 10.17116/hirurgia2018885. (in Russian)
4. SepNet Critical Care Trials Group (2016). Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive care medicine*. 2016; 42(12): 1980-9. doi: 10.1007/s00134-016-4504-3
5. Compton F., Hoffmann F., Hortic T., Strauss M., Frey J., Zidek W. et al. Pressure ulcer predictors in ICU patients: nursing skin assessment versus objective parameters. *J Wound Care*. 2008; 17: 417-20, 422-4.
6. Coleman S., Gorecki C., Nelson E.A., Closs S.J., Defloor T., Halfens R. et al. Patient risk factors for pressure ulcer development: Systematic review. *Int J Nurs Stud*. 2013; 50: 974-1003.
7. Hattori Y., Hattori K., Suzuki T., Matsuda N. Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges. *Pharmacology & therapeutics*. 2017; 177: 56-66. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.040
8. Zhang L.-J. *Keratins in Skin Epidermal Development and Diseases*. In: Blumenberg M., editor. Keratin. Volume 79050. IntechOpen; London, UK: 2018. pp. 1-17.
9. Jacob J.T., Coulombe P.A., Kwan R., Omary M.B. Types I and II Keratin Intermediate Filaments. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2018; 10 doi: 10.1101/cshperspect.a018275
10. Seymour C.W., Liu V.X., Iwashyna T.J. et al., Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8): 762-74.
11. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3(6): 1101-8. doi:10.1038/nprot.2008.73

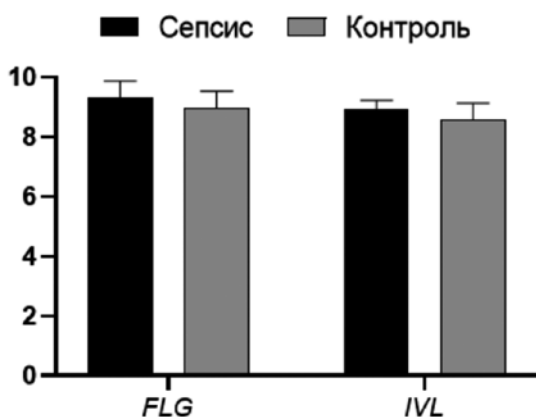


Рис. 3. Экспрессия *FLG*, *IVL* в интактной коже пациентов с сепсисом по сравнению с контрольной группой. По вертикали: нормализованный уровень относительной экспрессии мРНК, усл. ед.

12. Zhang X., Yin M., Zhang L.J. Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells*. 2019; 8(8): 807. Published 2019 Aug 1. doi:10.3390/cells8080807
13. Lessard J.C., Piña-Paz S., Rotty J.D. et al. Keratin 16 regulates innate immunity in response to epidermal barrier breach. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(48): 19537-42. doi:10.1073/pnas.1309576110
14. Omori-Miyake M., Yamashita M., Tsunemi Y., Kawashima M., Yag J. In Vitro Assessment of IL-4- or IL-13-Mediated Changes in the Structural Components of Keratinocytes in Mice and Humans. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014; 134, 1342–50. doi:10.1038/jid.2013.503
15. Hobbs R.P., Lessard J.C., Coulombe P.A. Keratin intermediate filament proteins—novel regulators of inflammation and immunity in skin. *J. Cell Sci*. 2012; 125: 5257–8. doi: 10.1242/jcs.122929

Сведения об авторах:

Демяшкин Григорий Александрович, канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет);

Шаповалова Елена Юрьевна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского;

Маланичев Михаил Юрьевич, аспирант каф. гистологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского; врач-хирург;

Погосян Давид Ашотович, аспирант каф. гистологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского; врач-хирург;

Батов Максим Александрович, Институт клинической медицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова;

Зорин Илья Алексеевич, Институт клинической медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет);

Щекин Владимир Иванович, Институт клинической медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Морозов С.Г.¹, Копасов А.Е.^{1,2}

Киназа mTOR и ассоциированные с нею белки в клетках кожи, выделенных при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением

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

²ООО «Фрау Клиник 1»,
129110, г. Москва, Россия, Гиляровского ул., д. 55

Цель работы – измерение уровня белков, ассоциированных с сигнальными путями киназы mTOR (mTOR, Raptor, Rictor, 4E-BP1 p70-S6K1, AKT) в клетках кожи выделенных при операции абдоминопластики у пациенток с нормальной массой тела и ожирением. Основное значение исследования – установление участия сигнальных путей киназы mTOR в патогенетических процессах при ожирении и их роли в развитии послеоперационных осложнений при операции абдоминопластики.

Методика. Клетки кожи выделяли из операционного материала ферментативной обработкой, затем восстанавливали в полной среде, после чего проводили иммунотипирование маркеров рецепторов и внутриклеточных белков моноклональными антителами мечеными флуоресцентными красителями. Интенсивность флуоресценции анализировали на проточном цитометре.

Результаты. Проведено сравнение уровня белков, связанных с сигнальными путями киназы mTOR, в выделенных после абдоминопластики клетках кожи при ожирении и нормальной массе тела. Было установлено повышение уровня белков, ассоциированных с киназой mTOR, в клетках кожи пациенток с ожирением. Показано при ожирении преимущественное участие первого комплекса mTORC1 в активации клеток. Установлено повышение активности вторичных мессенджеров киназы mTOR – фактора 4E-BP1 и рибосомальной киназы p70-S6K1, передающих сигналы на рибосомы для синтеза белка в фибробластах и кератиноцитах кожи пациенток с ожирением после абдоминопластики.

Заключение. Полученные данные отражают патогенетические особенности ожирения, что может иметь значение в развитии послеоперационных осложнений, наблюдаемых у пациенток с ожирением после абдоминопластики.

Ключевые слова: киназа mTOR; клетки кожи; абдоминопластика; ожирение; послеоперационные осложнения.

Для цитирования: Морозов С.Г., Копасов А.Е. Киназа mTOR и ассоциированные с нею белки в клетках кожи, выделенных при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3):40-46.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.40-46

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

Участие авторов: составление дизайна исследования, работа с литературой, статистическая обработка результатов, написание раздела статьи – Морозов С.Г.; получение клеток для анализа, обработка клинического материала, обработка клеток антителами, работа на проточном цитометре, написание разделов статьи – Копасов А.Е.; редактирование – Морозов С.Г. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.04.2020

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Morozov S.G.¹, Kopasov A.E.^{1,2}

The mTOR kinase and its associated proteins in skin cells isolated during abdominoplasty in patients with normal body weight and obesity

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

²Frau Klinik 1,
Gilyarovskogo Str. 55, Moscow 129110, Russia

Aim. To measure expression of kinase mTOR-associated proteins (mTOR, Raptor, Rictor, 4E-BP1 p70-S6K1, AKT) in skin cells isolated from patients with normal body weight and obesity after abdominoplasty. The importance of this study was in determining the role of mTOR kinase signaling pathways in the pathogenesis of obesity and obesity-associated complications after abdominal surgery.

Methods. Skin cells were isolated from surgical material by enzymic treatment, restored in a complete medium, and then stained with monoclonal antibodies to receptors and intracellular proteins. The fluorescence intensity was analyzed with a flow cytometer.

Results. Expression of proteins associated with mTOR kinase signaling pathways was compared in isolated skin cells from patients with obesity and normal body weight. Increased mTOR protein expression was found to be associated with obesity. The first mTORC1 complex primarily contributed to the activation of skin cells from obese patients after abdominoplasty. Activities of mTOR second messengers, 4E-BP1 kinase and ribosomal kinase p70-S6K1, which transmit signals to ribosomes for protein synthesis, were elevated in skin fibroblasts and keratinocytes of patients with obesity after abdominoplasty.

Conclusion. Results of this study delineated features of the pathogenesis of obesity that may be related with postoperative complications of abdominoplasty typical for obese patients.

Keywords: kinase mTOR; skin cells; abdominoplasty; obesity; postoperative complications.

For citation: Morozov S.G., Kopasov A.E. The mTOR kinase and its associated proteins in skin cells isolated during abdominoplasty in patients with normal body weight and obesity. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal)*. 2020; 64(3): 40-46. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.40-46

For correspondence: *Morozov Sergey Georgievich*, Prof. Dr. Director (Institute of General pathology & Pathophysiology), e-mail: sergey_morozov@list.ru

Contribution: research concept and design, work with literature, writing section of the article, statistical processing of results – Morozov S.G.; obtaining cells for analysis, processing clinical material, processing cells with antibodies, working on a flow cytometer, writing sections of the article – Kopasov A.E.

Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgments. The study has no sponsorships.

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

Information about the authors:

Kopasov A.E., <https://orcid.org/0000-0003-0078-7483>

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

Received 06.04.2020

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Киназа mTOR (mammalian Target of Rapamycin) обнаружена во всех известных типах клеток и имеет высокий процент гомологии. В настоящее время она считается ключевым регулятором процессов в клетках, так как сигналы от рецепторов на плазматической мембране пересекаются с сигнальными путями киназы mTOR и ассоциированы с основными функциями клетки, с её метаболизмом, обменом белка, дифференцировкой, пролиферацией, аутофагией, апоптозом и т.д. Сама киназа mTOR способна создавать индуцибельные комплексы, состоящие из нескольких белков, передающих сигналы на вторичные мессенджеры в зависимости от активации рецепторов ростовых факторов, аминокислот, инсулина, а также при появлении признаков стресса, гипоксии или других патологических состояний клетки [1], т. е., роль этих индуцибельных комплексов заключается в персонализации проведения сигнала на рибосомы, митохондрии, лизосомы и структурные элементы клетки. В цитозоле клеток млекопитающих киназа mTOR собирает 2 комплекса – mTORC1 и mTORC2; также известно, что она может образовывать комплексы на митохондриях и других органеллах. В mTORC1 основным сигнальным белком является Raptor (Regu-

latory Associated Protein of mTOR), который отвечает за субстратную специфичность и каталитическую активность всего комплекса mTORC1. В комплексе mTORC2 эту функцию выполняет белок Rictor (Raptor-Independent Companion of mTOR). Кроме того, оба комплекса имеют общую сигнализацию, координирующую их действия [2].

Сигнальные пути хемокинов в клетках кожи сопряжены с киназой mTOR, например, связывание хемокином CXCL12 его рецептора CXCR4 приводит к активации киназы mTOR [3]. Сигнальный путь CXCL12/CXCR4 повышает уровень фосфорилирования киназы mTOR, а также способствует эпителиально-мезенхимальному переходу клеток [4]. Хемокин CXCL12 также регулирует аутофагию и повышает уровень маркера аутофагии LC3II/I, что также является mTOR-зависимым процессом [5]. Аутофагия призвана адаптировать клетки к стрессу. В выделенных гипертрофированных зрелых адипоцитах повышено число аутофагосом, повышена экспрессия PERK и IRE1 и снижен уровень фосфорилирования eIF2 α , ATF4, CHOP и JNK. Ингибитор киназы mTOR рапамицин способствует ослаблению повреждающего действия стресса в адипоцитах [6].

В клетках кожи дифференцировка, пролиферация, активация, аутофагия и апоптоз зависят от активности киназы mTOR. Комплексы mTORC1 и mTORC2 регулируют морфогенез кожи и формирование эпидермального барьера [7]. В клетках эпителия mTORC1 регулирует процессы пролиферации, миграции и скорость заживления ран. В фибробластах кожи активация комплекса mTORC1 ускоряет их пролиферацию, секрецию белков внеклеточного матрикса (extracellular matrix, ECM), актина, коллагена и др., что приводит к образованию соединительной ткани. Сам процесс заживления ран требует участия множества ростовых факторов, цитокинов, хемокинов. Специфический ингибитор mTOR рапамицин препятствует фиброзным изменениям в коже [8].

Синтез хемокинов в кератиноцитах ускоряется под воздействием провоспалительных цитокинов, в том числе фактора некроза опухолей альфа (TNF α) и интерферона гамма (IFN- γ) [9]. TNF α стимулирует секрецию хемокина CXCL8 кератиноцитами кожи через активацию сигнального пути киназы mTOR [10]. Связывание TNF α с его рецептором TNFR1 сопряжено с повышением активности хемокина CXCL1 и соответственно миграцией нейтрофилов в ткани, в том числе в жировую ткань [11]. Сигнальный путь mTORC1 регулирует продукцию провоспалительных цитокинов CCL5 и CXCL10 макрофагами, в том числе путем селективного контроля на уровне вторичного мессенджера киназы mTOR – 4E-BP1/2 (eIF4E-binding proteins 1 и 2). Дефицитные по 4E-BP1/2 макрофаги продуцируют более высокий уровень CCL5 и CXCL10 при стимуляции бактериальным липополисахаридом, что является хемоаттрактантом для активированных T-клеток [12].

Всё указанное выше важно для понимания процессов, происходящих в коже при проведении операции абдоминопластики, особенно при наличии ожирения. Ожирение обуславливает развитие стресса, воспаления, что приводит к дисфункции адипоцитов. Ранее было показано, что ожирение оказывает негативное влияние на продукцию клетками кожи и подкожно-жировой ткани провоспалительных цитокинов и хемокинов [13–17]. Воспаление в жировой ткани сопряжено с активацией сигнального пути киназы mTORC1. Рапамицин способствует развитию воспаления в жировой ткани, увеличению количества M1 макрофагов и активированных T-клеток, а также повышению уровня провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6 и MCP-1. Фармакологическое ингибирование mTORC1 индуцирует фосфорилирование NF- κ B p65 и спонтанную поляризацию макрофагов в M1-фенотип [18]. Ингибирование киназы mTOR нарушает поляризацию M2-макрофагов и повы-

шает поляризацию их в M1-фенотип, что отражается на воспалительных процессах в тканях [19].

Цель работы – определение уровня белков, ассоциированных с сигнальными путями киназы mTOR в клетках кожи, выделенных из операционного материала при проведении операции абдоминопластики у пациентов с нормальной массой тела и ожирением.

Методика

Контингент обследуемых. Биологический материал получен от 92 пациенток в возрасте 18–56 лет, которым в клинике пластической и эстетической хирургии ООО «Фрау Клиник 1» была проведена операция абдоминопластики. Исследование выполнено по международным правилам работы с биологическим материалом человека. Пациентки добровольно подписывали информированное согласие. Критерии исключения из исследования: острые вирусные и бактериальные инфекции, системные, аллергические, воспалительные и онкологические заболевания.

Перед операцией все пациентки проходили стандартное обследование, которое включало определение биохимических показателей крови. Работу с кровью проводили в сертифицированной лаборатории согласно ГОСТам и международным правилам работы с биологическим материалом. Кровь из локтевой вены брали натощак в вакуумные контейнеры. Подсчет клеток крови проводили на гематологическом анализаторе Pentra Nexus HORIBA (Horiba ABX SAS, Франция). Биохимические показатели определяли на анализаторе Fuji Dri-Chem4000 (Fujifilm, Япония) [16]. Кроме того, использовали метод биоимпедансного анализа для установления основных показателей метаболизма, что было подробно отражено в нашей предыдущей работе [17]. Степень ожирения оценивали согласно международным критериям по индексу массы тела (ИМТ) в кг/м².

При проведении операции абдоминопластики удаленные излишки кожи сначала промывали стерильным физиологическим раствором, сразу иссекали необходимый объем тканей и переносили в стерильную пробирку со средой RPMI-1640 с 15 % эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и оставляли при температуре 4 °C до окончания операции. Затем в переносной холодильной камере материалы доставляли в лабораторию. Клетки кожи выделяли по методике, описанной ранее [17]. Для работы с клетками использовали среду RPMI-1640 (Flow) с 10мМ буфера Hepes (Sigma), 2мМ L-глутамин (Sigma) и ЭТС (Flow). Клетки отмывали в фосфатном буфере (PBS, Phosphate Buffered Saline, Sigma), затем к ним добавляли ЭДТА [10мМ] и буфер для удаления эритроцитов (Becton Dickinson,

США). Суспензию клеток отмывали дважды в полной среде RPMI-1640 с центрифугированием при 200 g. К осадку добавляли полную среду RPMI-1640 + 15% ЭТС, инкубировали при температуре 37 °С и 5% CO₂ 2 ч для восстановления клеток. Процент живых клеток определяли по окраске трипановым синим при световой микроскопии (обычно более 92% всех клеток) [17].

Для исследования экстраклеточных белков клетки отмывали в холодном PBS, доводили до концентрации 0,5×10⁶ клеток в 50 мкл и проводили иммунотипирование моноклональными антителами (mAb), напрямую меченными флуоресцентными красителями, т. е. добавляли 20 мкл mAb, инкубировали при 4 °С 40 мин, затем отмывали, осадок фиксировали в 2% параформальдегиде на PBS с 5% азидом натрия. Для определения уровня внутриклеточных белков клетки вначале фиксировали в 2% параформальдегиде на PBS в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего отмывали в PBS, доводили до концентрации 0,5×10⁶ клеток в 50 мкл и иммунотипировали по стандартной методике [16]. При определении фосфорилированных белков использовали соответствующие mAb к активированным клеткам. Фиксированные клетки иммунотипировали mAb, специфичными к киназе mTOR, Raptor, Rictor, 4E-BP1, p70-S6K1 и АКТ, напрямую меченными флуоресцентными красителями. После процедуры иммунотипирования клетки отмывали, снова фиксировали в 2% параформальдегиде на PBS и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) по программе SimulSet. В каждом образце анализировалось 20 тыс. событий. Интенсивность флуоресценции mAb, меченных FITC, определяли на канале FL1 при длине волны 530±5нм, флуоресценцию фикоэритрина (PE) измеряли на канале FL2 (585±5нм). Интенсивность флуоресценции приводили к внутреннему стандарту. В качестве негативного контроля регистрировали флуоресценцию F(ab')₂ фрагмента изотипспецифичных иммуноглобулинов, меченных соответствующим красителем без первичных mAb. Далее анализировали гистограмму, соответствующую распределению клеток на канале, по которой определяли процентное содержание антигенположительных клеток и интенсивность флуоресценции (mean) в условных единицах (у.е.), отражающую относительную плотность антигена на поверхности клетки или уровень включения флуоресцентной метки в клетку [16].

Результаты статистически обрабатывали по программе ANOVA. Сравнение между двумя группами проводили по критерию Стьюдента, данные представлены как $M \pm m$. Для анализа групп с малой выборкой использовали метод непараметрического анализа Нью-

мена–Кейлса. Статистически значимыми считали различия между группами при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Выделенные клетки кожи сначала анализировали по составу, для этого проводили первичный скрининг при прямом и боковом просвечивании лазером в системе координат на каналах FSC-A/SSC-A (Forward Scate Cells & Side Scate Cells). Получали примерно такое распределение клеток, как показано на **рис. 1**.

Далее в соответствующем гейте анализировали флуоресценцию рецепторов, специфичных для данных клеток. Затем на двух каналах FL1A и FL2A анализировали одновременно уровень рецепторов и внутриклеточных белков. Для определения процента клеток и интенсивности флуоресценции внутриклеточных белков клетки анализировали на одном из каналов в зависимости от использованного красителя. Пример гистограмм представлен на **рис. 2**.

В **табл. 1** представлены данные проточной цитометрии по интенсивности флуоресценции при иммунотипировании белков mTOR, Raptor, Rictor, 4E-BP1, рибосомальной киназы p70-S6K1 и киназы АКТ в суспензии клеток кожи, выделенных из операционного материала при абдоминопластике.

В данном исследовании установлено, что при ожирении в клетках кожи уровень белков Raptor и 4E-BP1 значимо выше ($p < 0,05$), чем у пациенток с нормальной массой тела. Это указывает на повышение активности

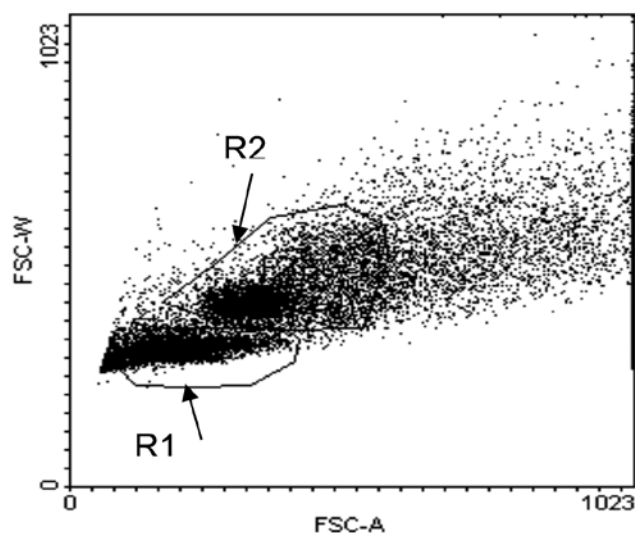


Рис. 1. Данные проточной цитометрии по выделению клеток кожи пациенток с абдоминопластикой.

Гейт R1 – кератиноциты, гейт R2 – фибробласты кожи.

первого сигнального комплекса киназы mTOR – mTORC1 при ожирении, тогда как уровень основного белка второго комплекса mTORC2 – Rictor не повышен ($p > 0,05$). Также повышен уровень 4E-BP1, который передает информацию от первого комплекса киназы mTOR на рибосомы и отвечает за трансляцию белка. Киназа АКТ может быть ассоциирована как с первым, так и со вторым комплексом mTOR, при этом для mTORC1 она является предшествующим мессенджером, а для mTORC2 – вторичным. Данные указывают на то, что особенности метаболического процесса в клетках кожи при ожирении отчасти опосредованы участием киназы АКТ.

Для того чтобы определить активацию сигнальных белков, клетки кожи иммунотипировали антителами к фосфорилированным белкам (p): (p)-mTOR, (p)-Raptor, (p)-Rictor, (p)-p70-S6K1, (p)-4E-BP1 и (p)-АКТ.

Как показывают данные **табл. 2**, уровень активированных белков (p)-mTOR, (p)-Raptor, (p)-p70-S6K1, (p)-4E-BP1 и (p)-АКТ статистически значимо повышен в клетках кожи пациентов с ожирением ($p < 0,05$). Это указывает на активность первого комплекса

mTORC1, активацию синтеза белка в клетках кожи при ожирении. Отдельно был определен уровень фосфорилированных белков в кератиноцитах (**табл. 3**) и в фибробластах кожи (**табл. 4**).

Представленные данные указывают на значительные различия в активности белков, ассоциированных с киназой mTOR, в кератиноцитах и фибробластах кожи. Тем не менее во всех типах клеток показано статистически значимое ($p < 0,05$) повышение активности этих белков у пациенток при ожирении по сравнению с таковыми с нормальной массой тела. Повышение уровня фосфорилированных белков указывает на их активацию. Таким образом, белки комплекса mTORC1 активированы и имеют отношение к целому ряду процессов, связанных с кератиноцитами и фибробластами кожи, в том числе к синтезу хемокинов, а также компонентов экстраклеточно матрикса (extracellular matrix, ECM), отвечающих за продукцию белков, участвующих в заживлении ран после операции. Поскольку при ожирении повышен процент осложнений, связанных с задержкой заживления операционной раны,

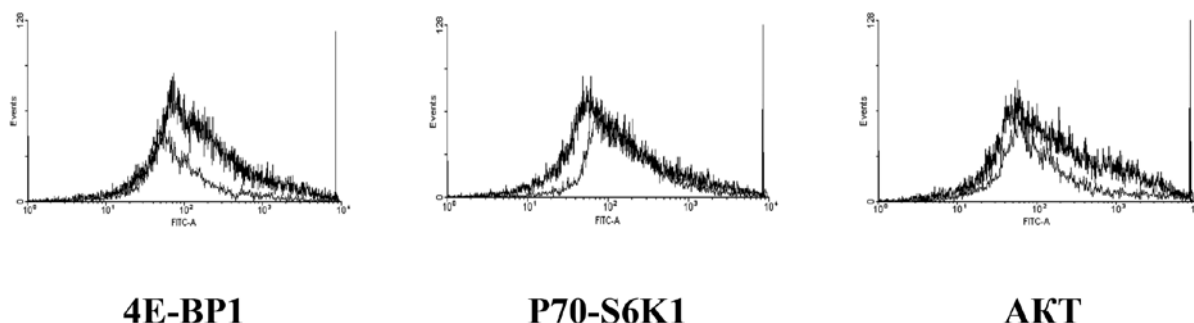


Рис. 2. Данные проточной цитометрии по содержанию внутриклеточных белков, ассоциированных с киназой mTOR, в клетках кожи пациенток после абдоминопластики.

Тонкая линия – гистограмма пациентки с нормальной массой тела, жирная линия – гистограмма пациентки с ожирением.

Таблица 1

Уровень белков, связанных с киназой mTOR (по интенсивности внутриклеточной флуоресценции (mean, у.е.) в суспензии клеток кожи, выделенных из операционного материала при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением (данные проточной цитометрии))

Белок	Интенсивность флуоресценции белков, у.е.		$p < 0,05$
	ИМТ 19,8+1,7 кг/м ² , (n = 46)	ИМТ 38,3+4,1 кг/м ² , (n = 46)	
Киназа mTOR	132 ± 5	138 ± 7	
Raptor	119 ± 3	130 ± 4	#
Rictor	124 ± 6	129 ± 5	
4E-BP1	80 ± 2	94 ± 3	#
p70-S6K1	99 ± 4	104 ± 3	
АКТ	85 ± 2	98 ± 2	#

Примечание. Интенсивность флуоресценции белков в условных единицах (mean, у.е.); # – $p < 0,05$ по сравнению с показателями у обследуемых с нормальной массой тела.

а также с частичным некротизированием операционного шва, можно говорить о том, что активация регуляторной киназы mTOR в фибробластах кожи имеет отношение к развитию осложнений после абдоминопластики.

Полученные данные отражают особенности метаболизма при ожирении, которые могут способствовать разви-

тию послеоперационных осложнений при абдоминопластике, что характерно для пациенток этой группы.

Выводы

1. Показано повышение уровня белков, ассоциированных с киназой mTOR, в клетках кожи пациенток с ожирением.

Таблица 2

Уровень фосфорилированных белков, ассоциированных с киназой mTOR (по интенсивности внутриклеточной флуоресценции), в клетках кожи, выделенных из операционного материала при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением (проточная цитометрия)

Белок	Интенсивность флуоресценции белков, у.е.		$p < 0,05$
	ИМТ 19,8+1,7 кг/м ² (n = 46)	ИМТ 38,3+4,1 кг/м ² (n = 46)	
(p)*-mTOR	171 ± 5	248 ± 7	#
(p)-Raptor	156 ± 3	181 ± 5	#
(p)-Rictor	139 ± 4	146 ± 6	
(p)-4E-BP1	169 ± 5	214 ± 4	#
(p)- p70-S6K1	152 ± 4	233 ± 7	#
(p)-АКТ	168 ± 9	213 ± 5	#

Примечание. Интенсивность флуоресценции белков в условных единицах (mean, у.е.); *(p) – фосфорилированные белки; # $p < 0,05$ по сравнению с нормально массой тела.

Таблица 3

Уровень фосфорилированных белков, ассоциированных с киназой mTOR (по интенсивности внутриклеточной флуоресценции), в кератиноцитах кожи, выделенных из операционного материала при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением (проточная цитометрия)

Белок	Интенсивность флуоресценции белков, у.е.		$p < 0,05$
	ИМТ 19,8+1,7 кг/м ² (n = 46)	ИМТ 38,3+4,1 кг/м ² (n = 46)	
(p)*-mTOR	102 ± 3	118 ± 4	#
(p)-Raptor	96 ± 4	112 ± 2	#
(p)-Rictor	76 ± 2	87 ± 4	#
(p)-4E-BP1	79 ± 3	92 ± 5	#
(p)- p70-S6K1	61 ± 4	77 ± 3	#
(p)-АКТ	75 ± 4	90 ± 4	#

Примечание. Интенсивность флуоресценции белков в условных единицах (mean, у.е.); *(p) – фосфорилированные белки; # $p < 0,05$ по сравнению с нормальной массой тела.

Таблица 4

Уровень фосфорилированных белков, ассоциированных с киназой mTOR (по интенсивности внутриклеточной флуоресценции), в фибробластах кожи, выделенных из операционного материала при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением (проточная цитометрия)

Белок	Интенсивность флуоресценции белков, у.е.		$p < 0,05$
	ИМТ 19,8+1,7 кг/м ² (n = 46)	ИМТ 38,3+4,1 кг/м ² (n = 46)	
(p)*-mTOR	186 ± 5	251 ± 6	#
(p)-Raptor	161 ± 4	182 ± 4	#
(p)-Rictor	145 ± 5	160 ± 4	#
(p)-4E-BP1	172 ± 5	238 ± 5	#
(p)- p70-S6K1	161 ± 4	249 ± 5	#
(p)-АКТ	173 ± 6	237 ± 6	#

Примечание. Интенсивность флуоресценции белков в условных единицах (mean, у.е.); *(p) – фосфорилированные белки; $p < 0,05$ по сравнению с нормальной массой тела.

2. Показано преимущественное участие первого комплекса киназы mTOR – mTORC1 в активации клеток кожи при ожирении у пациенток с абдоминопластикой.

3. Установлено повышение активности вторичных мессенджеров киназы mTOR – фактора 4E-BP1 и рибосомальной киназы p70-S6K1, передающих сигналы на рибосомы для синтеза белка, в фибробластах и кератиноцитах кожи пациенток с ожирением.

Литература

(п.п. 1-12; 18; 19 см. References)

13. Копасов А.Е., Морозов С.Г. Отдаленные результаты абдоминопластики у женщин с ожирением разной степени и их связь с состоянием клеток жировой ткани. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2017; 1:100-1.
14. Копасов А.Е., Морозов С.Г. Сравнение хемотаксических свойств и экспрессии рецепторов нейтрофилов у пациентов с ожирением и нормальным весом после проведения абдоминальной пластики. *Патогенез*. 2016; 14(4): 51-6.
15. Копасов А.Е., Иванченко О.Б., Морозов С.Г. Контаминация кожи абдоминальной области условно-патогенными дрожжами как фактор риска развития осложнений после абдоминопластики. *Успехи медицинской микологии*. 2017; 17: 253-5.
16. Копасов А.Е., Иванченко О.Б., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Участие макрофагов в защите кожи и подкожно-жировой ткани от микроскопических грибов после операции абдоминопластики. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2017; Т. 1 (Приложение 1): 42-4.
17. Копасов А.Е., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Экспрессия хемокинов, ассоциированных с моноцитами, в клетках подкожно-жировой ткани, выделенных из операционного материала больных при проведении абдоминопластики. *Патогенез*. 2017; 15(3): 70-8.

References

1. Morita M., Gravel S., Hulea L., Larsson O., Pollak M., St-Pierre J. et al. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle*. 2015; 14(4): 473-80.
2. Linke M., Fritsch S., Sukhbaatar N., Hengstschläger M., Weichhart T. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS Lett*. 2017; 591(19): 3089-103.
3. Kim H., Sung J., Kim H., Ryu H., Cho Park H., Oh Y. et al. Expression and secretion of CXCL12 are enhanced in autosomal dominant polycystic kidney disease. *BMB Rep*. 2019; 52(7): 463-8.
4. Yang F., Takagaki Y., Yoshitomi Y., Ikeda T., Li J., Kitada M. et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 accelerates epithelial-mesenchymal transition and breast cancer metastasis via the CXCL12/ CXCR4/ mTOR axis. *Cancer Res*. 2019; 79(4): 735-46.
5. Gao D., Tang T., Zhu J., Tang Y., Sun H., Li S. CXCL12 has therapeutic value in facial nerve injury and promotes Schwann cells autophagy and migration via PI3K-AKT-mTOR signal pathway. *Int. J. Biol. Macromol*. 2019; 124: 460-8.
6. Yin J., Gu L., Wang Y., Fan N., Ma Y., Peng Y. Rapamycin improves palmitate-induced ER stress/ NF- κ B pathways associated with stimulating autophagy in adipocytes. *Mediators Inflamm*. 2015; 272313-21.
7. Ding X., Bloch W., Iden S., Rüegg M., Hall M., Leptin M. et al. mTORC1 and mTORC2 regulate skin morphogenesis and epidermal barrier formation. *Nat. Commun*. 2016; 7: 13226-31.
8. Hu X., Zhang H., Li X., Li Y., Chen Z. Activation of mTORC1 in fibroblasts accelerates wound healing and induces fibrosis in mice. *Wound Repair Regen*. 2020; 28(1): 6-15.
9. Kuo P., Zeng Z., Salim N., Mattarollo S., Wells J., Leggett G. The role of CXCR3 and its chemokine ligands in skin disease and cancer. *Front. Med*. 2018; 5: 271-6.
10. Patel A., Tsiloni I., Weng Z., Theoharides T. TNF stimulates IL-6, CXCL8 and VEGF secretion from human keratinocytes via activation of mTOR, inhibited by tetramethoxyluteolin. *Exp. Dermatol*. 2018; 27(2): 135-43.
11. Souza-Almeida G., D'Avila H., Almeida P., Luna-Gomes T., Liechocki S., Walzog B. et al. Leptin mediates *in vivo* neutrophil migration: involvement of tumor necrosis factor-alpha and CXCL1. *Front. Immunol*. 2018; 9: 111-7.
12. William M., Leroux L., Chaparro V., Graber T. Alain T., Jaramillo M. Translational repression of Ccl5 and Cxcl10 by 4E-BP1 and 4E-BP2 restrains the ability of mouse macrophages to induce migration of activated T cells. *Eur. J. Immunol*. 2019; 49(8): 1200-12.
13. Kopasov A.E., Morozov S.G. Long-term results of abdominoplasty in women with various degree of obesity and their relationship with the adipose tissue cell conditions. *Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoy i esteticheskoy khirurgii*. 2017; 1: 100-1. (In Russian)
14. Kopasov A.E., Morozov S.G. Comparison of chemotactic properties and neutrophil receptor expression in obese and normal weight patients after abdominoplasty operation. *Patogenez*. 2016; 14(4): 51-6. (In Russian)
15. Kopasov A.E., Ivanchenko O.B., Morozov S.G. Abdominal area skin contamination by the opportunistic yeast is a risk factor for complications after abdominoplasty. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*. 2017; 17: 253-5. (In Russian)
16. Kopasov A.E., Ivanchenko O.B., Blokhin S.N., Morozov S.G. Participation of macrophages in the skin and subcutaneous fat tissue protection from microscopic fungi after abdominoplasty. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2017; (Suppl.1): 42-4. (In Russian)
17. Kopasov A.E., Blokhin S.N., Morozov S.G. Monocyte-associated chemokine expression in cells from subcutaneous adipose tissue isolated from operation material of patients during abdominoplasty. *Patogenez*. 2017; 15(3): 70-8. (In Russian)
18. Paschoal V., Amano M., Belchior T., Magdalon J., Chimin P., Andrade M. et al. mTORC1 inhibition with rapamycin exacerbates adipose tissue inflammation in obese mice and dissociates macrophage phenotype from function. *Immunobiology*. 2017; 222(2): 261-71.
19. Kimura T., Nada S., Takegahara N., Okuno T., Nojima S., Kang S. et al. Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals. *Nat. Commun*. 2016; 7: 13130.

Сведения об авторах:

Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «НИИОПП», зав. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии, e-mail: sergey_moroz@list.ru;

Копасов Андрей Евгеньевич, мл. науч. сотр., лаб. регуляции репаративных процессов ФГБНУ «НИИОПП»; врач ООО «Фрай Клиник 1», e-mail: deicidekopas@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Копасов А.Е.^{1,2}, Волкова Е.Н.¹, Блохин С.Н.², Морозов С.Г.¹

Уровень хемокинов, продуцируемых кератиноцитами и фибробластами кожи, при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением

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

²ООО «Фрау Клиник 1»,
129110, г. Москва, Россия, Гиляровского ул., д. 55

Цель работы – определение уровня хемокинов, ассоциированных с фибробластами и кератиноцитами, в клетках кожи, выделенных из операционного материала при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением.

Методика. Для исследования использовали фрагменты кожи пациенток с нормальной массой тела и ожирением. Степень ожирения оценивали по индексу массы тела (ИМТ) согласно международным критериям. ИМТ, принятый в исследовании за норму, составлял $19,8 \pm 1,7$ кг/м², для пациенток с ожирением – $38,3 \pm 4,1$ кг/м². Клетки выделяли путем ферментативной обработки коллагеназой II. Проводили иммунотипирование клеток моноклональными антителами мечеными флуоресцентными красителями. Использовали антитела к хемокинам семейства CXCL (R&D systems) и CCL (Boeringer Ingelheim, Германия). Меченные флуоресцентными красителями иммунотипированные клетки анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) по программе SimulSet. Статистический анализ проводили по программе ANOVA.

Результаты. Были проанализированы хемокины семейства CCL и CXCL, секретируемые кератиноцитами и фибробластами кожи. Показано, что в коже пациенток с ожирением повышен процент клеток, экспрессирующих рецепторы CXCR3, CXCR4, CCR3, CCR10, регулирующие секрецию хемокинов кератиноцитами и фибробластами кожи. При ожирении в клетках кожи повышен уровень хемокинов CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL13, CCL24 и CCL27, имеющих отношение к развитию и поддержанию воспалительного процесса в коже, а уровень хемокинов CCL17, CCL22, CCL28 снижен, что указывает на нарушение хемокиновой и цитокиновой регуляции при ожирении и является основой для развития послеоперационных осложнений при абдоминопластике.

Заключение. Полученные данные указывают на нарушение хемокиновой регуляции при ожирении, что способствует развитию послеоперационных осложнений при абдоминопластике.

Ключевые слова: хемокины; абдоминопластика; ожирение; иммунотипирование; моноклональные антитела.

Для цитирования: Копасов А.Е., Волкова Е.Н., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Уровень хемокинов, продуцируемых кератиноцитами и фибробластами кожи, при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 47-53.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.47-53

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

Участие авторов: получение клеток для анализа, описание клинических данных, работа на проточном цитометре – Копасов А.Е.; написаны разделы статьи, статистическая обработка результатов – Волкова Е.Н.; написание статьи, анализ литературы – Блохин С.Н.; общее руководство исследованием, составление дизайна исследования – Морозов С.Г. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.05.2020

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Kopasov A.E.^{1,2}, Volkova E.N.¹, Blokhin S.N.², Morozov S.G.¹

Levels of keratinocyte- and fibroblast-derived chemokines in skin cells isolated from abdominoplasty surgical materials from patients with normal weight and obesity

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

²Frau Klinik 1, Gilyarovskogo
Str. 55, Moscow 129110, Russia

The aim of the study was to compare chemokine expression in skin cells obtained from patients with normal body weight and obesity after abdominoplasty.

Methods. Obesity was determined by body weight index (normal, 19.8 ± 1.7 kg/m²; obesity, 38.3 ± 4.1 kg/m²). Only skin without subcutaneous fat was isolated from surgical material. The skin cells obtained from surgical material were stained with monoclonal antibodies to chemokines. Fluorescence of proteins and receptors was analyzed by flow cytometry. Statistical analysis was performed with ANOVA.

Results. Keratinocyte- and fibroblast-derived chemokines of the CCL and CXCL families were analyzed. Percentage of cells expressing CXCR3, CXCR4, CCR3, and CCR10 receptors (regulators of chemokine secretion by keratinocytes and skin fibroblasts) was increased in the skin of obese patients. Expression of the pro-inflammatory chemokines, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL13, CCL24, and CCL27, was increased in skin cells from obese patients. Obesity was associated with reduced expression of the chemokines CCL17, CCL22, and CCL28 in skin cells.

Conclusion. Chemokine regulation is disturbed in obesity, which may underlie the development of complications after abdominal surgery.

Keywords: chemokines; abdominoplasty; obesity; immunotyping; monoclonal antibodies.

For citation: Kopasov A.E., Volkova E.N., Blokhin S.N., Morozov S.G. Levels of keratinocyte- and fibroblast-derived chemokines in skin cells isolated from abdominoplasty surgical materials from patients with normal weight and obesity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 47-53. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.47-53

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

Contribution: obtaining cells for analysis, description of clinical data, work on a flow cytometer – Kopasov A.E.; spelling section of the article, statistical processing of the results – Volkova E.N.; writing an article, literature analysis – Blokhin S.N.; general leadership research, design study – Morozov S.G. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgment. The study has no sponsorships.

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

Information about the authors:

Kopasov A.E., <https://orcid.org/0000-0003-0078-7483>

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

Received 06.05.2020

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Ранее была показана роль хемокинов в регуляции клеток крови и подкожно-жировой ткани при ожирении, а также в развитии осложнений после абдоминопластики [1-5]. Продолжением работы явилось определение уровня хемокинов в фибробластах и кератиноцитах кожи. Значение проведенных исследований – обоснование регуляторной функции хемокинов, определяющих межклеточные взаимодействия, процессы активации и дифференцировки клеток кожи. Это особенно актуально в клинике пластической хирургии, когда результатом проведенной операции должен быть практически невидимый операционный шов. Однако после проведенной абдоминопластики в ряде случаев регистрируются послеоперационные осложнения в виде отека, гематомы, частичного некротизирования шва, заживления раны вторичным натяжением, что связано с развитием воспаления в области операционной раны [6]. Воспаление опосредовано клетками иммунной системы, провоспалительными цитокинами и рядом хемокинов. Клетки кожи секретируют хемокины, участвующие в заживлении ран и имеющие отношение к формированию

рубцов на месте операционной раны, а также регулируют межклеточные взаимодействия и течение воспалительных процессов в коже.

Суперсемейство белков хемокинов ($M \sim 8-10$ кДа) подразделяется на 4 семейства (CC, CXC, XC и CX3C) в зависимости от структуры первых двух N-концевых цистеиновых последовательностей [7].

Кератиноциты продуцируют хемокины семейства CXC: CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL14, CXCL8 [8], а также хемокины семейства CCL: CCL17, CCL20, CCL22, CCL24, CCL27, CCL28 [9]. Провоспалительные хемокины CXCL8 и CCL20 играют роль в повреждении кератиноцитов при растяжении кожи [8]. Хемокин CCL27 продуцируется кератиноцитами при воспалении и обуславливает хоуминг Т-клеток в кожу за счет взаимодействия CCL27 с рецепторами CCR10 на лимфоцитах [9]. Увеличение секреции CXCL8 кератиноцитами повышает хемотаксис нейтрофилов в рану, что может приводить к задержке ее заживления. Если заблокировать рецептор CXCR2 хемокина CXCL8, то заживление ран происходит нормально [10].

В процессе дифференцировки кератиноциты базального слоя мигрируют к роговому слою эпидермиса. В базальном слое активацию и дифференцировку кератиноцитов контролируют клетки иммунной системы за счет цитокинов и хемокинов. Инфильтрирующие кожу лимфоциты экспрессируют рецепторы CXCR3, которые распознают хемокины CXCL9, CXCL10 и CXCL11, они нарушают пролиферацию кератиноцитов и их дифференцировку в корнеоциты [11]. Преактивированные CD8⁺ Т-клетки индуцируют синтез и секрецию хемокинов CXCL9 и CXCL10 кератиноцитами, поддерживают синтез CXCL1, CXCL5 и CCL20. Кератиноциты могут подавлять синтез хемокинов CCL3 и CCL4 в преактивированных CD8⁺ Т-клетках [12]. Синтез хемокинов кератиноцитами амплифицируется провоспалительными факторами – интерфероном гамма (IFN- γ) и фактором некроза опухолей альфа (TNF- α) [13]. Под воздействием IFN- γ инфильтрирующие Т-лимфоциты индуцируют синтез CXCL9 и CXCL10 в кератиноцитах, что в свою очередь способствует миграции Т-клеток в кожу [11].

CXCL14 участвует в поддержании локального иммунного ответа в коже и слизистых, он взаимодействует с гликозаминогликанами экстраклеточного матрикса (ECM), гиалуроновой кислотой, хондроитинсульфатом и др. [14]. CXCL14 способствует привлечению CD14⁺CD207⁺CCR6⁺ моноцитов в кожу, где они могут дифференцироваться в эпидермальные клетки Лангерганса. С возрастом секреция хемокина CXCL14 кератиноцитами снижается [15]. CXCL14 работает как хемоаттрактант для активированных макрофагов, незрелых дендритных клеток и NK-клеток, а также оказывает ингибиторный эффект на сигнальный путь CXCL12/CXCR4, который обеспечивает поддержание Th1-зависимого иммунного ответа в коже. Рецептор CXCR4 принимает участие в развитии фиброза кожи [16]. Снижение экспрессии CXCL14 способствует поддержанию поляризации иммунного ответа в сторону Th2, а также нарушает васкуляризацию в коже [17].

Фибробласты дермы продуцируют провоспалительные хемокины CCL20, CCL24, CCL27, CXCL8, CXCL13, которые регулируют процессы активации и имеют отношение к развитию фиброза тканей [18]. Взаимодействие хемокина CCL24 с рецептором CCR3 инициирует сигнальный путь, приводящий к развитию фиброза кожи [19]. CCL24 продуцируется также клетками эндотелия. Повышение уровня CXCL13 в плазме крови положительно коррелирует с развитием воспалительного процесса кожи [20]. CXCL13 также секретируется макрофагами и клетками эндотелия мел-

ких сосудов кожи, он регулирует активность В-клеток, фолликулярных Т-клеток, регуляторных Т-клеток и Th17.

Ускоренному заживлению ран способствует отложение белков внеклеточного матрикса (extracellular matrix, ECM) и реэпителизация раны, что обеспечивается высоким уровнем хемокинов CCL17 и CCL22 в коже, продуцируемых поляризованными М2-макрофагами [21]. Заживление ран также регулирует сигнальный путь CCL28/CCR10. Снижение уровня CCL28 ассоциировано с ускорением заживления ран, так как прерывается активирование этим хемокином рецепторов CCR10 и их взаимодействие с эндотелиальной NO-синтазой [22].

У пациентов с ожирением чаще регистрируются осложнения после абдоминопластики, что обусловлено, в частности, влиянием хемокинов на приток клеток, поддерживающих воспаление в области операционной раны [23]. Ожирение увеличивает сроки заживления ран, является одной из причин заживления ран вторичным натяжением и приводит к формированию нежелательных рубцов в месте операции.

Цель работы – определение уровня хемокинов, ассоциированных с фибробластами и кератиноцитами, в клетках кожи, изолированных из операционного материала при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением.

Методика

Контингент обследуемых. В клинике пластической и эстетической хирургии «Фрау Клиник 1» были прооперированы 92 женщины (18–56 лет) по поводу коррекции формы живота. Работа выполнена по международным правилам работы с биологическим материалом людей. Пациентки добровольно участвовали в исследовании и подписывали форму информированного согласия. Критериями исключения из исследования были острые вирусные и бактериальные инфекции, системные, аллергические, воспалительные и онкологические заболевания.

Методом биоимпедансного анализа (БИА) количественно оценивали жировую и безжировую массу тела, процентное содержание жира, активную клеточную массу, уровень основного обмена, количество внеклеточной, внутриклеточной и общей жидкости и другие показатели состояния организма. Измеряемыми параметрами метода одночастотного БИА на анализаторе ABC-02 «Медасс» по компьютерной программе фирмы «Form Med Healthcare, AG» (Германия) являются величины активного (R_{50}) и реактивного сопротивления (X_c), образующие вектор импеданса.

БИА проводили утром натощак. В программу вносили антропометрические данные, пол и возраст пациентки. Степень ожирения оценивали по индексу массы тела (ИМТ, $\text{кг}/\text{м}^2$) согласно международным критериям. ИМТ, принятый в исследовании за норму, составлял $19,8 \pm 1,7 \text{ кг}/\text{м}^2$, для пациенток с ожирением – $38,3 \pm 4,1 \text{ кг}/\text{м}^2$.

Работу с кровью проводили в сертифицированной лаборатории согласно ГОСТам и международным правилам работы с биологическим материалом человека. Протокол исследования одобрен этической комиссией института. Кровь из локтевой вены брали натощак в вакуум-контейнеры (с гепарином, ЭДТА или без реактивов в зависимости от цели). Подсчет клеток крови проводили на гематологическом анализаторе Pentra Nexus HORIBA (Horiba ABX SAS, Франция). Биохимические параметры определяли на анализаторе Fuji Dri-Chem4000 (Fujifilm, Япония) [4].

При проведении операции абдоминопластики удаленные участки кожи промывали стерильным физиологическим раствором, иссекали необходимый объем тканей и переносили в стерильную пробирку со средой RPMI-1640 с 15% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и оставляли при температуре 4°C до окончания операции. При подготовке материала к исследованию удаляли подкожный жир и другие мягкие ткани. Для работы с клетками использовали среду RPMI-1640 (Flow) с 10мМ буфера Hepes (Sigma), 2мМ L-глутамин (Sigma) и ЭТС (Flow). Клетки отмывали в фосфатном буфере (PBS, Phosphate Buffered Saline, Sigma). Клетки выделяли путем ферментативной обработки коллагеназой II (Sigma-Aldrich) в конечной концентрации [0,5мг/мл] при 37°C и 5% CO_2 в течение 40 мин при непрерывном мягком перемешивании на шейкере. Затем к клеткам добавляли ЭДТА [10мМ] и лизирующий буфер для эритроцитов (Becton Dickinson, США). Суспензию клеток отмывали дважды в полной среде RPMI-1640 центрифугированием при 200 g. К осадку добавляли полную среду RPMI-1640 и 15% ЭТС, инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 2 ч для восстановления клеток. Процент живых клеток определяли по окраске трипановым синим, обычно их количество превышало 92% всего количества выделенных клеток [5].

Проводили иммунотипирование клеток моноклональными антителами (mAb), мечеными флуоресцентными красителями. Использовали mAb к хемокинам CXCL (R&D systems), хемокинам CCL (Boehringer Ingelheim, Германия). Клетки отмывали в PBS, довели до концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток в 50 мкл, добавляли 20 мкл mAb, инкубировали при 4°C 40 мин.

Клетки трижды отмывали, осадок фиксировали в 2% параформальдегиде на PBS с 5% азидом натрия. Меченные флуоресцентными красителями иммунотипированные клетки анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) по программе SimulSet. Первичный анализ клеток проводили при прямом и боковом просвечивании лазером в системе координат на каналах FSC-A/SSC-A (Forward Scate Cells & Side Scate Cells). В каждом образце анализировалось 10 тыс. событий на гейт одной популяции клеток, которой устанавливали автоматически по программе или по уровню соответствующего маркера. Интенсивность флуоресценции mAb, меченных FITC, определяли на канале FL1 при длине волны $530 \pm 5 \text{ нм}$, флуоресценцию фикоэритрина (PE) измеряли на канале FL2 ($585 \pm 5 \text{ нм}$). Интенсивность флуоресценции приводили к внутреннему стандарту. В качестве негативного контроля регистрировали флуоресценцию F(ab')_2 фрагментов изотипспецифичных иммуноглобулинов, меченных соответствующим красителем без первичных mAb. Анализировали гистограмму, соответствующую распределению клеток на канале, по которой определяли процентное содержание антигенположительных клеток и интенсивность флуоресценции в условных единицах (mean), что отражало относительную плотность антигена на поверхности клетки или уровень включения флуоресцентной метки в клетку [4].

Результаты статистически обрабатывали по программе ANOVA. Сравнение между двумя группами проводили по критерию Стьюдента, данные представлены как $M \pm m$. Для анализа групп с малой выборкой использовали метод непараметрического анализа Ньюмена–Кейлса. Статистически значимыми считали различия между группами $p < 0,05$.

Результаты исследования

Данные по уровню плотности поверхностных рецепторов хемокинов на клетках кожи представлены в табл. 1.

CXCR3 являются рецепторами для хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11 [11]. Показано статистически значимое ($p < 0,05$) повышение экспрессии рецепторов CXCR3 в клетках кожи при ожирении.

Рецепторы CCR3 и CXCR4, экспрессируемые на лимфоцитах, инициируют сигнальные пути, принимающие участие в развитии фиброза кожи [16, 19]. В среднем при ожирении не было значимого повышения уровня этих рецепторов, однако при персонализированном анализе результатов установлено, что у 5% пациенток с ожирением плотность этих рецепторов превышал норму в 2 раза.

По нашим данным, экспрессия рецепторов CCR10 существенно ($p < 0,05$) повышена при ожирении. Это согласуется с данными авторов, показавших, что CCR10 связывают хемокины, участвующие в воспалении кожи [9].

В табл. 2 приведены результаты оценки уровня хемокинов семейства CXCL, секретируемых клетками кожи. Уровни хемокинов CXCL8, CXCL9, CXCL10 в клетках кожи статистически значимо повышены у пациенток с ожирением по сравнению с показателями обследуемых с нормальной массой тела. Известно, что секреция указанных хемокинов стимулируется провоспалительными цитокинами, что прямо указывает на их участие в процессе воспаления кожи [13, 18] и объясняет их повышение при ожирении.

Уровень хемокина CXCL13 в клетках кожи при ожирении также значимо повышен, что согласуется с представлением об его участии в процессах воспа-

ления кожи [20]. В связи с этим вполне вероятно роль этого хемокина в патогенезе послеоперационных осложнений, наблюдаемых при абдоминопластике у пациенток с ожирением.

Уровень хемокина CXCL14 снижен при ожирении, хотя и статистически незначимо. Из данных литературы известно, что этот хемокин может играть роль в нарушении васкуляризации кожи [17], что также может иметь отношение к развитию осложнений после абдоминопластики у пациенток с ожирением (табл. 2)

Уровень хемокинов CCL17, CCL22 и CCL28 в клетках кожи несколько снижен при ожирении (табл. 3), что указывает на возможное наличие проблем с эпителизацией операционной раны у пациенток с ожирением, так как эти хемокины участвуют в процессах реэпителизации раны [21, 22]. По нашим данным, экспрессия провоспалительных хемокинов CCL24, CCL27 существенно ($p < 0,05$) повышена при ожирении. Это

Таблица 1

Экспрессия рецепторов хемокинов (в %), сопряженных с клетками кожи, у обследуемых с нормальной массой тела и пациенток с ожирением после абдоминопластики (проточная цитометрия)

Рецептор	ИМТ 19,8+1,7 кг/м ² (n = 46)	ИМТ 38,3+4,1 кг/м ² (n = 46)	p < 0,05
CXCR3	32 ± 3	56 ± 4	+
CXCR4	19 ± 1	22 ± 3	
CCR3	27 ± 2	29 ± 3	
CCR10	25 ± 3	44 ± 2	+

Примечание. Экспрессия рецепторов хемокинов в процентах.

Таблица 2

Внутриклеточная флуоресценция хемокинов семейства CXCL в клетках кожи, выделенных при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением (проточная цитометрия)

Хемокин, mean*, у.е.	ИМТ 19,8+1,7 кг/м ² (n = 46)	ИМТ 38,3+4,1 кг/м ² (n = 46)	p < 0,05
CXCL8.	81 ± 4	142 ± 5	+
CXCL9	79 ± 4	136 ± 5	+
CXCL10	62 ± 5	113 ± 3	+
CXCL13	84 ± 4	139 ± 6	+
CXCL14	109 ± 5	101 ± 5	

Примечание. Здесь и в табл. 3 *mean – интенсивность флуоресценции (в условных единицах – у.е.).

Таблица 3

Внутриклеточная флуоресценция хемокинов семейства CCL в клетках кожи, выделенных при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением (проточная цитометрия)

Хемокин, mean*, у.е.	ИМТ 19,8+1,7 кг/м ² (n = 46)	ИМТ 38,3+4,1 кг/м ² (n = 46)	p < 0,05
CCL17	101 ± 3	92 ± 2	+
CCL22	106 ± 4	90 ± 5	+
CCL24	79 ± 3	123 ± 4	+
CCL27	84 ± 3	118 ± 3	+
CCL28	102 ± 5	87 ± 5	+

согласуется с данными литературы по их участию в миграции Т-клеток в кожу [9]. Хемокины CCL24 и CCL27 также регулируют процессы активации фибробластов и имеют отношение к развитию фиброза кожи [18, 19].

Обсуждение

По данным литературы известно, что у пациентов с ожирением после операции абдоминопластики повышен процент осложнений по сравнению с пациентами, имеющими нормальную массу тела. Повышается частота формирования серомы, некроза мягких тканей, увеличивается период заживления операционной раны [24, 25]. После круговой липоабдоминопластики процент осложнений еще выше [26, 27]. Нашими работами показано, что ожирение сопровождается нарушением секреции хемокинов клетками иммунной системы [1–5]. В данной работе мы проанализировали уровень хемокинов, секретируемых кератиноцитами и фибробластами кожи. Было установлено различие в уровне этих хемокинов у пациенток с ожирением по сравнению с пациентками с нормальной массой тела.

Таким образом, у пациенток с ожирением после абдоминопластики развитие осложнений патогенетически связано с особенностями секреции хемокинов клетками кожи различного типа, что регулирует перемещение клеток, синтезирующих провоспалительные цитокины, в кожу с последующим развитием воспаления.

Выводы

1. В коже пациенток с ожирением повышен процент клеток экспрессирующих рецепторы CXCR3, CXCR4, CCR3, CCR10, регулирующих секрецию хемокинов кератиноцитами и фибробластами кожи.

2. В клетках кожи пациенток с ожирением повышен уровень хемокинов CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL13, имеющих отношение к развитию и поддержанию воспалительного процесса в коже.

3. У пациенток с ожирением снижен уровень хемокинов CCL17, CCL22, CCL28 и повышен уровень хемокинов CCL24 и CCL27 в клетках кожи, что указывает на нарушение хемокиновой и цитокиновой регуляции при ожирении и является основой для развития послеоперационных осложнений при абдоминопластике.

Литература

(п.п. 6-27 см. References)

1. Копасов А.Е., Морозов С.Г. Отдаленные результаты абдоминопластики у женщин с ожирением разной степени и их связь с состоянием клеток жировой ткани. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2017; 1: 100-1.

2. Копасов А.Е., Иванченко О.Б., Морозов С.Г. Контаминация кожи абдоминальной области условно-патогенными дрожжами как фактор риска развития осложнений после абдоминопластики. *Успехи медицинской микологии*. 2017; 17: 253-5.

3. Копасов А.Е., Иванченко О.Б., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Участие макрофагов в защите кожи и подкожно-жировой ткани от микроскопических грибов после операции абдоминопластики. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2017; 1 (Приложение 1): 42-4.

4. Копасов А.Е., Морозов С.Г. Сравнение хемотаксических свойств и экспрессии рецепторов нейтрофилов у пациентов с ожирением и нормальным весом после проведения абдоминальной пластики. *Патогенез*. 2016; 14(4): 51-6.

5. Копасов А.Е., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Экспрессия хемокинов, ассоциированных с моноцитами, в клетках подкожно-жировой ткани, выделенных из операционного материала больных при проведении абдоминопластики. *Патогенез*. 2017; 15(3): 70-8.

References

1. Kopasov A.E., Morozov S.G. Long-term results of abdominoplasty in women with various degree of obesity and their relationship with the adipose tissue cell conditions. *Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoy i esteticheskoy khirurgii*. 2017; 1: 100-1. (In Russian)

2. Kopasov A.E., Ivanchenko O.B., Morozov S.G. Abdominal area skin contamination by the opportunistic yeast is a risk factor for complications after abdominoplasty. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*. 2017; 17: 253-5. (In Russian)

3. Kopasov A.E., Ivanchenko O.B., Blokhin S.N., Morozov S.G. Participation of macrophages in the skin and subcutaneous fat tissue protection from microscopic fungi after abdominoplasty. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2017; (Suppl.1): 42-4. (In Russian)

4. Kopasov A.E., Morozov S.G. Comparison of chemotactic properties and neutrophil receptor expression in obese and normal weight patients after abdominoplasty operation. *Patogenez*. 2016; 14(4): 51-6. (In Russian)

5. Kopasov A.E., Blokhin S.N., Morozov S.G. Monocyte-associated chemokine expression in cells from subcutaneous adipose tissue isolated from operation material of patients during abdominoplasty. *Patogenez*. 2017; 15(3): 70-8. (In Russian)

6. Carloni R., Naudet F., Chaput B., de Runz A., Herlin C., Girard P. et al. Are there factors predictive of postoperative complications in circumferential contouring of the lower trunk? A Meta-Analysis. *Aesthet. Surg. J.* 2016; 36(10): 1143-54.

7. Martins-Green M., Petreaca M., Wang L. Chemokines and their receptors are key players in the orchestra that regulates wound healing. *Adv. Wound Care*. 2013; 2: 327-47.

8. Furue K., Ito T., Tanaka Y., Yumine A., Hashimoto-Hachiya A., Takemura M. et al. Cyto/chemokine profile of *in vitro* scratched keratinocyte model: Implications of significant upregulation of CCL20, CXCL8 and IL36G in Koebner phenomenon. *J. Dermatol. Sci.* 2019; 94(1): 244-51.

9. Lopes-Marques M., Alves L., Fonseca M., Secci-Petretto G., Machado A., Ruivo R., Castro L. Convergent inactivation of the skin-specific C-C motif chemokine ligand 27 in mammalian evolution. *Immunogenetics*. 2019; 71(5-6): 363-72.

10. Riise R., Odqvist L., Mattsson J., Monkley S., Abdillahi S., Tyrchan C. et al. Bleomycin hydrolase regulates the release of chemokines

- important for inflammation and wound healing by keratinocytes. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 20407.
11. Gonzales K., Fuchs E. Skin and its regenerative powers: an alliance between stem cells and their niche. *Dev. Cell.* 2017; 43: 387–401.
 12. Rauschenberger T., Schmitt V., Azeem M., Klein-Hessling S., Murti K., Grän F. et al. T cells control chemokine secretion by keratinocytes. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1917.
 13. Kuo P., Zeng Z., Salim N., Mattarollo S., Wells J., Leggett G. The role of CXCR3 and its chemokine ligands in skin disease and cancer. *Front. Med.* 2018; 5: 271-6.
 14. Penk A., Baumann L., Huster D., Samsonov S. NMR and molecular modeling reveal specificity of the interactions between CXCL14 and glycosaminoglycans. *Glycobiology.* 2019; 29(10): 715-25.
 15. Hasegawa T., Feng Z., Yan Z., Ngo K., Hosoi J., Demehri S. Reduction in human epidermal Langerhans cells with age is associated with decline in CXCL14 – mediated recruitment of CD14+ monocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2020; 140(7): 1327-34.
 16. Cao J., Zhu W., Yu D., Pan L., Zhong L., Xiao Y. et al. The involvement of SDF-1 α /CXCR4 axis in radiation-induced acute injury and fibrosis of skin. *Radiat. Res.* 2019; 192(4): 410-21.
 17. Fukui Y., Miyagawa T., Hirabayashi M., Yamashita T., Saigusa R., Miura S. et al. Possible association of decreased serum CXCL14 levels with digital ulcers in patients with systemic sclerosis. *J. Dermatol.* 2019; 46(7): 584-9.
 18. Limandjaja G., van den Broek L., Waaijman T., Breetveld M., Monstrey S., Scheper R. et al. Reconstructed human keloid models show heterogeneity within keloid scars. *Arch. Dermatol. Res.* 2018; 310(10): 815-26.
 19. Mor A., Segal Salto M., Katav A., Barashi N., Edelshtein V., Manetti M. et al. Blockade of CCL24 with a monoclonal antibody ameliorates experimental dermal and pulmonary fibrosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2019; 78(9): 1260-8.
 20. Taniguchi T., Miyagawa T., Toyama S., Yamashita T., Nakamura K., Saigusa R. et al. CXCL13 produced by macrophages due to Fli1 deficiency may contribute to the development of tissue fibrosis, vasculopathy, and immune activation in systemic sclerosis. *Exp. Dermatol.* 2018; 27(9): 1030-7.
 21. Wilkinson H., Roberts E., Stafford A., Banyard K., Matteucci P., Mace K. et al. Tissue iron promotes wound repair via M2 macrophage polarization and the chemokine (C-C Motif) ligands 17 and 22. *Am. J. Pathol.* 2019; 189(11): 2196-208.
 22. Chen Z., Haus J., Chen L., Wu S., Urao N., Koh T. et al. CCL28-induced CCR10/eNOS interaction in angiogenesis and skin wound healing. *FASEB J.* 2020; 34(4): 5838-50.
 23. Chetta M., Aliu O., Tran B., Abdulghani M., Kidwell K., Momoh A. Complications in body contouring stratified according to weight loss method. *Plast. Surg (Oakv).* 2016; 24(2): 103-9.
 24. Ghannam W., Elrahawy A., Moghazy M. The effect of body mass index on outcome of abdominoplasty operations. *World J. Plast. Surg.* 2016; 5(3): 244-51.
 25. Hamra S., Small K. Cosmetic body lift. *Plast. Reconstr. Surg.* 2016; 137(2): 453-61.
 26. Gupta V., Winocour J., Rodriguez-Feo C., Bamba R., Shack R., Grotting J. et al. Safety of aesthetic surgery in the overweight patient: Analysis of 127°961 Patients. *Aesthet. Surg. J.* 2016; 36(6): 718-29.
 27. Sieffert M., Fox J., Abbott L., Johnson R. Obesity is associated with increased health care charges in patients undergoing outpatient plastic surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 2015; 135(5): 1396-404.

Сведения об авторах:

Копасов Андрей Евгеньевич, мл. науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБНУ «НИИОПП»; врач ООО «Фрау Клиник 1»; e-mail: deicidekopas@mail.ru;

Волкова Елена Николаевна, доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБНУ «НИИОПП»; e-mail: volkovaenderm@yandex.ru;

Блохин Сергей Николаевич, доктор мед. наук, проф., врач ООО «Фрау Клиник 1»; e-mail: deicidekopas@mail.ru;

Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «НИИОПП», зав. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии, e-mail: sergey_moroz@list.ru

© УДК 616-092.9

Силина Е.В.¹, Мантурова Н.Е.², Артюшкова Е.Б.³, Литвицкий П.Ф.¹, Васин В.И.², Синельникова Т.Г.¹,
Гладченко М.П.³, Крюков А.А.³, Аниканов А.В.³, Каплин А.Н.³, Наимзада М.Д.З.³, Ступин В.А.²

Динамика заживления кожной раны при применении инъекционных стимуляторов регенерации у крыс

¹ ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет),

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

² ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1;

³ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, 305041, г. Курск, Россия, ул. Карла Маркса, д. 3

Проблема эффективного, качественного и эстетического заживления ран, особенно у лиц зрелого и пожилого возраста, остается высокоактуальной.

Цель исследования – выявление особенностей динамики заживления кожной раны у экспериментальных крыс зрелого возраста; сравнение эффективности зарегистрированных и применяющихся в клинической практике инъекционных стимуляторов регенерации тканей: депротенинизированного гемодеривата крови телят и коллагена.

Методика. Экспериментальное слепое исследование проведено на 9-месячных крысах самцах Wistar массой 443,6±6,5 г. Квадратную рану стандартного размера (каждая сторона 11 мм, глубина раны до фасции, площадь в среднем 123,5±2,1 мм²) наносили на поверхность спины животных. В течение 14 сут изучали эффективность и возможные механизмы действия на заживление кожных ран двух инъекционных лекарственных средств: депротенинизированного гемодеривата крови телят (ДГК, актовегин) и коллагена (Коллост) в сравнении с контролем (физиологический раствор натрия хлорида). В динамике оценивали изменение площади ран, их объема, состояния микроциркуляции.

Результаты. Площадь ран группы Контроль сократились к концу 7-х сут в 1,1 раза, 14-х – в 5,0 раза, группы ДГК – в 1,4 и 8,3 раза, группы Коллаген – в 1,5 и 11,9 раза соответственно. В группах Контроль и ДГК заживление ран проходило в горизонтальном направлении, в группе Коллаген – вертикальном. Увеличение площади ран в фазу острого воспаления (в первые 3–5 сут) было только в группах Контроль и ДГК, при которых оно было перпендикулярно линиям напряжения кожи. Это свидетельствует о значимости направлений хирургических разрезов и наложения швов не только при создании, но и при последующем лечении ран. Уровень микроциркуляции в коже, непосредственно примыкающей к краю раны, на 3-и сут увеличивался только в группе ДГК, на 7-е сут – в группе Коллаген, на 14-е сут – во всех ранах всех групп, но наибольшие изменения микрогемоперфузии были в группе Коллаген.

Заключение. Установлена эффективность обоих стимуляторов регенерации. Вместе с тем скорость и характер заживления ран при их применении существенно различались, что связано с разными механизмами действия препаратов. Это необходимо учитывать в клинической практике при подборе препаратов для ускорения сроков регенерации раны, уменьшения размеров послеоперационного рубца и повышения его эстетичности.

Ключевые слова: рана; заживление ран; микроциркуляция; крысы зрелого возраста; физиологический раствор; коллаген; депротенинизированный гемодериват крови.

Для цитирования: Силина Е.В., Мантурова Н.Е., Артюшкова Е.Б., Литвицкий П.Ф., Васин В.И., Синельникова Т.Г., Гладченко М.П., Крюков А.А., Аниканов А.В., Каплин А.Н., Наимзада М.Д.З., Ступин В.А. Динамика заживления кожной раны при применении инъекционных стимуляторов регенерации у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 54-63.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.54-63

Для корреспонденции: Силина Екатерина Владимировна, e-mail: naesikliaterina@mail.ru

Участие авторов: все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы, подготовку протокола исследования, выполнение его, в работу по статистическому анализу фактических материалов, в написание статьи и ее корректуру. Все авторы прочли и одобрили финальную версию данной рукописи до ее публикации.

Финансирование. Материал был получен в ходе выполнения гранта ФГБУ Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (232GRNTIS5/35963), посвященного разработке вариантов биомедицинского полимерного продукта, стимулирующего заживление ран, для оценки эффективности которого в качестве групп сравнения использовали Коллаген и ДГК.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ранее был опубликован фрагмент исследования по вышеуказанному гранту, посвященного эффективности нового полимерного перевязочного средства, содержащего наночастицы (Silina E.V. et al. Efficacy of a novel smart polymeric nanodrug in the treatment of experimental wounds in rats. *Polymers*, 2020, 12, e1126. doi:10.3390/polym12051126).

Поступила 13.08.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Silina E.V.¹, Manturova N.E.², Artyushkova E.B.³, Litvitskiy P.F.¹, Vasin V.I.², Sinelnikova T.G.¹, Gladchenko M.P.³, Kryukov A.A.³, Anikanov A.V.³, Kaplin A.N.³, Naimzada M.D.Z.³, Stupin V.A.²

Dynamics of skin wound healing with the use of injectable regeneration stimulators in rats

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,

Trubetskaya Str. 8, Bld. 2, Moscow 119991, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University,

Ostrovityanova Str. 1, Moscow 117997, Russia;

³Kursk State Medical University,

Karla Marksa Str. 3, Kursk 305041, Russia

The issue of effective and aesthetic wound healing, particularly, in mature and elderly individuals, remains relevant.

Aim. To characterize the dynamics of skin wound healing in mature experimental rats and to compare the effectiveness of approved clinical injectable stimulants of regeneration (deproteinized hemoderivative of calf blood and collagen).

Methods. This experimental blind study was conducted on 9-month-old Wistar male rats weighing 443.6±6.5 g. Square wounds of a standardized size (each side, 11 mm; wound depth, down to fascia; mean area, 123.5 ± 2.1 mm²) were inflicted on the rat back. Efficacy and mechanism of action of two injectable drugs were studied for 14 days. Effects of deproteinized hemoderivative of calf blood (DHB, Actovegin) and collagen (Collost) were compared with control wounds (saline treatment). The wound size and volume and the state of microcirculation were evaluated in dynamics.

Results. The area of the wounds decreased by 9.1% at 7 days and 80% at 14 days in the control group; by 28.6% and 88%, respectively, in the DHB group; and by 33.3% and 91.6%, respectively, in the collagen group. In the control and DHA groups, the wound healing was predominantly horizontal while in the collagen group it was vertical. An increase in the wound area in the phase of acute inflammation during the first 3-5 days was observed only in the control and DHB groups; this increase was localized perpendicular to skin tension lines. This indicates the importance of preoperative planning not only for the lines and directions of surgical incisions and suturing but also for the subsequent treatment of wounds. Microcirculation in the skin immediately adjacent to the wound edge increased on day 3 only in the DHB group; in the collagen group, it increased on day 7; and on day 14, it was increased in all wounds of all groups with the greatest vascular effect being observed in the collagen group.

Conclusion. Both regeneration stimulants were effective; however, the wound healing patterns and rates were different, which might be due to different mechanisms of action of the drugs. This fact should be taken into account in clinical practice in order to reduce the regeneration time as well as to reduce the size and aesthetics of postoperative scar.

Keywords: wound; wound healing; microcirculation; rat adulthood; physiological solution of sodium chloride; collagen; deproteinized hemoderivative of blood.

For citation: Silina E.V., Manturova N.E., Artyushkova E.B., Litvitskiy P.F., Vasin V.I., Sinelnikova T.G., Gladchenko M.P., Kryukov A.A., Anikanov A.V., Kaplin A.N., Naimzada M.D.Z., Stupin V.A. Dynamics of skin wound healing with the use of injectable regeneration stimulators in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 54-63. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03. 54-63

For correspondence: Ekaterina V. Silina, Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of Human Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8, Trubetskaya Str, 119991, Moscow, Russia, e-mail: silinaekaterina@mail.ru

Funding. The publication did not have sponsorship. The presented material was obtained in the course of the grant of the FSBI Fund for the Promotion of the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Field (232GRNTIS5/35963), dedicated to the development of options for a biomedical polymer product that stimulates wound healing, to assess the effectiveness of which Collagen and DHA were used as comparison groups.

Acknowledgments. This study was a part of a project supported by the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology (232GRNTIS5/35963).

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

Earlier, a fragment of the study on the above grant was published on the effectiveness of a new smart polymer nanodrug (Silina E.V. et al. Efficacy of a novel smart polymeric nanodrug in the treatment of experimental wounds in rats. *Polymers*, 2020, 12, e1126. doi: 10.3390/polym12051126). The materials of this article have not been published anywhere else.

Information about the authors:

Silina E.V., <http://orcid.org/0000-0002-0246-5149>

Manturova N.E., <http://orcid.org/0000-0003-4281-1947>

Artyushkova E.B., <http://orcid.org/0000-0003-3777-6622>

Litvitskiy P.F., <http://orcid.org/0000-0003-0151-9114>

Vasin V.I., <https://orcid.org/0000-0002-8644-300X>

Sinelnikova T.G., <http://orcid.org/0000-0003-2803-5531>

Gladchenko M.P., <http://orcid.org/0000-0003-3627-9747>

Kryukov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3181-7828>

Anikanov A.V., <http://orcid.org/0000-0001-5862-6143>

Kaplin A.N., <http://orcid.org/0000-0001-5968-7132>

Naimzada M.D.Z., <http://orcid.org/0000-0002-7894-6029>

Stupin V.A., <http://orcid.org/0000-0002-9522-8061>

Received 13.08.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Методика

Актуальность проблемы заживления ран постоянно нарастает, что связано с ростом распространенности хронических трофических язв [1–3], а также увеличением числа хирургических вмешательств и травм [4–6]. Независимо от этиологии ран и сопутствующей патологии в процессе их заживления можно выделить ключевые процессы. Вначале это последовательно сменяющиеся друг друга этапы собственно воспалительного процесса, образования грануляционной ткани, пролиферации фибробластов и кератиноцитов с формированием межклеточного матрикса, что приводит к закрытию поверхности раны. В последующем происходит реорганизация внеклеточного матрикса, от чего зависят качество и эстетичность рубца, особенно при глубоком повреждении дермы [7, 8]. Нарушение любого этапа приводит к хронизации процесса заживления ран, их длительному незаживлению и/или неполной репарации [9, 10]. Часто это связано с изменением фиброгенеза, образованием не рыхлой, а плотной волокнистой соединительной ткани, не способной адекватно участвовать в выполнении функций кожи [11–13]. Механизмы фиброгенеза могут быть нарушены в связи с генетическими дефектами у пациентов, но в основном из-за наличия у них соматической патологии, приводящей к локальной гипоперфузии и гипоксии в связи с поражением микрососудов и/или нервных структур в регионе раны. Чаще всего эти нарушения наблюдаются во второй половине жизни. Именно поэтому исследование данной проблемы *in vivo* целесообразно проводить на животных зрелого, пожилого и старческого возраста.

Цель исследования – выявление особенностей динамики заживления кожной раны у экспериментальных крыс зрелого возраста (9 мес); сравнение эффективности зарегистрированных и широко применяющихся в клинической практике стимуляторов регенерации тканей: депротеинизированного гемодеривата крови телят и коллагена.

Экспериментальное проспективное рандомизированное пилотное контрольно-сравнительное слепое исследование выполнено на белых крысах-самцах Wistar одного возраста (9 мес) массой $443,6 \pm 6,5$ г; (95ДИ 395–475 г). Исследование было слепым – гистологи не были информированы о группах эксперимента и работали с маркированным материалом.

Моделирование ран. После наркотизации животных (хлоралгидрат 300 мг/кг внутривентриально) на спине крыс выбривали кожу и создавали раны стандартизированного размера¹ – квадратная рана с длиной каждой стороны 11 мм, глубиной примерно 2 мм (до фасции).

Группы и исследованные препараты. В работе представлен анализ данных по 3 группам ран: 1-я группа – Контрольные раны (физиологический раствор 0,9% NaCl);

2-я – группа Коллаген (для лечения использовали препарат Коллост 7%),

3-я – группа ДГК (для лечения применяли депротеинизированный гемодериват крови телят, препарат Актовегин). Оба инъекционных стимулятора регенерации тканей зарегистрированы в РФ и широко применяются в клинической практике. В день моделирования ран (0-е сутки), сразу после проведения их измерения, инъецировали соответствующие рандомизации растворы по единой методике: единым проколом в угол раны вводили по 0,1 мл раствора исследуемого вещества в дерму латерально-каудального края раны. Для минимизации травматизации раны использовали тонкие иглы инсулинового шприца. Физиологический раствор и препарат Коллост (7% нативный нереконструированный коллаген в 10% стерильном растворе глюкозы) вводили однократно в день моделирования раны (0-е сутки). Актовегин (раствор

¹Патент РФ на полезную модель №79701/10.01.09.

для инъекций, 40 мг/мл), помимо 0-х суток, дополнительно вводили на 1-е и 3-и сут внутримышечно в дозе 0,2 мл.

Выведение животных из эксперимента. После наркотизации (хлоралгидрат 300 мг/кг внутривенно) и завершения исследования животных выводили из опыта, проводя вскрытие правого желудочка сердца.

Этическая экспертиза. 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. Исследование одобрено Региональным этическим комитетом ФГБОУ ВО Курский ГМУ МЗ РФ (протокол №5).

Условия проведения. Крысы в течение всего эксперимента содержались в стандартных условиях вивария. До начала эксперимента животных выдерживали в этих условиях в течение 2 нед. Сразу после рандомизации крыс содержали в индивидуальных клетках, что позволяло избежать дополнительного воздействия на раны других животных.

Методы исследования и контрольные точки. Определены 6 контрольных точек исследования: 0-е сутки (моделирование ран, проведение измерений и инструментальных исследований, а также лечение ран в экспериментальных группах); на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е и 14-е сут выполняли осмотр, взвешивание животных и оценку динамики размеров и состояния ран, а в дни вывода (3-и, 7-е, 14-е сут) проводили инструментальные исследования и подготовку ран для последующей морфометрии.

На каждой точке исследования проводили фотодокументирование ран (Canon EOS550D, Япония, расстояние до объекта 30 см ± до 10%, формат Jpeg). Рядом с раной в кадре размещали миллиметровую линейку для последующего определения размеров: длина раны (параллельная линия от головы до хвоста, мм), ширина раны (по фронтальной плоскости, мм). Площадь раны (в мм²), точно ограниченная ее краями, рассчитывалась с помощью программы JMicroVision 1.2.7 (Швейцария). Определяя планиметрические размеры ран, оценивали периоды, а также направленность процесса заживления ран. Горизонтальным считали заживление, когда ширина раны сокращалась в большей степени, чем их длина, а вертикальным — когда в большей степени заживление раны происходило по ширине.

На 0, 3-и, 7-е, 14-е сут определяли объем раны и оценивали состояние микрогемодинамики.

Объем раны определяли в см³ при помощи изготовленного и откалиброванного до начала эксперимента каплемера (объем одной капли 0,051 см³). Нар-

котизированное животное располагалось так, чтобы рана находилась в горизонтальной плоскости, при помощи каплемера рана по одной капле наполнялась стерильной дистиллированной водой до появления выпуклого мениска над краями раны.

Для исследования состояния микрогемодинамики использовали аппаратно-программный комплекс для электрофизиологических исследований MP150 (BIOPAC Systems, Inc, США), который включает модуль для лазер-доплеровской флоуметрии LDF100C, датчик игольчатый для лазер-доплеровской флоуметрии TSD145 и программное обеспечение AcqKnowledgeversion 4.4.1. Комплекс фиксирует наличие сдвига частоты отраженного сигнала и в соответствии с разработанными производителем прибора алгоритмами программной обработки сигнала переводит их в перфузионные единицы (BPU = Blood Perfusion Units). Для каждой раны измерение проводили в 4 точках, расположенных на коже по центру каждой из 4 сторон стандартной квадратной раны. На область кожи (по центру каждой из сторон квадратной раны) на расстоянии 2 мм снаружи от края раны устанавливался перпендикулярно коже игольчатый датчик TSD145 при помощи держателя. Итоговый показатель микроперфузии ткани вокруг раны представлял собой его усредненную величину по 4 сторонам каждой раны.

Фоновая однородность групп и размер выборки. Изучали по 7 ран в группе на каждой точке исследования. Животные были изначально рандомизированы по возрасту и полу, группы по массе тела. Исходная площадь исследуемых ран в момент их моделирования была одинаковой в исследуемых группах и в среднем (медиана) составили 128,1 мм² в группе «Контроль», 129,5 мм² в группе «Коллаген» и 126,0 мм² в группе «ДГК» ($p>0,05$). Статистически сопоставимыми на 0-е сут также были длина, ширина ран и их объем. Уровень микроциркуляции, определяемый в течение первых минут после моделирования ран, был одинаковым в исследуемых группах, составив в среднем 122,3 п.ед. в группе «Контроль», 124,2 п.ед. в группе «Коллаген» и 118,1 п.ед. в группе «ДГК» ($p>0,05$). Фоновая сопоставимость всех изучаемых в динамике показателей дает обоснованное право на проведение адекватного сравнительного анализа на протяжении всего исследования.

Статистический анализ результатов исследования проведен с использованием программы SPSS 23.0 с применением стандартных параметрических и непараметрических критериев оценки статистической значимости различий. Описательная статистика непрерывных количественных данных представлена в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, а

также в виде медианы (Me), значений нижнего (25%) и верхнего (75%) квартилей, 95%-доверительного интервала (95ДИ). Для сравнения двух независимых непараметрических выборок использовали критерий Манна-Уитни, двух зависимых - критерий Вилкоксона. Качественные переменные сравнивались с помощью теста χ^2 (анализ таблиц сопряженности). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты оценки линейных размеров и площади ран. В ходе исследования динамики площади ран было установлено, что через 24 ч от момента моделирования площадь ран у животных группы «Контроль» значимо увеличилась в среднем в 1,19 раза ($p = 0,001$). Она сохранялась на 3-и сут на значимо более высоком, чем в 0-е сутки, уровне ($p < 0,01$), и до 7-х сут площадь ран группы «Контроль» статистически не отличалась от первоначального размера. Лишь на 14-е сут эксперимента зарегистрирован значимый регресс площади контрольных ран в среднем в 4,95 раза относительно исходного размера ($p < 0,05$). Таким образом, при имитировании местной инъекционной анестезии, выполняемой при хирургической обработке ран, путем введения 0,9% NaCl регистрировали период значимого расширения площади ран на 1-е – 3-и сут, период стабилизации площади ран с возвратом к исходным размерам на 5-е – 7-е сут. Только со 2-й нед выявлено 5-кратное уменьшение площади контрольных ран, достигшее к 14-м сут в среднем 25,9 мм² (колебание в пределах от 12,1 мм² до 34,6 мм²).

Площадь ран группы «ДГК» была значимо больше относительно 0-х суток в среднем в 1,19 раза на 1-е сут ($p < 0,001$) и в 1,12 раза на 3-и сут ($p = 0,016$). К 5-м сут площадь ран группы «ДГК» была незначительно (в 1,08 раза) больше по сравнению с исходным размером ($p = 0,476$). На 7-е сут площадь ран этой группы существенно регрессировала: в 1,27 раза ($p = 0,011$), а к 14-м сут площадь ран сократилась в среднем в 8,34 раза ($p < 0,001$). Таким образом, при использовании ДГК площадь ран значимо расширялась на 1-е–3-и сут, на 5-е сут она вернулась к исходным размерам (характеризуя стабилизацию и завершение фазы воспаления), как это было зарегистрировано и для контрольных ран. Однако в отличие от ран у животных группы «Контроль», площадь ран в группе «ДГК» начала значимо сокращаться с 7-х сут, достигнув к 14-м сут в среднем 15,1 мм². Сравнительный анализ этого показателя в группах «Контроль» и «ДГК» на 14-е сут установил статистически значимое различие в 1,71 раза, демонстрируя преимущество применения ДГК ($p = 0,024$), несмо-

тря на больший диапазон показателя площади в группе «ДГК» на 14-е сут (от 8,4 мм² до 42,9 мм²).

Площадь ран, для лечения которых применяли Коллаген, не имела периода ее статистически значимого расширения. На 1-е сут она была всего в 1,02 раза больше исходного размера ($p = 0,569$), а на 3-и сут – в 1,06 раза ($p = 0,202$). Следовательно, площадь ран группы «Коллаген» уже на 1-е сут исследования была наименьшей. Площадь ран группы «Контроль» была в 1,15 раза больше ($p = 0,001$) группы «ДГК» и в 1,14 раза больше ($p = 0,011$), чем в группе «Коллаген». Кроме того, в группе «Коллаген» наблюдалось самое раннее начало уменьшения площади ран, значимо отличающееся от исходного размера уже на 5-е сут, а также наиболее выраженное сокращение размеров ран к 7-м и 14-м сут. К концу 2-й нед исследования площадь составила 10,9 мм², колеблясь в самых низких пределах: от 1,0 мм² до 18,4 мм². Площадь ран группы «Коллаген» по сравнению с группой «Контроль» помимо 1-х сут статистически значимо различалась на 7-е сут (в 1,36 раза, $p = 0,003$), а также в 2,38 раза на 14-е сут ($p = 0,0001$).

Сравнительный анализ динамики изменения площади ран групп «Коллаген» и «ДГК» показал преимущество использования препарата «Коллаген», как на 1-е, так и на 14-е сут, когда раны группы «ДГК» были в среднем в 1,39 раза больше, чем в группе «Коллаген» ($p = 0,031$).

Таким образом, наиболее динамичным процесс заживления ран был в группе «Коллаген» (табл. 1).

Анализ динамики длины и ширины ран позволил установить различия между группами и показал важность учета направлений линий хирургических разрезов в зависимости от планируемого в дальнейшем лечения с целью потенцирования заживления. В течение 24 ч от момента моделирования ран длина их в контроле значимо увеличилась в среднем в 1,2 раза (с 10,3 мм до 12,3 мм, $p = 0,0001$), к 3-м сут она уменьшилась относительно 1-х сут до 12,0 мм, оставаясь значимо (в 1,17 раза) выше, чем в 0-е сутки ($p = 0,001$). На 5-е сут длина контрольных ран сократилась до 11,4 мм, что в 1,11 раза больше, чем на «0 сут» эксперимента ($p = 0,002$). На 7-е сут исследования длина ран группы «Контроль» соответствовала первоначальным размерам, составив 10,4 мм ($p > 0,05$). К концу 2-й нед длина ран группы «Контроль» значимо сократилась до 5,5 мм, став на 45,5% меньше (на 4,8 мм), чем в день моделирования ($p = 0,0001$).

Ширина ран группы «Контроль» значимо увеличилась в период с 0-х по 1-е сут в среднем с 11,9 мм до 12,7 мм ($p = 0,007$), оставаясь на этом же уровне и на 3-и сут. На 5-е сут ширина контрольных ран несколь-

ко сократилась (до 12,4 мм), на 7-е сут ширина ран в группе «Контроль» в среднем составила 11,3 мм, что значимо не отличалось от 0-х суток ($p>0,05$). Только на 14-е сут ширина контрольных ран была значимо меньше исходной в среднем в 2,38 раза, составив 5,0 мм ($p=0,001$).

Таким образом, при инъекционном введении в рану физиологического раствора на момент ее моделирования и при отсутствии в последующем лечения длина таких ран вначале нарастала (период увеличения раны) вплоть до 5-х сут, после чего к 7-м сут длина стала такой же как на 0-е сутки (период перехода фазы воспаления в фазу регенерации раны). Ширина ран группы «Контроль» увеличивалась в течение первых 3 сут, возвращаясь к первоначальному размеру в период 5-е–7-е сут. Важно отметить, что увеличение размера ран происходило перпендикулярно линиям напряжения кожи (линии Лангера). Это свидетельствует о важном значении учета направления линий разреза кожи и наложения швов.

К 14-м сут длина и ширина ран у животных группы «Контроль» значимо сократились в 1,83 и 2,34 раза соответственно в сравнении с исходными. Следовательно, в контрольной группе ширина ран в динамике сокращалась в большей степени, чем длина, то есть заживление контрольных ран было преимущественно горизонтальным.

Длина ран группы «ДГК» в среднем на 0, 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 14-е сут составила 10,4 мм, 12,2 мм, 11,1 мм, 10,9 мм, 10,1 мм, 4,5 мм, соответственно. Установлено, что применение ДГК привело к статистически значимому увеличению длины ран в течение первых 24 ч в среднем в 1,17 раза ($p=0,001$) с сохранением увеличенного размера до 3-х сут ($p=0,021$). На 5-е сут в этой

группе длина ран вернулась к исходному размеру и на 7-е сут исследования она также статистически значимо не отличалась от 0-х суток ($p>0,05$). Только на 14-е сут выявлен значимый регресс длины ран в группе «ДГК» в среднем в 2,30 раза ($p=0,001$). В целом за 14 суток длина ран уменьшилась в среднем на 56,4% (на 7,9 мм). В отличие от контрольных ран в группе «ДГК» период увеличения их длины был короче на 2 суток. В результате на 14-е сут длина контрольных ран была больше в 1,22 раза, чем в группе животных с применением ДГК ($p>0,05$). Однако статистически значимых различий показателей длины ран между группами «ДГК» и «Контроль» не выявлено на протяжении всего исследования.

Длина ран группы «Коллаген» в среднем на 0, 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 14-е сут составила 10,8 мм, 10,1 мм, 10,9 мм, 10,5 мм, 8,8 мм, 3,4 мм, соответственно. Длина ран этой группы значимо не менялась в период с 0-е по 5-е сут, а на 7-е сут она статистически значимо уменьшилась. Так, на 0 сутки исследования длина ран была больше, чем на 7-е и 14-е сут в среднем в 1,23 раза ($p=0,001$) и в 3,15 раза ($p=0,001$) соответственно. В целом за 14 сут регресс длины ран составил в среднем 68,2% (на 7,4 мм) от исходного размера.

В отличие от группы «ДГК» по показателю длины ран зарегистрировано статистически значимое различие в сравнении с группой крыс «Контроль» на протяжении всего исследования с 1-х по 14-е сут: в 1,22 раза на 1-е сут ($p=0,0001$), в 1,10 раза на 3-и сут ($p=0,001$), в 1,09 раза на 5-е сут ($p=0,009$), в 1,18 раза на 7-е сут ($p=0,002$) и в 1,61 раза на 14-е сут ($p=0,0001$). Кроме того, статистически значимое различие длины ран между группами «ДГК» и «Коллаген» выявлено на 1-е сут исследования (в среднем длина ран была в 1,21 раза

Таблица 1

Динамика площади ран при применении «Коллагена» и «ДГК» в сравнении с физиологическим раствором натрия хлорида (мм²)

Сутки	Контроль, 0,9%NaCl(0)	Коллаген	ДГК	p (0/Кол)	p (0/ ДГК)	p (Кол/ ДГК)
1-е	151,8 ## [137,4 - 159,8]	131,7 [121,6 - 147,6]	150,4 ## [129,6 - 169,0]	0,001*	0,948	0,011*
3-и	145,3 # [128,4 - 157,7]	137,0 [122,7 - 150,9]	139,6 # [109,7 - 146,6]	0,213	0,276	0,302
5-е	135,4 [107,9 - 145,0]	122,5 (#) [112,7 - 133,1]	125,3 [106,4 - 114,2]	0,110	0,345	0,950
7-е	115,4 [96,8 - 125,3]	84,7 ## [71,6 - 99,2]	91,1 # [70,3 - 111,9]	0,003*	0,099	0,660
14-е	25,9 ## [18,4 - 29,0]	10,9 ## [8,1 - 17,1]	15,1 ## [11,7 - 25,7]	0,001*	0,024*	0,031*

Примечание. Данные представлены в виде: медианы (1-я строка), 25%- 75% квартилей (2-я строка). * – различие между группами при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни); # – различие динамики связанного показателя в пределах отдельной группы относительно 0-х суток при $p < 0,05$; ## – при $p < 0,01$ (критерий Вилкоксона).

больше в группе «ДГК», $p=0,001$) и на 14-е сут (в 1,32 раза больше в группе «ДГК», $p=0,019$), что свидетельствует о существенном преимуществе применения Коллагена для потенцирования процесса заживления ран в сравнении с препаратом ДГК (рис. 1).

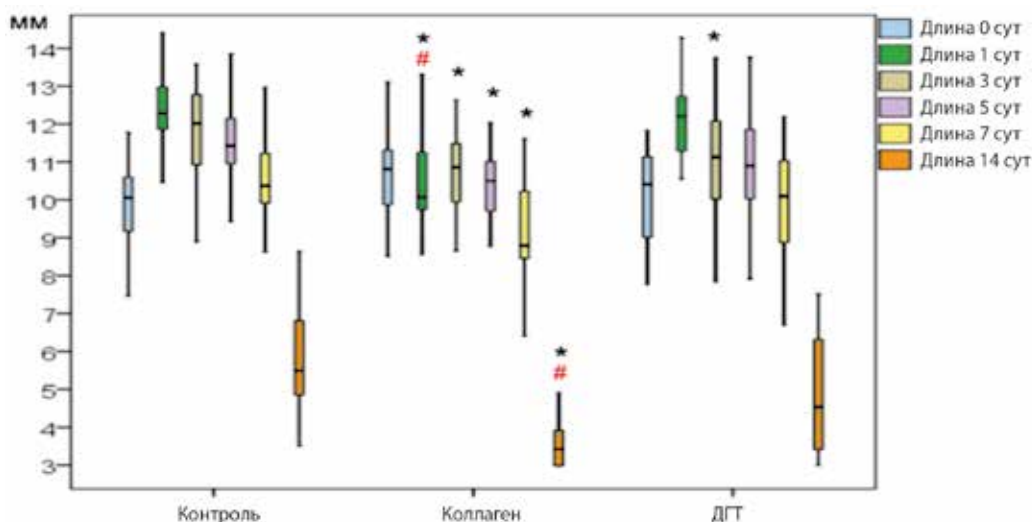
Ширина ран у крыс группы «ДГК» на 0, 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 14-е сут составила 11,9 мм, 13,4 мм, 11,9 мм, 11,5 мм, 9,9 мм, 4,50 мм, соответственно. Установлено, что применение «ДГК» сопровождалось статистически значимым увеличением ширины ран на 1-е сут в 1,13 раза ($p=0,001$). На 3-и и 5-е сут этот показатель соответствовал первоначальным размерам. Значимое уменьшение ширины ран в группе «ДГК» зарегистрировано с 7-х сут, на 0-е сутки исследования ширина была больше, чем на 7-е сут в 1,20 раза ($p=0,007$) и чем на 14-е сут в 2,64 раза ($p=0,001$). В целом за 14 сут ширина ран уменьшилась на 62,2% (на 7,4 мм) от исходной. Статистически значимых различий ширины ран в группах «ДГК» и «Контроль» не было.

Ширина ран группы «Коллаген» на 0, 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 14-е сут составила 12,9 мм, 13,5 мм, 13,6 мм, 12,7 мм, 10,8 мм, 4,15 мм, соответственно. Существенно ширина ран этой группы не изменилась в период с 0 по 5-е сут, значимо уменьшалась она лишь на 7-е сут в среднем в 1,19 раза ($p=0,001$) и на 14-е сут в 3,11 раза ($p=0,001$). Итог за 14 сут – регресс ширины ран в группе «Коллаген» 67,8% (на 8,8 мм). Установлено значимое различие по ширине ран между группами «Контроль» и «Коллаген» на 14-е сут в 1,20 раза ($p=0,012$).

Таким образом, за 14 сут эксперимента длина ран в группе «Коллаген» сократилась в 3,15 раза (68,2%), а ширина – в 3,11 раза (67,8%), конечные средние размеры составили 3,43 мм (длина) и 4,15 мм (ширина). Следовательно, при использовании «Коллагена» заживление ран протекает преимущественно вертикально. При использовании «ДГК» за 14 сут длина ран сократилась в 2,30 раза (56,4%), ширина – в 2,64 раза (62,2%). И хотя итоговые размеры были сопоставимы (по 4,5 мм), более значимое сокращение ширины ран позволяет заключить, что при использовании «ДГК» заживление ран преимущественно горизонтальное, как и в контрольных ранах.

Динамика объема ран. В ходе исследования динамики объема ран установлено преимущество введения в рану раствора Коллагена. Это позволило на самых ранних сроках заживления сократить глубину ран (табл. 2).

На 3-и сут объем ран в группе «Контроль» был в среднем в 2,10 раза больше, чем в группе «Коллаген» ($p=0,001$), на 7-е сут больше в 7,77 раза ($p=0,0001$). Показатель глубины ран в группе «ДГК» на всех точках исследования статистически был сопоставим с объемами ран группы «Контроль». Применение же «Коллагена» позитивным образом отразилось на динамике показателя объема ран: статистически значимые различия зарегистрированы на 3-и и 7-е сут не только с группой «Контроль», но и с группой «ДГК». Объем ран при использовании «ДГК» был на 3-и сут в 2,05 раза больше ($p=0,022$), а на 7-е сут – в 6,77 раз больше, чем в группе «Коллаген» ($p=0,020$).



Динамика показателя длины ран (в мм) при применении «Коллагена» и «ДГК» в сравнении с физиологическим раствором; * – отличие показателя от группы «Контроль» ($p<0,05$); # – различие между группами «Коллаген» и «ДГК» ($p<0,05$); критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования состояния микроциркуляции в коже по краю раны. Объем перфузии микрососудов в коже вокруг раны (2 мм от ее края) в течение первых минут после моделирования раны был одинаковым во всех исследуемых группах, однако в дальнейшем он изменялся по-разному при применении «Коллагена» и «ДГК» (табл. 3).

На 3-и сут только в группе «ДГК» установлено увеличение объема кровотока в сосудах микрогемодинамики кожи вокруг раны по сравнению с фоновыми данными. В других группах объем микроциркуляции оставался без изменений и имел тенденцию к снижению у крыс в группах «Контроль» (в 1,07 раза, $p > 0,05$) и «Коллаген» (в 1,05 раза, $p > 0,05$). Так, в группе «ДГК» уровень микрогемодинамики в коже вокруг раны на 3-и сут значительно увеличился (в 1,17 раза) по сравнению с ее объемом на 0 сут. Именно в микрососудах кожи вокруг ран группы «ДГК» был самый высокий объем перфузии крови на 3-и сут. Это было в 1,17 раза больше, чем в группе «Коллаген» ($p < 0,05$), а также в 1,20 раза больше, чем в группе «Контроль». Однако за счет вариабельности показателя микроциркуляции в группе «Контроль» статистически значимых различий не выявлено.

На 7-е сут объем микроциркуляции в коже вокруг раны повысился относительно фоновых значений и по сравнению с 3-и сут во всех группах, кроме «ДГК». В

группе «ДГК» уровень перфузии снизился относительно 3-х сут в среднем в 1,10 раза, хотя и был в среднем в 1,06 раза больше, чем на 0 сутки ($p > 0,05$). В наибольшей степени показатель уровня микроциркуляции на 7-е сут вырос в группе «Коллаген» (в среднем в 1,43 раза, $p < 0,05$). Самым низким уровень перфузии в коже вокруг раны на 7-е сут был в группе «ДГК». Установлены статистически значимые различия по показателю объема перфузии между группами «Контроль» и «Коллаген» (в группе «Коллаген» объем перфузии оказался больше в 1,33 раза, $p < 0,05$), а также между группами «Коллаген» и «ДГК» (в группе «Коллаген» перфузия была больше в 1,42 раза, $p < 0,05$).

Таким образом, на 7-е сут увеличение объема микроциркуляции было зарегистрировано у животных только в группе «Коллаген».

Показатель перфузии микрососудов кожи вокруг раны на 14-е сут во всех группах был статистически значимо выше, чем на момент моделирования ран. Наибольшим он был в группе «Коллаген» (в среднем 268,7 п. ед). Именно в этой группе было отмечено наибольшее увеличение перфузии микрососудов кожи вокруг раны – в 2,15 раза ($p < 0,01$) относительно 0-х суток. В группе «ДГК» к 14-м сут уровень микроперфузии повысился относительно 0 суток в среднем в 1,79 раза ($p < 0,01$), в группе «Контроль» – в 1,64 раза ($p < 0,01$). Установлено, что в группе «Коллаген» уро-

Таблица 2

Динамика объема ран при применении «Коллагена» и «ДГК» в сравнении с физиологическим раствором натрия хлорида (см³)

Сутки	Контроль, 0,9%NaCl(0)	Коллаген	ДГК	p (Кол/ДГК)
3	0,313±0,060 0,306 [0,192-0,434]	0,149±0,041 0,102* [0,088-0,243]	0,306±0,033 0,281 [0,270-0,294]	0,022
7	0,171±0,025 0,199 [0,102-0,217]	0,022±0,021 0,010 * [0,00-0,051]	0,149±0,039 0,128 [0,101-0,204]	0,020

Примечание. * – различие с группой «Контроль» (0-е сутки), $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Таблица 3

Динамика микрогемодинамики в коже края раны при применении «Коллагена» и «ДГК» в сравнении с физиологическим раствором натрия хлорида (в перф.ед.)

Сутки	Контроль, 0,9%NaCl(0)	Коллаген	ДГК	p (Кол/ДГК)
0	122,3 [98,4-141,6]	124,2 [104,8-135,0]	118,1 [92,6-122,8]	0,159
3-и	114,8 [107-141]	117,9 [105-124]	138,2 # [121-169]	0,047
7-е	133,4 [129-147]	177,7 * # [146-204]	125,1 [111-160]	0,049
14-е	211,0 # [201,0-263,5]	268,7 # [238,2-276,9]	208,0 # [148,1-220,5]	0,025

Примечание. Медиана (1-я строка), нижний /верхний квартиль (2-я строка).

* $p < 0,05$ – различие с группой «Контроль» (0-е сутки) (критерий Манна-Уитни);

$p < 0,05$ – различие динамики связанного показателя в пределах отдельной группы относительно 0-х суток (критерий Вилкоксона).

вень микроциркуляции был в 1,29 раза больше, чем в группе «ДГК» ($p < 0,05$).

Таким образом, выявлен факт увеличения объема микрогемодикуляции в коже края раны на 3-и сут только в группе «ДГК», на 7-е сут только в группе «Коллаген», на 14-е сут – во всех группах, при этом наибольший эффект наблюдался в группе «Коллаген».

Обсуждение

Исследование выявило эффективность обоих инъекционных стимуляторов регенерации, применение которых позволило ускорить процесс заживления ран. Вместе с тем скорость и результат заживления ран при применении «ДГК» и «Коллагена» различались. Это может быть связано с разными механизмами их действия, что нужно учитывать во врачебной практике. Наибольшая эффективность была достигнута при применении «Коллагена». Если площадь ран группы «Контроль» сократилась за 7 сут в 1,1 раза, а за 14 сут – в 5,0 раз, то раны группы «ДГК» в большей мере: в 1,4 и 8,3 раза соответственно, а раны группы «Коллаген» – еще более значимо: в 1,5 и 11,9 раза соответственно.

Важно, что использование «ДГК» обеспечивало горизонтальное заживление ран, как и в контроле, а при применении «Коллагена» оно было вертикальным. Это может стать основой для разработки методов контроля толщины и эстетичности послеоперационного рубца, чему будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Как показало исследование, площадь ран у животных групп «Контроль» и «ДГК» увеличивалась в первые 3-5 сут. Далее следовал период стабилизации размеров ран, означающий смену фазы воспаления на фазу регенерации, с возвратом к исходным размерам на 5-е – 7-е сут в группе «Контроль» и на 5-е сут в группе «ДГК». Установлено также удлинение ран, которое происходило перпендикулярно линиям напряжения кожи (линиям Лангера). Это аргументирует необходимость учета направлений указанных линий при выполнении хирургических разрезов и последующем наложении швов на рану. В период предоперационного планирования манипуляций на коже важно определять не только направление кожных линий напряжения, но и хирургических разрезов, что имеет значение для последующего управления процессом заживления ран. Это может способствовать сокращению сроков регенерации, уменьшению размеров послеоперационного рубца и повышению его эстетичности.

Применение «Коллагена» (препарат Коллост) оказалось наиболее эффективным, так как позволило не только устранить период послеоперационного увели-

чения площади ран, но и ускорить процесс их заживления, сразу сократив объем ран. Значимое сокращение размеров ран уже с 3-х сут может свидетельствовать о более раннем и эффективном процессе регенерации. Введенный однократно в рану гель коллагена в процессе ее хирургической обработки может быть более эффективным, чем сосудистые и метаболические стимуляторы регенерации ткани, вводимые многократно. Это достигается в связи с отсутствием необходимости создавать и стимулировать в ране рост межклеточного матрикса. Вместо этого в рану может быть принесена его коллагеновая основа. Заполнение раны коллагеном позволяет уменьшить ее глубину, а, следовательно, и масштаб воспалительного ответа. В амбулаторной практике это позволит увеличить сроки между перевязками и уменьшить нагрузку на пациента и медицинский персонал.

Более низкая эффективность «ДГК» (препарат Актотевин) может быть обусловлена отсутствием ишемии ткани в ходе нашего эксперимента, в которой это средство реализует свой эффект действия. Последнее подтверждается наличием при использовании «ДГК» сосудистой реакции с повышением объема микроциркуляции в большей мере, чем в других группах на 3-и сут эксперимента. Однако этот эффект был кратковременным и существенно не влиял на итог заживления. Причина и следствия этого явления требуют дальнейшего изучения.

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о различной эффективности применяемых в настоящее время в клинической практике ранозаживляющих средств. При выборе средства, способствующего регенерации, необходимо учитывать как направление разрезов кожи и слизистых, так и будущее формирование рубца. Последнее в существенной мере зависит от механизмов собственно регенерации и, в связи с высокими требованиями к эстетичности рубца, следует склоняться к средствам, имеющим белковые универсальные межклеточные конструкции, в частности препаратам коллагена.

Литература/References

1. Antonopoulos C.N., Lazaris A., Venermo M., Geroulakos G. Predictors of Wound Healing Following Revascularization for Chronic Limb-Threatening Ischemia. *Vasc Endovascular Surg.* 2019;12:1538574419868863. <https://doi.org/10.1177/1538574419868863>
2. Han G., Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther.* 2017; 34(3): 599-610. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>

3. Rosberg H.E., Dahlin L.B. An increasing number of hand injuries in an elderly population - a retrospective study over a 30-year period. *BMC Geriatr.* 2018; 18(1): 68. <https://doi.org/10.1186/s12877-018-0758-7>
4. Aghdash S., Aghaei M.H., Sadeghi-Bazarghani H. Epidemiology of Road Traffic Injuries among Elderly People; A Systematic Review and Meta-Analysis. *Bull Emerg Trauma.* 2018; 6(4): 279-91. <https://doi.org/10.29252/beat-060403>.
5. Baron J.M., Glatz M., Proksch E. Optimal Support of Wound Healing: New Insights. *Dermatology.* 2020; 17: 1-8. <https://doi.org/10.1159/000505291>.
6. Cai Y.L., Ju J.T., Liu W.B., Zhang J. Military trauma and surgical procedures in conflict area: a review for the utilization of forward surgical team. *Mil Med.* 2018; 183: e97–e106. <https://doi.org/10.1093/milmed/usx048>
7. Eming S.A., Martin P., Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6: 1–16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
8. Landen N.X., Li D., Stähle M. Transition from inflammation to proliferation: A critical step during wound healing. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; 73(20): 3861-85. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>
9. Stupin V.A., Gabitov R.B., Sinelnikova T.G., Silina E.V. Biological mechanisms of the chronic wound and diabetic foot healing: The role of collagen. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research.* 2018; 19(4): 373-82. <https://doi.org/10.2478/SJECR-2018-0077>
10. Nosenko M.A., Ambaryan S.G., Drutskaya M.S. Proinflammatory Cytokines and Skin Wound Healing in Mice. *Molecular Biology.* 2019; 53: 653–64. <https://doi.org/10.1134/S0026893319050121>
11. Wick G., Grundtman C., Mayerl C., Wimpfissinger T.F., Feichtinger J., Zelger B. et al. The immunology of fibrosis. *Annu. Rev. Immunol.* 2013; 31: 107-35. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095937>
12. Walmsley G.G., Maan Z.N., Wong V.W., Duscher D., Hu M.S., Zielins E.R. et al. Scarless wound healing: Chasing the holy grail. *Plast. Reconstr. Surg.* 2015; 135(3): 907-17. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000000972>
13. Manturona N.E., Kononov A.V., Gorodilov R.V., Stupin V.A., Litvitsky P.F., Silina E.V. Age dependent changes of cell update markers and endothelial activity related to the involutionary transformations of the skin system. *Biomedical Research.* 2018; 29(20): 3684-7. <https://doi.org/10.4066/biomedicalresearch.29-18-815>

Сведения об авторах:

Силина Екатерина Владимировна, доктор мед. наук, проф., каф. патологии человека Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, e-mail: silinaekaterina@mail.ru;

Мантурова Наталья Евгеньевна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. пластической и реконструктивной хирургии, косметологии и клеточных технологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова;

Артюшкова Елена Борисовна, доктор мед. наук, проф., директор НИИ экспериментальной медицины ФГБОУ ВО Курский ГМУ Минздрава России;

Литвицкий Петр Францевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, член-корр. РАН;

Васин Виталий Иванович, ст. лаборант и соискатель каф. госпитальной хирургии № 1 лф РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Синельникова Татьяна Георгиевна, канд. мед. наук, доцент каф. патологии человека Первого МГМУ им. И.М. Сеченова;

Гладченко Михаил Петрович, канд. фарм. наук, ст. науч. сотр., НИИ Экспериментальной медицины Курский ГМУ,

Крюков Алексей Анатольевич, канд. мед. наук, доцент, ст. науч. сотр. НИИ Экспериментальной медицины Курский ГМУ;

Ашиканов Александр Васильевич, науч. сотр. НИИ Экспериментальной медицины Курский ГМУ, аспирант;

Каплин Антон Николаевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. НИИ Экспериментальной медицины Курский ГМУ;

Наимзада Мухамад Давид Зияуддин, мл. науч. сотр. НИИ Экспериментальной медицины Курский ГМУ;

Ступин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. госпитальной хирургии № 1 лф РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.12-008.331.1

Кузник Б.И.^{1,2}, Смоляков Ю.Н.^{1,2}, Гусева Е.С.¹, Давыдов С.О.^{1,2}, Файн И.В.³

Влияние умеренной физической нагрузки на взаимосвязь вариабельности сердечного ритма с уровнем кровяного давления и гемодинамическими функциями у женщин, страдающих гипертонической болезнью

¹ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия»,

672000, г. Чита, Россия, ул. Горького, д. 39а;

²Инновационная клиника «Академия здоровья»,

672038, г. Чита, Россия, ул. Коханского, д. 13;

³НПО «Элфи-Тек»,

76705, Израиль, Реховот, ул. проф. Бергмана, д. 2

Цель исследования – выявление взаимосвязи между показателями вариабельности сердечного ритма (BCP), кровяным давлением и гемодинамическими функциями у женщин, страдающих гипертонической болезнью (ГБ) и находящихся на медикаментозной терапии (ГБ-1), либо в дополнение к этому, проходящих регулярные курсы кинезитерапии (ГБ-2).

Методика. Наблюдения проведены на 72 женщинах, страдающих артериальной гипертензией II стадии. В группу ГБ-1 вошли 37 женщин с ГБ, находящихся на медикаментозной терапии, в группу ГБ-2 – 35 женщин с ГБ, которые, помимо медикаментозной терапии, регулярно проходили на протяжении 2–3 лет по 3–4 полуторамесячных курса кинезитерапии (управляемые умеренные физические нагрузки). Для изучения гемодинамики был использован датчик динамического рассеяния света (miniature Dynamic Light Scattering – mDLS) от Elfi-Tech (Rehovot, Israel), измеряющий сигналы, инициированные кожным кровотоком, и использующий методику разложения сигнала на частотные компоненты, связанные с разными гемодинамическими источниками. Из пульсовой компоненты mDLS сигнала извлекалась информация о вариабельности RR-интервалов и рассчитывались индикаторы вариабельности сердечного ритма. Введен показатель «гемодинамический индекс» (Hemodynamic Index – HI). Зависимость HI от скорости сдвига интерпретируется путем сопоставления каждой полосе частот определенной скорости сдвига (HI1 – низкочастотный, HI2 – промежуточный, HI3 – высокочастотный). Используются следующие относительные (RHI, Relative Hemodynamic Index) и осцилляторные (OHI, Oscillatory Hemodynamic Indexes) гемодинамические индексы: нейрологический (NEUR), Майера (MAYER), дыхательный (RESP) и пульсовой (PULSE). BCP показатели включали: HR (Heart Rate), PWR (Power) – общую мощность колебаний, LF (Low Frequency), HF (High Frequency), SDNN (Standard Deviation of the Normal-to-Normal), RMSSD (Root Mean Square of the Successive Differences), а также индексы: CVI (Cardiac Vagal Index) и CSI (Cardiac Sympathetic Index).

Результаты. У женщин, находящихся исключительно на медикаментозной терапии (ГБ-1), выявляются отрицательные взаимосвязи LF и LF/HF с систолическим, средним и пульсовым давлением. При ГБ-2 проявляются отрицательные связи PWR, LF, HF с пульсовым давлением. При ГБ-1 обнаружены положительные взаимосвязи между HR и гемодинамическими индексами HI1, RHI2 и отрицательная взаимосвязь с RHI3, а также между RMSSD и RHI3 и между HF и HI1/HI3. У пациенток ГБ-2 обнаружена отрицательная корреляция SDNN и RHI1, а также PWR и RHI1; положительные взаимосвязи между PWR и HI2, HI3, RHI2, HF и RHI3 и LF/HF с HI1/HI3; отрицательные связи HF с HI1/HI3 и с RHI1, а также между LF/HF и RHI3, CSI и RHI3. У больных ГБ-1 имеются прямые связи между SDNN, PWR, LF, HF, CVI и NEUR_HI1, что свидетельствует о действии этих факторов на эндотелиальный кровоток (HI1). В группе ГБ-2 установлено наличие лишь положительных связей между LF, HF и NEUR_HI3. У больных ГБ-1 на уровень АД влияют все без исключения осцилляторные ритмы, которые могут оказывать как отрицательное (с MAYER_HI1, PULSE_HI2), так и положительное (MAYER_HI2, RESP_HI3) влияние. У больных ГБ-2 взаимосвязи АД с осцилляторными индексами не обнаружены.

Заключение. Уменьшение в группе ГБ-2 по сравнению с больными группы ГБ-1 числа факторов, влияющих на АД и гемодинамику, носит более совершенный и благоприятный характер, что и обеспечивает более быструю и устойчивую нормализацию артериального давления.

Ключевые слова: гипертоническая болезнь; кинезитерапия; вариабельность сердечного ритма; кровяное давление; гемодинамические и осцилляторные индексы; корреляции.

Для цитирования: Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н., Гусева Е.С., Давыдов С.О., Файн И.В. Влияние умеренной физической нагрузки на взаимосвязь вариабельности сердечного ритма с уровнем кровяного давления и гемодинамическими функциями у женщин, страдающих гипертонической болезнью. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 64-73.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.64-73

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

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Кузник Б.И., Давыдов С.О., Файн И.В.; сбор и обработка материала – Гусева Е.С.; статистическая обработка – Смоляков Ю.Н.; написание текста – Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н.; редактирование – Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н., Гусева Е.С. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.02.2020

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Kuznik B.I.^{1,2}, Smolyakov Y.N.^{1,2}, Guseva E.S.², Davydov S.O.^{1,2}, Fine I.V.³

Effect of moderate physical exercises on the relationship of variability of the heart rhythm with the level of blood pressure and hemodynamic functions in women with essential hypertension

¹Chita State Medical Academy, Gorky Str. 39a, Chita 672000, Russia;

²Innovation Clinic "Academy of Health", Kokhanskogo Str. 13, Chita 672038, Russia;

³Elfi-Tech, Prof. Bergman St. 2, Rehovot 76705, Israel

Aim. To study the relationship between heart rate variability (HRV), blood pressure and hemodynamic functions in women with essential hypertension (EH) receiving a drug therapy alone (EH-1) or in combination with regular courses of kinesitherapy (EH-2).

Methods. The study included 72 women with EH. The EH-1 group consisted of 37 women with stage II arterial hypertension. The EH-2 group consisted of 35 women with stage II arterial hypertension who underwent 3-4 1.5-month courses of kinesitherapy (controlled moderate physical activity) on a regular basis for 2-3 years. Hemodynamics was studied with a miniature Dynamic Light Scattering (mDLS) sensor from Elfi-Tech (Rehovot, Israel), which measures signals initiated by the skin blood flow by decomposing the signal into frequency components associated with different hemodynamic sources. Information on the RR interval variability was extracted from the pulse component of mDLS signal, and indicators of heart rate variability were calculated. A Hemodynamic Index (HI) was introduced. The HI dependence on shear rate was interpreted by matching each frequency band with a specific shear rate (HI1, low-frequency; HI2, intermediate; HI3, high-frequency). The following relative (RHI, Relative Hemodynamic Index) and oscillatory (OHI, Oscillatory Hemodynamic Indexes) indexes were used: neurological (NEUR), Mayer (MAYER), respiratory (RESP), and pulse (PULSE) ones. The HRV indexes included HR (Heart Rate), PWR (Power, total oscillation power), LF (Low Frequency), HF (High Frequency), SDNN (Standard Deviation of the Normal-to-Normal), RMSSD (Root Mean Square of the Successive Differences), CVI (Cardiac Vagal Index), and CSI (Cardiac Sympathetic Index).

Results. In women who were on drug therapy alone (EH-1), negative relationships were found for LF and LF/HF with systolic, mean and pulse pressure. For EH-2, PWR, LF, and HF negatively correlated with pulse pressure. For EH-1, HR positively correlated with the hemodynamic indices HI1 and RHI2 and negatively correlated with RHI3; RMSSD negatively correlated with RHI3; and HF negatively correlated with HI1/HI3. For patients with EH-2, negative correlations were observed for SDNN and RHI1, PWR and RHI1; positive correlations were found between PWR and HI2; HI3, RHI2, HF and RHI3; and between LF/HF and HI1/HI3. HF negatively correlated with HI1/HI3 and with RHI1. LF/HF negatively correlated with RHI3, and CSI negatively correlated with RHI3. In patients with EH-1, SDNN, PWR, LF, HF, CVI, and NEUR_HI1 were directly related, which indicated an effect of these factors on the endothelial blood flow (HI1). In the EH-2 group, only positive correlations were found between LF, HF, and NEUR_HI3. In EH-1 patients, all oscillatory rhythms influenced BP; this influence could be both negative (for MAYER_HI1, PULSE_HI2) and positive (for MAYER_HI2, RESP_HI3). In EH-2 patients, no relationship was found between blood pressure and oscillatory indices.

Conclusion. The smaller number of factors influencing blood pressure and hemodynamics in the EH-2 group compared to the EH-1 group was more beneficial and favorable, which ensured faster and steadier normalization of blood pressure.

Keywords: essential hypertension; kinesitherapy; heart rate variability; blood pressure; hemodynamic and oscillatory indices; correlations.

For citation: Kuznik B.I., Smolyakov Y.N., Guseva E.S., Davydov S.O., Fine I.V. Effect of moderate physical exercises on the relationship of variability of the heart rhythm with the level of blood pressure and hemodynamic functions in women with essential hypertension. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 64-73. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.64-73

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

Contribution: research concept and design – Kuznik B.I., Davydov S.O., Fine I.V.; material collection and processing – Guseva E.S.; statistical processing – Smolyakov Y.N.; writing text – Kuznik B.I., Smolyakov Y.N.; editing – Kuznik B.I., Smolyakov Y.N., Guseva E.S. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:Kuznik B.I., <https://orcid.org/0000-0002-2502-9411>Smolyakov Y.N., <https://orcid.org/0000-0001-7920-7642>Guseva E.S., <https://orcid.org/0000-0001-6212-6571>Davydov S.O., <https://orcid.org/0000-0001-6690-7391>Fine I.V., <https://orcid.org/0000-0002-3237-1581>

Resived 02.02.2020

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Анализ variability сердечного ритма (ВСР) является простым и достаточно точным неинвазивным методом, позволяющим судить о состоянии вегетативной регуляции (симптовагусного баланса) на синусово-предсердном уровне. Более того, ВСР является независимым предиктором риска сердечно-сосудистых заболеваний. В частности, установлено, что уменьшение общей ВСР является важным прогностическим фактором тяжести течения любых заболеваний сердечно-сосудистой системы, в том числе и гипертонической болезни [1]. Следует обратить внимание на то, что ВСР при гипертонической болезни (ГБ) являлась предметом тщательного изучения. Было установлено, что большинство параметров, характеризующих сердечную деятельность, при ГБ оказались значительно сниженными [2], что обусловлено угнетением парасимпатических влияний [3]. Согласно данным В.К. Koichubekov и соавт. [4], ритм сердца у больных с гипертонией. оказался более регулярным, а его динамика менее сложной и «хаотичной» по сравнению со здоровыми, что выражалось в более низких значениях энтропии и корреляционной размерности. Стабилизация частоты сердечных сокращений наблюдается как на коротких, так и на больших временных интервалах, но в основном за счет уменьшения разницы «соседних» RR-интервалов. Вместе с тем в литературе практически отсутствуют сведения о том, как влияет на ВСР у больных ГБ использование систематических умеренных физических нагрузок. F. Besnier и соавт. [5], обобщив имеющиеся в литературе данные, сообщают, что физическая тренировка, включая аэробные упражнения средней интенсивности, играет важную роль в улучшении симптовагусного баланса и способна выявить маркеры симпатической направленности, измеренные с помощью ВСР или уровня катехоламинов в плазме.

Нашими прежними исследованиями установлено, что если больные ГБ в течение 2–3 лет систематически принимали полуторамесячные курсы кинезитерапии, то у них не только быстрее нормализовалось кровяное давление, но и приближались к показателям здоровых состояние гемодинамики и деятельность сердца [6–8]. Бо-

лее того, у таких больных значительное число тестов, характеризующих ВСР, по сравнению с пациентами, находящимися только на медикаментозной терапии, оказалось значительно выше. Одновременно при этом обнаружено выраженное повышение нелинейного парасимпатического индекса (CVI), тогда как симпатический индекс (CSI) оставался неизменным [9].

Несомненный интерес, с нашей точки зрения, представляет взаимосвязь ВСР с основными показателями артериального давления и гемодинамики у больных ГБ, систематически занимающихся на протяжении ряда лет умеренными физическими упражнениями. Решение этого вопроса имеет не только теоретическое, но и практическое значение, ибо поможет клиницистам оценить значение умеренной физической нагрузки в качестве терапевтической меры при ГБ.

Методика

Наблюдения проведены на 72 женщинах, страдающих ГБ. Больные были разделены на 2 группы. В 1-ю (ГБ-1) вошли 37 женщин, страдающих артериальной гипертонией II стадии и имеющих высокий дополнительный риск развития сердечно-сосудистых осложнений. Средний возраст обследуемых этой группы составил $57,8 \pm 4,3$ года, ИМТ $28,6 \pm 4,4$. Все женщины группы ГБ-1 получали лечение в виде монотерапии или комбинации 2 антигипертензивных препаратов.

Во 2-ю группу (ГБ-2) включены 35 женщин (возраст $56,7 \pm 4,1$ года; ИМТ $28,2 \pm 4,3$), также страдающих артериальной гипертонией II стадии с высоким дополнительным риском развития сердечно-сосудистых осложнений, но регулярно проходивших на протяжении 2–3 лет по 3–4 полуторамесячных курса кинезитерапии (управляемые умеренные физические нагрузки). В каждом конкретном случае в зависимости от состояния больных, уровня АД, степени физической тренированности и наличия сопутствующих заболеваний назначался индивидуальный курс кинезитерапии на специальных тренажерах. При этом расход энергии не превышал 200–300 кал за одно занятие.

На момент исследования у 31 женщины группы ГБ-1 был достигнут целевой уровень артериального

давления АД, у 6 – цифры АД соответствовали 1 степени АГ, что потребовало дополнительной коррекции доз получаемых препаратов. Среди пациенток, регулярно занимающихся физическими упражнениями (группа ГБ-2), коррекция АД потребовалась лишь в одном случае, у остальных женщин регистрировались целевые значения АД.

Для изучения гемодинамики был использован датчик динамического рассеяния света (miniature Dynamic Light Scattering – mDLS) от Elfi-Tech (Rehovot, Израиль) [10, 11], который измеряет сигналы, инициированные кожным кровотоком, и использует методику разложения сигнала на частотные компоненты, связанные с разными гемодинамическими источниками.

Для оценки характеристик ВСР применялся метод фотоплетизмографии (ФПГ) [12]. Из пульсовой компоненты mDLS-сигнала извлекалась информация о вариабельности *RR*-интервалов и рассчитывались индикаторы ВСР [13]. Измерения производились в течение 3 мин.

Использованы следующие временные показатели: HR (Heart Rate) – частота сердечных сокращений (ЧСС); SDNN (Standard Deviation of the Normal-to-Normal) – стандартное отклонение всех интервалов *RR* (в мс), отражающее все долговременные компоненты и циркадные ритмы, ответственные за вариабельность; RMSSD (Root Mean Square of the Successive Differences) – квадратный корень из средней суммы квадратов разностей *RR*-интервалов (в мс), относящийся к изменениям в краткосрочном периоде и отражающий отклонения в тоне автономной нервной системы, которые преимущественно являются вагусопосредованными.

Частотный анализ представлен индексами: LF (Low Frequency) – мощность в диапазоне низких частот (0.04-0.15 Hz, мс²) обусловлена активностью симпатического отдела и отражает время задержки барорефлекторной петли; HF (High Frequency) – мощность в диапазоне высоких частот (0.16-0.5 Hz, мс²) ВСР связана с дыхательными движениями и главным образом обусловлена вагусной активностью; PWR (Power) – сумма низкочастотной LF и высокочастотной компонент HF [мс²]; LF/HF – отношение мощностей (отражает общий симпатовагусный баланс).

Анализ нелинейной вариабельности содержит: CVI (Cardiac Vagal Index) – нелинейный парасимпатический индекс и CSI (Cardiac Sympathetic Index) – нелинейный симпатический индекс [14].

Для того чтобы облегчить интерпретацию многочастотного анализа, ввели так называемый гемодинамический индекс (Hemodynamic Index – HI). Зависи-

мость HI от скорости сдвига интерпретируется путем сопоставления каждой полосе частот определенной скорости сдвига. Различия между диапазонами скоростей сдвига (частотными диапазонами) тесно связаны с типом течения крови (капиллярная, артериальная, пристеночная). HI-связанные с низким диапазоном частот (1-300 Гц – HI1), определяют эндотелиальное взаимодействие с эритроцитами, высокочастотная область (3000-24 000 Гц – HI3) характеризует в основном быстрый поток пульсирующей крови. HI2 (300-3000 Гц) занимает в этом ряду промежуточное положение. Относительные индексы RH11, RH12, RH13 обозначают нормированный вклад каждой компоненты в общие динамические процессы. $RH11 = HI1 / (HI1 + HI2 + HI3)$. $RH12 = HI2 / (HI1 + HI2 + HI3)$. $RH13 = HI3 / (HI1 + HI2 + HI3)$. Для оценки тенденций перераспределения кровотока между быстрыми и медленными процессами введены показатели разности (HI1-HI3) и отношения (HI1/HI3).

Для каждого HI (HI1-HI3) используется дополнительная мера медленных колебаний кровотока – осцилляторный гемодинамический индекс (Oscillatory Hemodynamic Index – OHI). Определены следующие OHI: 0.005-0.05 Гц – движение крови, ассоциированное с эндотелием (NEUR), 0.05-0.15 Гц – движение крови, определяемое мышечным слоем сосудов (MAYER), 0.15-0.6 Гц – движение крови задаваемое дыхательным циклом (RESP) и 0.6-3 Гц – пульсовые толчки (PULSE).

Статистическая обработка выполнена с помощью языка R версии 3.6.2 [15]. Для описания характера распределения количественных признаков определялись средние величины (*M*) и стандартные отклонения (*SD*). Для оценки взаимосвязи между изучаемыми показателями применен метод корреляции Спирмена [16]. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ и вероятными (близкими к значимым) при $p < 0,1$.

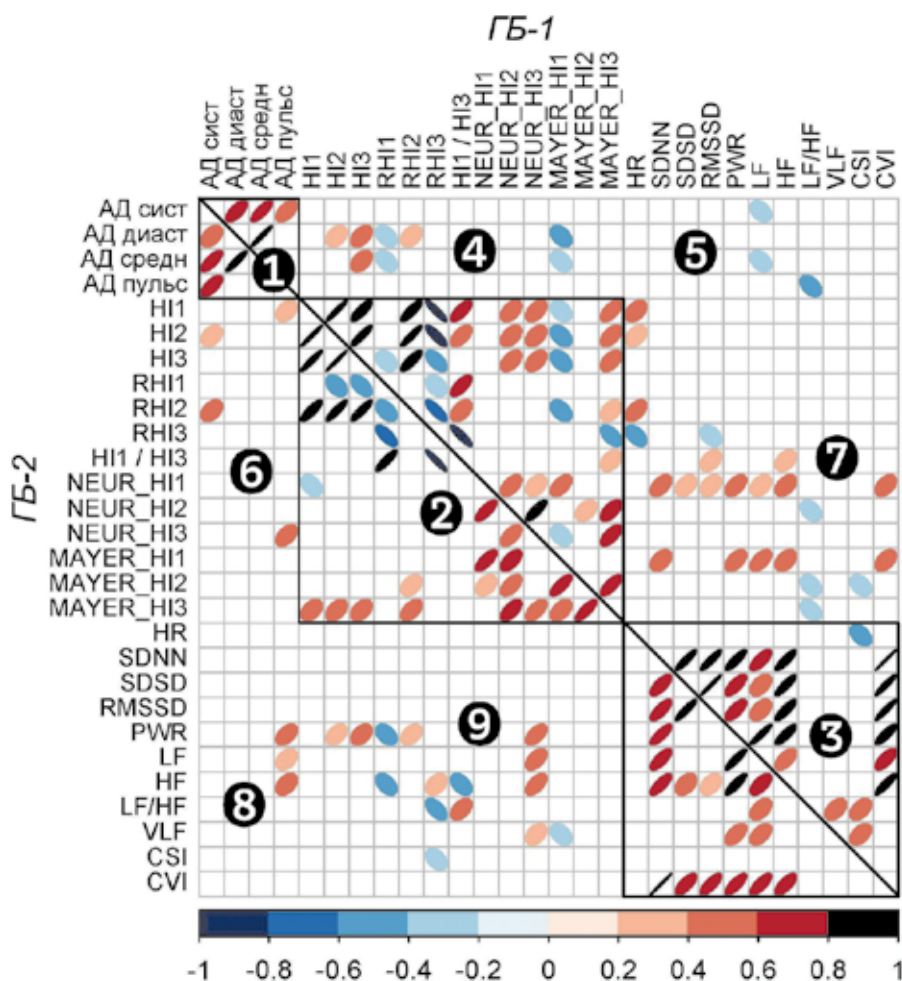
Полученные данные представлены графически в виде двух полуматриц, отражающих корреляционные взаимосвязи исследуемых показателей. В правом верхнем углу (отделяемом диагональю, проходящей слева направо и сверху-вниз) расположена полуматрица корреляций в группе ГБ-1, в левом нижнем – ГБ-2. Дополнительными квадратами обозначены 3 кластера, характеризующие взаимодействие показателей в пределах одного из использованных методов исследования. Остальное поле матрицы занимают показатели корреляционных связей между различными изучаемыми параметрами. На рисунке отображены только значимые взаимосвязи ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Наши наблюдения показали, что у больных женщин группы ГБ-1 существует отрицательная связь между LF, с одной стороны, и систолическим ($r=-0,352$, $p=0,045$), а также средним давлением ($r=-0,352$, $p=0,045$) – с другой. Кроме того, выявлена отрицательная взаимосвязь между LF/HF и пульсовым давлением ($r=-0,446$, $p=0,014$). (рис., кластер 5).

У больных группы ГБ-2 обнаружены положительные взаимосвязи между PWR, LF, HF и пульсовым давлением ($r=0,471$, $p=0,01$; $r=-0,38$; $p=0,038$; $r=0,409$, $p=0,028$, соответственно), (рис., кластер 8).

но, у больных, систематически занимающихся умеренной физической нагрузкой, отрицательные связи меняются на положительные. Одновременно у больных группы ГБ-1 обнаружена отрицательная связь кровяного давления с низкочастотной (LF) компонентой и не выявлена с высокочастотной (HF), тогда как у ГБ-2 установлены связи и с той и другой составляющей. Следовательно, можно говорить о том, что у больных группы ГБ-1 снижена активность симпатического отдела автономной нервной системы, тогда как в группе ГБ-2 выявляется сбалансированность в деятельности симпатического и парасимпатического (вагусные влияния) отделов автономной нервной системы.



Комбинированная корреляционная матрица показателей артериального давления, гемодинамики и вариабельности сердечного ритма у больных группы ГБ-1 (правый верхний треугольник) и ГБ-2 (левый нижний треугольник). ● – значимая ($p<0,05$) положительная корреляция. ● – значимая ($p<0,05$) отрицательная корреляция.

В следующей серии было решено проследить взаимосвязи ВСП с основными гемодинамическими параметрами у женщин группы ГБ-1.

Нами установлено, что у больных группы ГБ-1 имеются положительные взаимосвязи между числом сердечных сокращений (HR) и гемодинамическими индексами Н11 ($r=0,406$, $p=0,019$), Н12 ($r=0,378$, $p=0,030$), RH12 ($r=0,497$, $p=0,003$) и отрицательная с RH13 ($r=-0,482$, $p=0,004$) (рис., кластер 7). Полученные данные позволяют говорить о том, что чем больше число сердечных сокращений, тем сильнее пристеночный (эндотелиальный) и промежуточный (между осевым и эндотелиальным) кровотоки и относительно слабее осевой кровотоки. Кроме того, отмечается отрицательная взаимосвязь между показателем RMSSD и RH13 ($r=-0,372$, $p=0,043$) (рис., кластер 7) и вероятные, близкие к значимым с Н11 ($r=0,35$, $p=0,058$) и Н12 ($r=0,327$, $p=0,078$). Нами также выявлена положительная взаимосвязь RMSSD с соотношением Н11/Н13 ($r=0,387$, $p=0,034$). Обнаруженные взаимосвязи носят закономерный характер и преимущественно обусловлены вагусными влияниями. Наконец, установлена положительная взаимосвязь между HF и Н11/Н13 ($r=0,375$, $p=0,041$) (рис., кластер 7), что свидетельствует о преобладании вагусных влияний.

Корреляционные взаимосвязи у больных ГБ-2 значительно отличаются от тех, что наблюдались в группе ГБ-1. В частности, у пациентов ГБ-2 выявлена вероятная, близкая к значимой отрицательная связь между SDNN и RH11 ($r=-0,374$, $p=0,05$), а также между PWR и RH11 ($r=-0,403$, $p=0,030$). Одновременно обнаружены положительные взаимосвязи между PWR и Н12 ($r=0,399$, $p=0,032$), Н13 ($r=0,408$, $p=0,028$). Найдены положительные взаимосвязи PWR и RH12 ($r=0,387$, $p=0,038$), HF и RH13 ($r=0,378$, $p=0,043$), и отрицательные HF с отношением Н11/Н13 ($r=-0,437$, $p=0,018$) и с RH11 ($r=-0,46$, $p=0,012$). Кроме того, проявляются отрицательные взаимосвязи между соотношением LF/HF и RH13 ($r=-0,552$, $p=0,002$), CSI и RH13 ($r=-0,392$, $p=0,029$), положительная LF/HF с Н11/Н13 ($r=0,472$, $p=0,011$). Представленные данные во многом зависят от соотношения между действием симпатической и парасимпатической автономной нервной системы и в основном определяются превалированием вагусных влияний. Вполне возможно, что именно этими воздействиями обусловлена более быстрая и наиболее устойчивая нормализация кровяного давления у больных ГБ-2.

Следует указать, что полученные данные во многом согласуются с результатами исследования Х.А.

Курданова и соавт. [17], обнаруживших у больных ГБ, находящихся в условиях высокогорья, положительные взаимосвязи между LF и основными тестами, характеризующими состояние гемодинамики, что объясняется превалированием вагусных воздействий.

Одной из задач наших исследований являлось изучение взаимосвязи между ВСП и осцилляторными индексами, во многом характеризующими состояние автономной регуляции гемодинамических функций. Как видно из представленных в матрице данных, у больных группы ГБ-1 имеется значительное число как положительных, так и отрицательных взаимосвязей между ВСП и осцилляторными показателями, что не вызывает удивления, так как деятельность сердца и тонус сосудов, определяющие характер гемодинамики, регулируются одними и теми же нейрогуморальными факторами. Мы считаем нужным остановиться на основных показателях, убрав из матрицы многочисленные связи между ВСП, дыхательными (RESP) и сердечными (PULSE) индексами, ибо их взаимосвязь настолько очевидна, что не требует дополнительных разбирательств и разъяснений.

Прежде всего бросается в глаза, что у больных группы ГБ-1 большинство показателей ВСП (за исключением, HR, LF/HF и CVI) положительно коррелируют с NEUR_Н11, тогда как с NEUR_Н12 и NEUR_Н13 (за исключением, отрицательной взаимосвязи с LF/HF ($r=-0,38$, $p=0,038$)) подобные корреляции не обнаружены (рис., кластер 7). Полученные данные говорят о том, что в основном изменения ВСП непосредственно или опосредованно, воздействуют на нейрорегуляторные механизмы, связанные с эндотелиальным кровотоком. Более того, положительная связь CVI с NEUR_Н11 ($r=0,451$, $p=0,007$) позволяет прийти к выводу, что эти воздействия в большей степени обусловлены влиянием блуждающего нерва.

Значительный интерес представляют взаимосвязи ВСП с ритмом MAYER. Необходимо напомнить, что осцилляторные индексы MAYER демонстрируют процессы очень медленных колебаний кровотока, регулируемые барорецепторной нейронной сетью с частотой около одного раза в 10 с. Установлено, что волны Майера тесно связаны с синхронными колебаниями эфферентной симпатической нервной деятельности и практически всегда усиливаются при состояниях симпатической активации [18]. Нами установлено, что у больных ГБ-1 имеются прямые связи между SDNN, PWR, LF, HF и CVI, с одной стороны, и MAYER_Н11 – с другой (рис., кластер 7). Представленные данные лишней раз свидетельствуют о том, что ВСП оказывает воздействие на эндотелиальный кровотоки за счет ба-

ланса между симпатическими и парасимпатическими влияниями.

Следует отметить, что существуют взаимосвязи между сочетаниями LF/HF (этот показатель характеризует состояние общих симпатовагусных отношений), CSI (симпатический индекс) и *MAYER_H12*. Полученные данные позволяют предположить, что воздействие на промежуточный кровоток осуществляется через симпатический отдел автономной нервной системы. Наконец, выявлены прямые связи между соотношением LF/HF и *MAYER_H13*. Однако дать окончательную оценку этим фактам на основании имеющихся сведений мы в настоящее время не в состоянии.

Анализируя полученные данные, можно сказать, что сдвиги в ВСР у больных ГБ-1 играют существенную роль в нейрогенных воздействиях на гемодинамику через пока еще малоизученный ритм *MAYER* [19]. В то же время не подлежит сомнению, что эти влияния должны быть обоюдными, ибо волны *MAYER* являются переходными колебательными реакциями на гемодинамические возмущения. Более того, амплитуда волн *MAYER* связана как с силой возбуждающих возмущений, так и чувствительностью симпатического компонента барорецепторного рефлекса, тогда как парасимпатические воздействия оказывают отрицательные влияния на частоту и амплитуду волн *MAYER* [18].

У женщин группы ГБ-2 обнаружено лишь наличие положительных связей между показателями LF, HF и *NEUR_H13* ($r=0,55, p=0,002$; $r=0,518, p=0,003$; $r=0,584, p=0,0009$, соответственно) (рис., кластер 9), что свидетельствует о сбалансированности симпатической и парасимпатической нервной системы в регуляции гемодинамических функций. В то же время не выявлено взаимосвязи между различными показателями ВСР и ритмами *MAYER*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что гемодинамические функции у больных ГБ-2, систематически на протяжении 2–3 лет занимающихся кинезитерапевтическими процедурами, более устойчивы и практически не зависят от нейрогенных осцилляторных воздействий.

Мы хотим обратить внимание на то, что между ритмами *NEUR* и *MAYER* существуют прямые корреляционные взаимосвязи (рис., кластер 2), обуславливающие совместную их деятельность в регуляции гемодинамических функций.

Нас заинтересовал вопрос, существуют ли отличия в корреляционных отношениях в группе ГБ-1 и ГБ-2 между уровнем АД и различными показателями гемодинамики. Оказалось, что у больных ГБ-1 существует

положительная взаимосвязь между диастолическим и средним АД и *H13* (рис., кластер 4), характеризующим сдвиг осевого кровотока ($r=0,391, p=0,022$; $r=0,381, p=0,026$, соответственно), а также вероятные, близкие к значимым – с *H12* ($r=0,328, p=0,058$; $r=0,315, p=0,069$, соответственно) и *RH12* ($r=0,335, p=0,053$; $r=0,292, p=0,094$, соответственно). Особо следует обратить внимание на то, что существуют отрицательные связи между АД систолическим, диастолическим и средним, с одной стороны, и ритмом *MAYER_H11*, действие которого связано с эндотелиальным (пристеночным) кровотоком ($r=-0,367, p=0,033$; $r=-0,406, p=0,017$; $r=-0,412, p=0,016$), а также положительная взаимосвязь пульсового АД с *MAYER_H12* ($r=-0,404, p=0,018$), обусловленная промежуточным кровотоком. Кроме того, выявляются положительные и вероятные связи, близкие к значимым, между систолическим, средним и пульсовым давлением и *RESP_H13* ($r=-0,404, p=0,018$; $r=0,318, p=0,067$; $r=0,331, p=0,05$, соответственно) (рис., кластер 4), а также отрицательная взаимосвязь между пульсовым давлением и *PULSE_H12* ($r=-0,406, p=0,017$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что АД в группе ГБ-1 во многом зависит от всех сдвиговых (эндотелиального, осевого и промежуточного) потоков. Кроме того, на АД у пациентов ГБ-1 могут оказывать все без исключения нейрогенные осцилляторные воздействия, благодаря чему уровень кровяного давления у таких больных может колебаться в широких пределах.

У женщин группы ГБ-2 выявлены прямые взаимосвязи между систолическим и пульсовым давлением, с одной стороны, и *H11* ($r=0,365, p=0,040$; $r=0,389, p=0,028$, соответственно), *H12* ($r=0,426, p=0,015$; $r=0,428, p=0,015$, соответственно) и *H13* ($r=0,4, p=0,023$; $r=0,435, p=0,013$, соответственно) – с другой. Кроме того, прослеживается значимая и вероятная связь между систолическим и средним АД и *RH12* ($r=0,383, p=0,030$; $r=0,308, p=0,087$, соответственно) (рис., кластер 6).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у систематически занимающихся умеренными физическими нагрузками (группа ГБ-2) осцилляторные индексы не оказывают влияния на уровень АД. По всей видимости, подобная ситуация способствует более устойчивой стабилизации кровяного давления.

Чем же обусловлено положительное действие регулярных кинезитерапевтических процедур на уровень кровяного давления и состояние гемодинамики? Прежде всего следует отметить, что регулярные физические нагрузки при гипертонии снижают АД [20], что

наблюдалось и в наших исследованиях [8, 21]. При умеренной регулярной физической нагрузке уменьшается частота сердечных сокращений [6, 8]. Установлено, что высокая частота сердечных сокращений является при ГБ дополнительным риском сердечно-сосудистых катастроф [22, 23].

При регулярной физической нагрузке из скелетной мускулатуры и сердечной мышцы выделяются миокины и в первую очередь гормон ирисин, оказывающий благотворное влияние на состояние сердечно-сосудистой системы [24–26].

Не вызывает сомнений, что все приведенные доказательства положительного влияния умеренной физической нагрузки отразились и на результатах выявленных нами корреляционных отношений в группах ГБ-1 и ГБ-2.

Заключение

Проведенные наблюдения показали, что у женщин, страдающих гипертонической болезнью и находящихся преимущественно на медикаментозной терапии (ГБ-1) проявляются отрицательные корреляции между исследуемыми показателями вариабельности сердечного ритма (LF, LF/HF) и систолическим, средним и пульсовым давлением. При добавлении к медикаментозной терапии регулярных кинезитерапевтических процедур (ГБ-2) не только наступает более быстрая и устойчивая нормализация кровяного давления [8, 21], но и корреляционные связи (PWR, LF, HF и пульсовое давление) меняются на отрицательные. Полученные результаты свидетельствуют о значительных различиях в регуляции кровяного давления у женщин с гипертонией группы ГБ-1 и ГБ-2. Они позволяют прийти к выводу, что у больных ГБ-1 снижена активность симпатического отдела автономной нервной системы, тогда как в группе ГБ-2 выявляется сбалансированность в деятельности симпатического и парасимпатического (вагусные влияния) звеньев автономной нервной системы.

Аналогичную картину можно наблюдать и при исследовании так называемых гемодинамических индексов. Так, у больных группы ГБ-1 выявлены положительные взаимосвязи между показателем HR и гемодинамическими индексами $HI1$, $RHI2$ и отрицательная с $RHI3$. Полученные данные свидетельствуют о том, что чем больше число сердечных сокращений, тем сильнее пристеночный и промежуточный и слабее осевой кровоток. Кроме того, выявлены отрицательные корреляции между показателем $RMSSD$ и $RHI3$ и вероятны, но близкие к значимым с $HI1$ и $HI2$. И, наконец, выявляется отрицательная взаимосвязь между HF

и $HI1/HI3$ и проявляется вероятная отрицательная взаимосвязь между отношениями LF/HF и $HI1/HI3$. Обнаруженные взаимосвязи преимущественно обусловлены вагусными влияниями, что свидетельствует о преобладании вагусных парасимпатических влияний над симпатическими.

У пациентов ГБ-2 обнаружена отрицательная корреляция между $SDNN$ и $RHI1$, а также между PWR и $RHI1$. Одновременно выявлены положительные взаимосвязи между PWR и $HI2$, $HI3$ и вероятные, близкие к значимым, с $HI1$. Также найдены положительные взаимосвязи PWR (напомним, что этот показатель отражает общий симпатовагусный баланс) и $RHI2$, HF и $RHI3$ и отрицательные HF с отношением $HI1/HI3$ и с $RHI1$. Кроме того, выявляются отрицательные взаимосвязи между соотношением LF/HF и $RHI3$, CSI и $RHI3$, положительная LF/HF с $HI1/HI3$. Представленные данные во многом зависят от стабильности и сбалансированности действия симпатических и парасимпатических влияний, наблюдаемых у больных ГБ-2. Не исключено, что в значительной степени этими воздействиями обусловлена более быстрая и наиболее устойчивая нормализация кровяного давления в группе ГБ-2 [8, 21, 27].

Особый интерес представляют так называемые осцилляторные индексы, во многом определяющие характер гемодинамики. Нами установлено, что у больных ГБ-1 имеются прямые связи между $SDNN$, PWR , LF, HF и CVI и $NEUR_HI1$, что свидетельствует о действии этих факторов на эндотелиальный кровоток ($HI1$) за счет баланса между симпатическими и парасимпатическими влияниями. В группе ГБ-2 установлено наличие положительных связей между показателями LF, HF и $NEUR_HI3$, что говорит о сбалансированности симпатической и парасимпатической нервной системы в регуляции гемодинамических функций. Мы считаем, что уменьшение в группе ГБ-2 по сравнению с больными группы ГБ-1 числа факторов, влияющих на гемодинамику, носит более совершенный и благоприятный характер, что и обеспечивает больным, принимающим регулярные курсы кинезитерапии, более быструю и устойчивую нормализацию артериального давления.

Наши наблюдения показали, что как у больных группы ГБ-1, так и ГБ-2 существуют значимые и вероятные связи между показателями АД и прямыми ($HI1$, $HI2$, $HI3$) или нормализованными ($RHI1$, $RHI2$, $RHI3$) индексами, характеризующими пристеночный (эндотелиальный), промежуточный и осевой сдвиг кровотока. Вместе с тем если у больных ГБ-1 эти взаимосвязи могут носить как положительный, так и отрица-

тельный характер, что лишний раз указывает на разбалансированность в деятельности автономной нервной системы (АНС), то у больных ГБ-2 эти взаимосвязи являются только положительными. В то же время на уровень кровяного давления у больных ГБ-1 влияют все без исключения осцилляторные ритмы, которые также могут оказывать как отрицательное (с MAYER_HI1, PULSE_HI2), так и положительное (MAYER_HI2, RESP_HI3) действие. Что же касается больных ГБ-2, то у них взаимосвязи уровня АД с осцилляторными индексами не обнаружено.

Различия корреляционных отношений у больных ГБ-1 и ГБ-2 обусловлены благотворным влиянием регулярной умеренной физической нагрузки на частоту сердечных сокращений, уровень кровяного давления, а также выделением скелетной и сердечной мышц регулятора деятельности сердечно-сосудистой системы гормона ирисина.

Все представленные данные свидетельствуют о том, что добавление к лекарственной гипотензивной терапии регулярных кинезитерапевтических процедур не только способствует, как это было показано нами ранее [8, 21, 27], более устойчивой нормализации АД, но и помогает раскрыть патогенетические механизмы этих реакций.

Литература

(п.п. 1-5; 10-16; 18-20; 22; 24; 27 см. References)

6. Давыдов С.О., Кузник Б.И., Степанов А.В., Морарь Н.В., Аюшиев О.Д. Влияние кинезитерапии на содержание «гормона молодости» ирисина у здоровых и больных ишемической болезнью сердца. *Вестник восстановительной медицины*. 2015; (5): 91-8.
7. Давыдов С.О., Степанов А.В., Кузник Б.И., Гусева Е.С. Влияние кинезитерапии на уровень адгезивной молекулы JAM-A у больных гипертонической болезнью. *Вестник восстановительной медицины*. 2017; (5): 33-7.
8. Гусева Е.С., Давыдов С.О., Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н., Степанов А.В., Файн И.В., Маген Е. Роль дифференцировочного фактора роста 11 (GDF11) в регуляции липидного обмена и кардиогемодинамических функций у больных гипертонической болезнью при умеренной физической нагрузке. *Российский кардиологический журнал*. 2018; 156(4): 93-8. doi: 10.15829/1560-4071-2018-4-93-98
9. Смоляков Ю.Н., Кузник Б.И., Гусева Е.С., Давыдов С.О. Вариабельность сердечного ритма у женщин, страдающих гипертонической болезнью, под воздействием регулярной умеренной физической нагрузки. *Системные гипертензии*. 2019; 16(4): 61-4. doi: 10.26442/2075082X.2019.4.190636
17. Курданов Х.А., Бесланев И.А., Батырбекова Л.М., Курданова М.Х. Адаптационные возможности основных регуляторных систем у больных с артериальной гипертензией в условиях высокогорья. *Вестник РАМН*. 2014; 69(1-2): 26-31.
21. Кузник Б.И., Давыдов С.О., Степанов А.В., Смоляков Ю.Н., Гусева Е.С. Значение «белка молодости» – GDF11 и «белков старости» – GDF15, CCL11, JAM-A в регуляции кровяного давления у здоровых и страдающих гипертонической болезнью женщин. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; (2): 46-52. doi: 10.25557/0031-2991.2018.02.46-52
23. Котовская Ю.В., Ткачёва О.Н., Рунихина Н.К., Лузина А.В. Физические нагрузки как средство профилактики сердечно-сосудистых заболеваний у пожилых пациентов. *Доктор.Ру*. 2019; 157(2): 19-22. doi: 10.31550/1727-2378-2019-157-2-19-22
25. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Тарновская С.И., Линькова Н.С. Короткие пептиды и регулятор длины теломер гормон ирисин. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 160(9): 332-6.
26. Кузник Б.И., Давыдов С.О., Степанов А.В., Морарь Н.В. Изменение концентрации ирисина в крови больных гипертонической болезнью после физической нагрузки. *Кардиология*. 2017; 57(4): 77-8. doi: 10.18565/cardio.2017.4.77-78

References

1. Malliani A., Pagani M., Lombardi F., Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*. 1991; 84(2): 482-92. doi: 10.1161/01.CIR.84.2.482
2. Nagy K., Sipos E., El Hadj Othmane T. Heart rate variability is significantly reduced in non-diabetic patients with hypertension. *Orvosi hetilap*. 2014; 155(22): 865-70. doi: 10.1556/ON.2014.29886
3. de Andrade P.E., do Amaral J.A.T., Paiva L.D.S., Adami F., Raimundo J.Z., Valenti V.E., Raimundo R.D. Reduction of heart rate variability in hypertensive elderly. *Blood pressure*. 2017; 26(6): 350-8. doi: 0.1080/08037051.2017.1354285
4. Koichubekov B.K., Sorokina M.A., Laryushina Y.M., Turgunova L.G., Korshukov I.V. Nonlinear analyses of heart rate variability in hypertension. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 2018; 67(3): 174-9. doi: 10.1016/j.ancard.2018.04.014
5. Besnier F., Labrunée M., Pathak A., Pavy-Le Traon A., Galès C., Sénard J.M., Guiraud T. Exercise training-induced modification in autonomic nervous system: An update for cardiac patients. *Annals of physical and rehabilitation medicine*. 2017; 60(1): 27-35. doi: 10.1016/j.rehab.2016.07.002
6. Davydov S.O., Kuznik B.I., Stepanov A.V., Morar N.V., Ayushiev O.D. The effect of kinesitherapy on the content of the “hormone of youth” irisin in healthy and patients with coronary heart disease. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny*. 2015; (5): 91-8. (in Russian)
7. Davydov S.O., Stepanov A.V., Kuznik B.I., Guseva E.S. The effect of kinesitherapy on the level of the adhesive molecule JAM-A in patients with essential hypertension. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny*. 2017; (5): 33-7. (in Russian)
8. Guseva E.S., Davydov S.O., Kuznik B.I., Smolyakov Yu.N., Stepanov A.V., Fayn I.V., Magen E. The role of differentiating growth factor 11 (GDF11) in the regulation of lipid exchange and cardiohemodynamic functions in patients with essential hypertension with moderate physical exertion. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2018; 156(4): 93-8. doi: 10.15829/1560-4071-2018-4-93-98. (in Russian)
9. Smolyakov Y.N., Kuznik B.I., Guseva E.S., Davydov S.O. Heart rate variability in women suffering from essential hypertension under the influence of regular moderate physical exercises. *Sistemnye gipertenzii*. 2019; 16(4): 61-4. doi: 10.26442/2075082X.2019.4.190636. (in Russian)

10. Fine I., Kaminsky A.V., Shenkman L. A new sensor for stress measurement based on blood flow fluctuations. Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XII. *SPIE Press*. 2016; 9707: 970705. doi: 10.1117/12.2212866
11. Kuznik B.I., Smolyakov Y.N., Davydov S.O., Tsybikov N.N., Maksimova, O.G., Malinina A.V., Fine I. Impact of fitness status on the optically measured hemodynamic indexes. *Journal of Healthcare Engineering*. 2018;1674931. doi: 10.1155/2018/1674931
12. Pinheiro N., Couceiro R., Henriques J., Muehlsteff J., Quintal I., Goncalves L., Carvalho P. Can PPG be used for HRV analysis? *38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*. 2016: 2945-9. doi: 10.1109/EMBC.2016.7591347
13. Shaffer F., Ginsberg J.P. An overview of heart rate variability metrics and norms. *Frontiers in public health*. 2017; (5): 258. doi: 10.3389/fpubh.2017.00258
14. Barbieri R., Scilingo E.P., Valenza G. *Complexity and nonlinearity in cardiovascular signals*. Springer; 2017.
15. R Core Team (2019). R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>.
16. Spearman C. The proof and measurement of association between two things. *American Journal of Psychology*. 1904; 15(1): 72–101. doi: 10.2307/1412159. JSTOR 1412159
17. Kurdanov H.A., Beslaneyev I.A., Batyrbekova L.M., Kurdanova M.K. Adaptive capabilities of the main regulatory systems in patients with arterial hypertension in high altitude conditions. *Vestnik RAMN*. 2014; 69 (1-2): 26-31. (in Russian)
18. Julien C. The enigma of Mayer waves: Facts and models. *Cardiovascular research*. 2006; 70(1): 12-21. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.11.008
19. Fine I., Kaminsky A.V., Kuznik B.I., Kustovsya, E.M., Maximova O.G., Shenkman L. New noninvasive index for evaluation of the vascular age of healthy and sick people. *Journal of Biomedical Optics*. 2012; 17(8): 2-7. doi: 10.1117/1.JBO.17.8.087002
20. Lee C.J., Kim J.Y., Shim E., Hong S.H., Lee M., Jeon J.Y., Park S. The effects of diet alone or in combination with exercise in patients with prehypertension and hypertension: a randomized controlled trial. *Korean circulation journal*. 2018; 48(7): 637-51. doi: 10.4070/kcj.2017.0349
21. Kuznik B.I., Davydov S.O., Stepanov A.V., Smolyakov Y.N., Guseva E.S. The meaning of «youth protein» is GDF11 and “aging proteins” are GDF15, CCL11, JAM-A in the regulation of blood pressure in healthy and hypertensive women. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; (2): 46-52. doi: 10.25557/0031-2991.2018.02.46-52. (in Russian)
22. Jensen M.T., Suadicani P., Hein H.O., Gyntelberg F. Elevated resting heart rate, physical fitness and all-cause mortality: a 16-year followup in the Copenhagen Male Study. *Heart*. 2013; 99(12): 882-7. doi: 10.1136/heartjnl-2012-303375
23. Kotovskaya Y.V., Tkacheva O.N., Runikhina N.K., Luzina A.V. Physical activity as a means of preventing cardiovascular disease in elderly patients. *Doktor.Ru*. 2019 157(2): 19-22. doi: 10.31550 / 1727-2378-2019-157-2-19-22. (in Russian)
24. Bostrom P., Wu J., Jedrychowski M.P., Korde A., Ye L., Lo J.C., Kajimura S. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012; 481(7382): 463-8. doi: 10.1038/nature10777.
25. Khavinson V.Kh., Kuznik B.I., Tamovskaya S.I., Linkova N.S. Short peptides and telomere length regulator hormone irisin. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2015; 160 (9): 332-6. (in Russian)
26. Kuznik B.I., Davydov S.O., Stepanov A.V., Morar N.V. Change in the concentration of irisin in the blood of hypertensive patients after exercise. *Kardiologiya*. 2017; 57(4): 77-8. doi: 10.18565 / cardio.2017.4.77-78. (in Russian)
27. Kuznik B.I., Fine I.V., Kaminsky A.V. Non-invasive method of the examination of the hemostatis system. *Bulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2011; 151(5): 594-97. doi: 10.1007/s10517-011-1407-8.

Сведения об авторах:

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

Смоляков Юрий Николаевич, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. медицинской физики и информатики ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», научный консультант инновационной клиники «Академия Здоровья», E-mail: smolyakov@rambler.ru;

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

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

Файн Илья Вульфович, генеральный директор НПО Elfi-Tech Ltd., Rehovot, Israel, E-mail: ilyafine@elfi-tech.com

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.9

Левин Г.Я., Поповичева А.Н., Соснина Л.Н.

Гемореологические нарушения у детей после термической травмы

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, 603950, БОКС-470, г. Нижний Новгород, Россия, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1

Цель исследования – изучение динамики изменения реологических свойств крови и их корреляции с параметрами эритроцитов в процессе лечения детей после термической травмы.

Методика. Исследование проведено на 32 детях в возрасте от 3 до 17 лет с ожогами площадью от 10 до 70% поверхности тела в период лечения, начиная с 3-х суток после термической травмы и до полного закрытия ожоговых ран и выписки пациента из стационара. Изучали состояние цитоскелета эритроцитов методом термоиндукции, их агрегацию и дезагрегацию с помощью модифицированного нами реоскопа Н. Schmid-Schönbein и соавт. [1973], их деформируемость и морфологию агрегатов эритроцитов, а также рассчитывали эритроцитарные индексы.

Результаты. Установлено, что после ожога происходит резкое усиление агрегации эритроцитов и прочности агрегатов, но значительно снижается их деформируемость. Нарушение реологических свойств крови сопровождается все стадии ожоговой болезни и сохраняется при выписке больных из стационара. Нарушения гемореологии коррелируют с изменениями концентрации фибриногена, состоянием цитоскелета эритроцитов и их физическими свойствами – размером эритроцитов и содержанием в них гемоглобина.

Заключение. Стойкие и выраженные нарушения реологических свойств крови у детей при ожоговой болезни могут являться важнейшей причиной редукции снабжения кислородом жизненно важных органов и развития их недостаточности. Простым, хотя и предварительным, методом оценки состояния гемореологии может служить измерение эритроцитарных индексов.

Ключевые слова: дети; ожоги; эритроциты; агрегация; дезагрегация; цитоскелет; деформируемость; эритроцитарные индексы.

Для цитирования: Левин Г.Я., Поповичева А.Н., Соснина Л.Н. Гемореологические нарушения у детей после термической травмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 74-79.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.74-79

Для корреспонденции: Левин Григорий Яковлевич, e-mail: levin@unn.ac.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование текста – Левин Г.Я.; сбор материала, статистическая обработка результатов, написание текста – Поповичева А.Н. Соснина Л.Н. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов

Поступила 13.12.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Levin G.Ya., Popovicheva A.N., Sosnina L.N.

Hemorheological disorders in children with thermal trauma

Privolzhskiy Research Medical University, Ploshchad Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhniy Novgorod 603950, Russia

Aim. To study hemorheological changes and their correlation with the size of red blood cells (RBCs) during the treatment of thermal injury in children.

Methods. The study included 32 children ages 3 to 17 with burns affecting 10% to 70% of the total body area during the treatment period between the 3rd day after the burn and complete wound closure. Aggregation and disaggregation of red blood cells was analyzed using a H. Schmid-Schönbein et al. [1973] rheoscope in our modification. In addition, erythrocyte deformability, morphology of erythrocyte aggregates, and the state of erythrocyte cytoskeleton were studied using thermoinduction, and erythrocyte indices were calculated.

Results. After a burn injury, erythrocyte aggregation and the strength of erythrocyte aggregates were increased whereas their deformability was decreased. Disorders of blood rheology accompanied all stages of burn disease and remained at the patient discharge. Hemorheological disorders correlated with changes in fibrinogen concentrations and with changes in the erythrocyte cytoskeleton, size, and the amount of contained hemoglobin.

Conclusion. The stable and pronounced disorders of blood rheological properties in children with burn disease may be an essential cause for reduction of oxygen supply to vital organs and their failure. The measurement of erythrocyte indices may represent a simple though preliminary method for assessing hemorheology.

Keywords: children; burns; red blood cells; aggregation; disaggregation; cytoskeleton; deformability; erythrocyte indices.

For citation: Levin G.Ya., Popovicheva A.N., Sosnina L.N. Hemorheological disorders in children with thermal trauma.

Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal). 2020; 64(3): 74-79. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.74-79

For correspondence: *Levin Grigory Yakovlevich*, Doctor of Medical Sciences, Prof., Honored Scientist of the Russian Federation, e-mail: levin@unn.ac.ru

Contribution: research concept and design, text editing – Levin G.Ya.; collecting material, statistical processing of results, writing text – Popovicheva A.N., Sosnina L.N. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgments. The study did not have sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. The materials of the article have not been published anywhere before.

Resived 13.12.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Нарушения микроциркуляции всегда возникают после термической травмы и во многом определяют патогенез развития ожоговой болезни. Редукция снабжения кислородом жизненно важных органов вызывает развитие таких осложнений, как острая почечная недостаточность, респираторный дистресс-синдром, полиорганная недостаточность [1-3]. Кроме того, от состояния микроциркуляции зависит развитие вторичных некрозов после ожога, а также приживление аутотрансплантатов. Микроциркуляторные расстройства определяются прежде всего нарушениями реологических свойств крови, которые связаны главным образом с реологическими свойствами эритроцитов – их агрегацией и деформируемостью. Именно эти свойства эритроцитов определяют поддержание необходимой перфузии в микроциркуляторном русле. Исследований, посвященных изучению гемореологических свойств эритроцитов при ожоговой болезни, явно недостаточно [4]. Проводились они лишь в острый период ожоговой болезни и сохраняются ли нарушения гемореологии после полного закрытия ожоговых ран остается невыясненным [5]. Нет также данных об особенностях состояния гемореологии при ожоговой болезни у детей. Изучению этих вопросов посвящено настоящее исследование.

Цель исследования – изучение динамики изменения реологических свойств крови и их корреляции с параметрами эритроцитов в процессе лечения детей после термической травмы.

Методика

На проведение данной работы было получено разрешение локально-этического комитета Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава

России. Письменное информированное согласие на участие в исследовании было получено от родителей всех детей. В исследование были включены 32 больных ребенка в возрасте от 3 до 17 лет с ожогами площадью от 10 до 70% поверхности тела. Исследования проводили в период лечения, начиная с 3-х сут после термической травмы до полного закрытия ожоговых ран и выписки пациента из стационара.

Полученные результаты сравнивали с соответствующими показателями 18 условно здоровых детей обоих полов того же возраста.

Забор крови осуществляли утром, натощак, путем венепункции локтевой вены в вакуумные пробирки с 3,8% цитратом натрия (в соотношении 9:1) и К₃ЭДТА (для подсчета эритроцитарных индексов). Бедную тромбоцитами плазму получали центрифугированием крови, стабилизированной цитратом натрия (в соотношении 9:1) в течение 20 мин при 3000 об/мин. Тромбоциты и лейкоциты удаляли, эритроциты отмывали 3 раза физиологическим раствором. Кровь на исследование брали на 3-и – 5-е и 12-е – 16-е сут после ожога и после закрытия ожоговых ран (20-е сут и более).

1) Спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию эритроцитов изучали на приборе, сконструированном по принципу Н. Schmid-Schönbein и соавт. [6] в нашей модификации [7]. Описание прибора. В данном приборе клетки крови помещают между плоскопараллельными пластинами, вращающимися в противоположных направлениях. В центре нижней пластины имеется углубление. Таким образом, между нижней и верхней пластинами формируется камера, в которую помещается суспензия эритроцитов. Процесс агрегации эритроцитов регистрировали на самописце после гидродинамического перемешивания суспензии эритроцитов и его остановки. Процесс дезагрегации эритроцитов регистрировали на скоростях сдвига 5 с⁻¹, 10 с⁻¹, 15 с⁻¹, 20 с⁻¹. Оценивали степень агрегации (максимальная амплитуда Ма, мм); скорость агре-

гации A40 (мм) – амплитуда агрегатограммы через 40 с после начала агрегации; $t_{1/2}$ (с) – время, за которое достигается половина Ма; степень дезагрегации – в процентах от Ма.

2) Морфологию агрегатов в аутологичной плазме изучали с помощью светового микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия) методом, предложенным авторами [8].

3) Деформируемость эритроцитов определяли с помощью ригидометра [9]: Принцип действия его заключался в следующем: суспензия эритроцитов помещалась между двумя коаксиальными цилиндрами, создавался ламинарный поток, в котором эритроциты деформировались (вытягивались) и фиксировались в этом положении с помощью 0,5 % раствора глутаральдегида. Количество деформированных (вытянутых) эритроцитов (% общей деформируемости) и коэффициенты их деформируемости $\frac{A}{B}$; $\frac{A-B}{A+B}$ (A – длина эритроцита, B – ширина эритроцита) были определены с помощью специально разработанной программы.

4) Состояние цитоскелета эритроцитов изучали с помощью метода термоиндукции. Принцип его основан на том, что основной белок цитоскелета эритроцитов спектрин при прогревании клеток в диапазоне 49–50 °C денатурирует [10]. Как результат наблюдается диск-сферическая трансформация – дискоциты трансформируются в микрофероциты. Увеличение количества микросфероцитов по сравнению с контролем свидетельствует о снижении стабильности цитоскелета эритроцитов.

5) У всех пациентов кондуктометрическим методом на гематологическом анализаторе (Hematology analyzer ABX Pentra 60, HORIBA Medical, France) определяли средний объем эритроцита (mean cell volume, MCV), ширину распределения эритроцитов по объему (red cell distribution width, RDW), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC).

6) У всех пациентов определяли концентрацию фибриногена по методу Клауса.

Данные представлены как выборочное среднее \pm стандартное отклонение. Количественные показатели прошли проверку на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка (пакет программ «Statistica 6.0»). Результаты исследования обработаны методами непараметрической статистики с применением критериев Манна–Уитни и парных сравнений Вилкоксона. Для изучения взаимосвязей между изучаемыми параметрами применяли корреляционный анализ (метод Спирмена). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Как видно из данных, представленных в **табл. 1**, начиная с острых периодов ожоговой болезни, резко увеличивается как скорость, так и степень агрегации эритроцитов. При этом значительное увеличение агрегации

эритроцитов происходит и у больных с относительно небольшой площадью ожоговых ран (10%). Достаточно неожиданным оказался тот факт, что даже после закрытия ожоговых ран, при выписке больных, агрегация эритроцитов остается увеличенной (**табл. 1**). Лишь у 25 % больных агрегация эритроцитов при выписке нормализовалась. Следует отметить, что при ожогах значительно изменяется и морфология агрегатов эритроцитов – наряду с «монетными столбиками» появляются глыбчатые (патологические) структуры агрегатов эритроцитов (**рисунок**). Эти изменения сохраняются и по окончании лечения. Неблагоприятным для процессов микроциркуляции являлся факт значительного снижения дезагрегации эритроцитов на низких скоростях сдвига (**табл. 1**). Это свидетельствует о возможности агрегации эритроцитов в более крупных сосудах, чем в капиллярах и малых венах. Сниженная дезагрегация эритроцитов при малых скоростях сдвига (5с^{-1} , 10с^{-1}) остается и при выписке больных из стационара.

Значительно ухудшается в острый период ожоговой болезни и деформируемость эритроцитов (**табл. 2**) Снижается не только общее количество деформируемых в искусственном сдвиговом потоке клеток, но и коэффициенты деформируемости $\frac{A}{B}$ и $\frac{A-B}{A+B}$. Резко снижается и число наиболее сильно вытянутых эритроцитов. Увеличение ригидности эритроцитов сохраняется и после закрытия ожоговых ран при выписке больных (**табл. 2**).

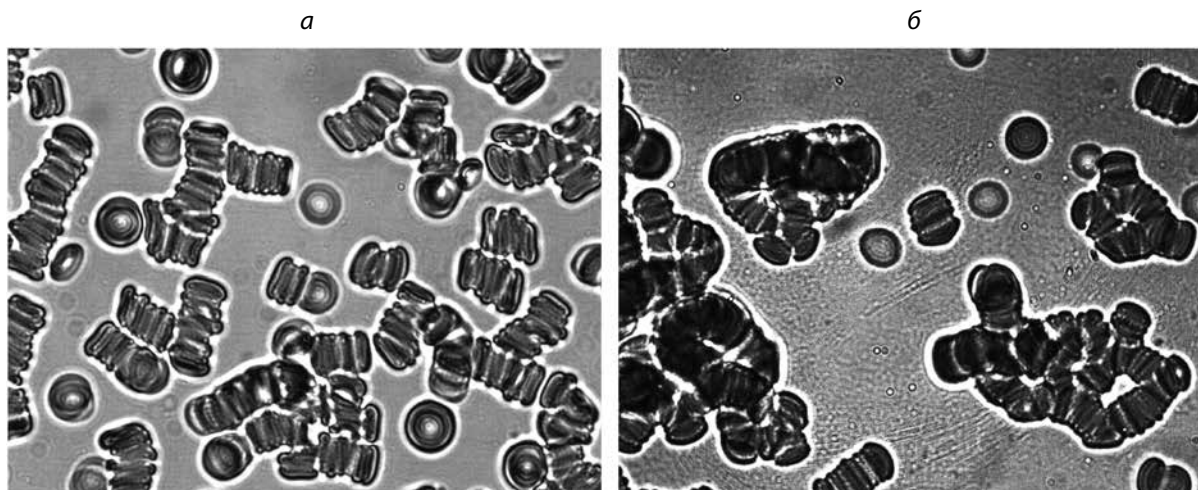
У всех обследованных больных выявлены существенные нарушения стабильного состояния цитоскелета эритроцитов. Это проявлялось в значительном статистически значимом увеличении после термоиндукции количества микросфероцитов по сравнению с показателями термоиндукции донорских эритроцитов. На 3-и – 8-е сут после ожога количество микросфероцитов составляло после термоиндукции в среднем $93,73 \pm 1,48\%$, на 12-е – 16-е сут – $95,00 \pm 1,68\%$, а при выписке – $84,45 \pm 5,18\%$ по сравнению с контролем ($50,65 \pm 6,70\%$). Незначительное (хотя и статистически незначимое) улучшение показателей термоиндукции эритроцитов отмечалось лишь в конце лечения.

Результаты исследования эритроцитарных индексов у больных в процессе лечения ожоговой болезни представлены в **табл. 3**. Установлено, что ширина распределения эритроцитов (RDW) увеличивается в ближайшее время после термической травмы и это увеличение сохраняется до полного закрытия ожоговых ран и выписки пациентов. Однако средний объем эритроцитов (MCV), напротив, снижается после ожога, и эти изменения также сохраняются до выписки больного. Установлено, что степень изменения эритроцитарных индексов зависит от тяжести термической травмы (**табл. 3**).

Обсуждение

Таким образом, установлено, что ожоги у детей сопровождаются значительным ухудшением реологических свойств крови. Это является важным фактором патогенеза ожоговой болезни и лежит в основе нарушений микроциркуляции и снижения оксигенации тканей.

Причины возникновения гиперагрегации эритроцитов при ожоговой болезни многочисленны. К ним относятся активация свободнорадикального окисления, протеолиз, повышение концентрации в крови белков острой фазы воспаления [11, 12]. Полученные нами данные подтверждают это положение. Отмечена статистически значимая корреляция между концентрацией фибриногена, скоростью и степенью агрегации



Морфология агрегатов эритроцитов при ожоговой болезни.

а – здоровые доноры, б – ожоговая болезнь. ×1000.

Таблица 1

Влияние термической травмы на агрегацию эритроцитов

Показатель	Параметр агрегации	Контроль	3-и – 8-е сут после ожога	12-е – 16-е сут после ожога	20 сут и более после ожога	
Агрегация эритроцитов	Ma, мм	78,89±8,69	97,20±14,49 *	88,00±14,09 *	85,13±12,22	
	A40, мм	55,06±10,81	79,12±14,82 *	69,04±13,67*	63,56±13,71*	
	$t_{1/2}, c$	18,17±7,26	9,96±3,69 *	10,71±3,63*	13,94±8,68*	
Дезагрегация эритроцитов, %	Скорость сдвига, c ⁻¹	5	19,71±11,77	10,88±8,44*	13,29±9,85*	10,71±9,20 *
		10	45,68±16,93	31,38±15,68*	34,56±17,42*	34,80±12,25
		15	54,71±19,04	57,72±12,35	61,04±13,60	57,46±7,90
		20	63,82±15,41	64,54±11,37	66,19±5,65	63,73±5,65

Примечание. * $p < 0,05$ – сравнение с контролем, критерий Манна–Уитни.

Таблица 2

Влияние термической травмы на деформируемость эритроцитов

Параметр деформируемости		Контроль	3-и – 5-е сут после ожога	12-е – 16-е сут после ожога	20 сут и более после ожога
Общая деформируемость, %		91,04±6,35	78,3±13,75 *	75,71±12,71 *	72,91±16,64 *
Коэффициент деформируемости	$\frac{A}{B}$	2,76±0,22	2,34±0,36 *	2,32±0,34 *	2,27±0,34 *
	$\frac{A-B}{A+B}$	0,42±0,04	0,36±0,06 *	0,35±0,06 *	0,34±0,07 *

Примечание. * $p < 0,05$ – сравнение с контролем, критерий Манна–Уитни.

ции эритроцитов не только в острый период ожоговой болезни, но и при полном закрытии ожоговых ран при выписке больного (табл. 4). В меньшей степени это касается больных с относительно небольшой площадью ожога (менее 30 % поверхности тела).

Можно полагать, что гиперагрегация эритроцитов при ожоговой болезни связана не только с плазменными факторами, но и с изменениями мембраны и цитоскелета самих эритроцитов. Об этом свидетельствуют прежде всего результаты термоиндукции. Незначительное улучшение ее показателей происходит лишь к концу лечения.

Известно, что на функциональных свойствах клеток крови отражаются и изменения их размеров [13]. В последние годы многочисленные исследования показали, что более высокие значения RDW связаны с рядом патологических состояний, включая сердечную недостаточность, венозные тромбозы, онкологические заболевания [14–17]. Нами установлено, что в ближайшее время после термической травмы и до полного закрытия ожоговых ран показатель RDW остается повышенным, а MCV – сниженным (табл. 3). Степень изменений этих показателей зависит от тяжести термической травмы. Это соответствует данным литературы о том, что эритроцитарные индексы могут служить мар-

керами тяжести различных патологических состояний [18, 19]. Можно предположить, что снижение MCV связано в значительной степени с усиленной микровезикуляцией эритроцитов при ожоговой болезни [20].

Важнейшим фактором гемореологии является деформируемость эритроцитов. Деформируемость эритроцитов обеспечивает поток крови на уровне микроциркуляции и насыщение тканей кислородом. Способность эритроцитов к деформации определяется внутренней вязкостью, вязкоэластическими свойствами мембраны и отношением объема эритроцита к его площади. Поэтому имеет важное практическое значение получение данных в том, что значительное снижение деформируемости эритроцитов происходит в ближайшие сроки после термической травмы и остаются не менее существенными вплоть до реконвалесценции и выписки больного. Лишь в 25 % случаев пациент выписывается с полностью нормализованной деформируемостью эритроцитов. Важной причиной увеличения ригидности эритроцитов при ожогах является снижение MCV эритроцитов. При этом меняется отношение Hb к объему эритроцита (табл. 3). Отмечена корреляция между коэффициентом деформируемости $\frac{A-B}{A+B}$ и MCHC ($r = 0,48, p = 0,042$). Наиболее неблагоприятным

Таблица 3

Влияние термической травмы на эритроцитарные индексы

Площадь ожога	Эритроцитарный индекс	Контроль	3-и – 5-е сут после ожога	12-е – 16-е сут после ожога	20 сут и более после ожога
Площадь ожога	MCHC, g/l	333,94±6,29	361,91±8,24*	361,45±9,86*	361,13±14,25*
	MCV, fl	85,69±4,78	78,04±5,90*	78,23±5,35*	76,47±4,76*
	RDW, %	12,00±0,65	14,79±2,13*	15,00±2,09*	15,82±2,62*
Площадь ожога < 30%	MCHC, g/l	333,94±6,29	356,33±7,20	356,67±6,44	367,00±14,85
	MCV, fl	85,69±4,78	81,00±3,58*	80,17±3,06*	78,75±2,50*
	RDW, %	12,00±0,65	13,57±0,60*	13,68±0,12*	14,35±0,58*
Площадь ожога > 30%	MCHC, g/l	333,94±6,29	363,88±7,83	363,25±10,47*	359,17±14,65*
	MCV, fl	85,69±4,78	77,00±6,27*	77,50±5,91	75,64±5,20
	RDW, %	12,00±0,65	15,22±2,31*	15,50±2,27*	16,35±2,89*

Примечание. * $p < 0,05$ – сравнение с контролем, критерий Манна–Уитни.

Таблица 4

Корреляция агрегации эритроцитов и уровня фибриногена

Площадь ожога	Параметр агрегации	3-и – 5-е сут после ожога		20 сут и более после ожога	
		r	p	r	p
Общая площадь ожога	Ma (мм)	0,59	0,002	0,59	0,026
	A40 (мм)	0,62	0,001	0,69	0,006
	$t_{1/2}$ (с)	-0,41	0,045	-0,60	0,023
Площадь ожога > 30%	Ma (мм)	0,68	0,002	0,64	0,044
	A40 (мм)	0,72	0,0008	0,72	0,019
	$t_{1/2}$ (с)	-0,60	0,009	-0,60	0,028

для микроциркуляции является сочетание снижения деформируемости с повышением RDW.

Заключение

Установлено, что у детей после ожога даже на относительно небольшой площади поверхности тела происходят значительные нарушения реологических свойств крови (агрегации, дезагрегации эритроцитов и их деформируемости), которые сохраняются вплоть до полного закрытия ожоговых ран. Выявлена высокая корреляция между степенью нарушений гемореологии и концентрацией в плазме фибриногена, а также клеточными факторами, которые характеризовались изменением эритроцитарных индексов RDW, MCV, MCHC.

Литература

(п.п. 3; 5; 6; 8; 10; 13-20 см. References)

1. Моррисон В.В., Божедомов А.Ю. Дисфункция эндотелия при синдроме полиорганной недостаточности у больных с термической травмой. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2013; 12(2): 43-8.
2. Ермоленко В.М., Николаев А.Ю. *Острая почечная недостаточность: руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017.
4. Самойленко Г.Е., Колесник А.И., Синяченко О.В., Андреев О.В. Эндотелиальная функция сосудов и реологические свойства крови при ожоговой травме. *Травма*. 2018; 19(5): 53-8.
7. Левин Г.Я., Модин А.П., Кудрицкий С.Ю., Соснина Л.Н. *Устройство для исследования агрегации тромбоцитов*. Патент 2278381, РФ; 2006.
9. Левин Г.Я., Яхно В.Г., Царевский Н.Н. *Устройство для деформации эритроцитов в сдвиговом потоке*. Патент 1363065, РФ; 1987.
11. Ковальчук В.И. Состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса при термическом ожоге кожи в эксперименте и клинике. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2015; 1(49): 73-8.
12. Гладиллин Г.П., Иваненко И.Л., Шулаева Н.М., Островский Н.В., Никитина В.В., Веретеников С.И., Калинычева А.Е. Прогностическое значение гемокоагуляционных тестов у пациентов с тяжелыми ожогами. *Современные проблемы науки и образования*. 2016; (7): 1-2.

References

1. Morrison V.V., Bozhedomov A.J. Dysfunction of endothelium at multiorgan failure syndrome by burn patients. *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya*. 2013; 12(2): 43-8. (in Russian)
2. Ermolenko V.M., Nikolaev A.Yu. *Acute renal failure: a guide*. Moscow: GEOTAR-Media, 2017. (in Russian)

Сведения об авторах:

Левин Григорий Яковлевич, доктор мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, вед. науч. сотр., руководитель отделения гравитационной хирургии и гемодиализа Университетской клиники ФГБУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, e-mail: levin@unn.ac.ru;

Поповичева Александра Николаевна, мл. науч. сотр. отд-ния гравитационной хирургии и гемодиализа Университетской клиники ФГБУ ВО «ПИМУ» Минздрава России;

Соснина Лариса Николаевна, мл. науч. сотр. отд-ния гравитационной хирургии и гемодиализа Университетской клиники ФГБУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

3. Salman D, Finney SJ, Griffiths MJ. Strategies to reduce ventilator-associated lung injury (VALI). *Burns*. 2013; 39(March (2)): 200-11.
4. Samoilenko G.Y., Kolesnik A.I., Syniachenko O.V., Andreiev O.V. Endothelial function of the vessels and rheological blood properties in burn injury. *Travma*. 2018; 19(5): 53-8.
5. Levin G.Y., Egorihina MN. Aggregation of erythrocytes in burn disease. *Int J Burn Trauma*. 2011; 1(September (1)): 34-41.
6. Schmid-Schönbein H., von Gosen J., Heinich L., Klose H.J., Volger E. Counter-rotating "rheoscope chamber" for the study of the micro-rheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry. *Microvasc Res*. 1973; 6 (November (3)): 366-76.
7. Levin G.Ya., Modin A.P., Kudritsky S.Yu., Sosnina L.N. *Device for researching platelet aggregation*. Patent 2278381, RF; 2006. (in Russian)
8. Sheremet'ev Yu.A., Popovicheva A.N., Levin G.Y. Lysophosphatidic acid and human erythrocyte aggregation. *Cell and Tissue Biology* 2014; 8(3): 237-43.
9. Levin G.Ya, Yakhno V.G., Tsarevsky N.N. *The device for the deformation of erythrocytes in a shear flow* Patent 1363065, RF; 1987. (in Russian)
10. Sheremet'ev Yu.A., Popovicheva A.N., Levin G.Ya. A study of the mechanism of the FeCl₃-induced aggregation of human erythrocytes. *Biophysics* 2018; 63(4): 561-65.
11. Kovalchuk V.I. The state of the prooxidant-antioxidant balance during thermal burns of the skin in the experiment and clinic. *Zhurnal Grodenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2015; 1(49): 73-8. (in Russian)
12. Gladilin G.P., Ivanenko I.L., Shulaeva N.M., Ostrovsky N.V., Nikitina V.V., Veretennikov S.I., Kalinycheva A.E. Prognostic value of hemocoagulation tests in patients with severe burns. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; (7): 1-2. (in Russian)
13. Pizzulli L., Yang A., Martin J.F., Lüderitz B. Changes in platelet size and count in unstable angina compared to stable angina or non-cardiac chest pain. *Eur Heart J*. 1998; 19 (January (1)): 80-4.
14. Subhashree A., Shanthi B., Parameaswari P. The red cell distribution width as a sensitive biomarker for assessing the pulmonary function in automobile welders - a cross sectional study. *J Clin Diagn Res*. 2013; 7 (January (1)): 89-92.
15. Zöller B., Melander O., Svensson P., Engström G. Red cell distribution width and risk for venous thromboembolism: a population-based cohort study. *Thromb Res*. 2014; 133 (March (3)): 334-9.
16. Ay S., Eryilmaz M.A., Aksoy N., Okus A., Unlu Y., Sevinc B. Is early detection of colon cancer possible with red blood cell distribution width? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16(2): 753-6.
17. Montagnana M., Danese E. Red cell distribution width and cancer. *Ann Transl Med*. 2016; 4 (October (20)): 399.
18. Jia H., Li H., Zhang Y., Li C., Hu Y., Xia C. Association between red blood cell distribution width (RDW) and carotid artery atherosclerosis (CAS) in patients with primary ischemic stroke. *Arch Gerontol Geriatr*. 2015; 61 (July-August (1)): 72-5.
19. Turcato G., Serafini V., Dilda A., Bovo C., Caruso B., Ricci G. et al. Red blood cell distribution width independently predicts medium-term mortality and major adverse cardiac events after an acute coronary syndrome. *Ann Transl Med*. 2016; 4 (July (13)): 254. doi: 10.21037/atm.2016.06.35.
20. Porter John Robert Stephen. *Microvesicles as mediators of inflammation in severe burn injury MD Thesis*. 2015.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.9

Оганесян Д.Х.^{1,2}, Брин В.Б.^{1,2}, Кабисов О.Т.²

Изменение параметров системной гемодинамики на фоне гиперкальциемии в условиях сочетанного и изолированного введения кобальта и цинка

¹ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 362025, РСО-Алания, г. Владикавказ, Россия, ул. Пушкинская, д. 40;

²ФГБНУ «Институт биомедицинских исследований ВНЦ РАН» 362025, РСО-Алания, г. Владикавказ, Россия, ул. Пушкинская, д. 47.

Введение. В организме кальций находится в 3 формах — связанный с белком, главным образом с альбумином, входит в комплекс с бикарбонатом, лактатом, фосфатом и цитратом, и 50% Са в крови находится в ионизированном виде Са⁺⁺. Цинк является составной частью металлоэнзимов, таких как карбоангидраза, карбоксипептидаза и ДНК-полимераза. Кобальт относится к тем металлам, с которыми кальций взаимодействует в металлоактивных ферментных системах. Установлено, что кобальт может депонироваться в матриксе лизосом в результате образования комплекса с анионными группами и вступить в конкурентную борьбу с ионами Са²⁺ и Mg²⁺ за связывание с активными центрами протонной помпы.

Цель исследования – изучение особенностей изменения параметров системной гемодинамики на фоне гиперкальциемии в условиях сочетанного и изолированного введения солей тяжелых металлов кобальта и цинка.

Методика. Экспериментальную гиперкальциемию у крыс Вистар воспроизводили ежедневным однократным введением 3000 МЕ препарата «Аквадетрим». Хлориды кобальта (4 мг/кг) и цинка (20 мг/кг) вводили внутривенно с помощью зонда ежедневно на протяжении 1 мес. По завершении эксперимента определяли основные параметры системной гемодинамики: артериальное давление инвазивно, путем введения в бедренную артерию катетера; минутный объем крови регистрировали с помощью метода термодилуции, для чего через левую общую сонную артерию в дугу аорты вводился термистор. Рассчитывали по специальным формулам среднее артериальное давление, сердечный индекс, ударный индекс и удельное периферическое сосудистое сопротивление.

Результаты. Исследование показало, что при внутривенном введении в течение месяца хлорида кобальта и цинка развивается артериальная гипертензия гипокINETического типа. Экспериментальная гиперкальциемия оказывает некоторое протекторное влияние на развитие кобальтовой интоксикации, а при сочетанном введении кобальта и цинка на фоне гиперкальциемии эффекты металлов усиливаются. Также установлено, что сочетанное введение солей кобальта и цинка вызывает менее выраженный эффект на параметры системной гемодинамики, чем раздельное применение металлов.

Заключение. Избыточное поступление хлоридов кобальта и цинка в организм приводит к развитию артериальной гипертензии. Гиперкальциемия может изменять токсические эффекты тяжелых металлов. Сочетанное введение кобальта и цинка оказывает менее выраженный эффект на параметры системной гемодинамики.

Ключевые слова: тяжелые металлы; хлорид кобальта; хлорид цинка; системная гемодинамика; гиперкальциемия; крысы.

Для цитирования: Оганесян Д.Х., Брин В.Б., Кабисов О.Т. Изменение параметров системной гемодинамики на фоне гиперкальциемии в условиях сочетанного и изолированного введения кобальта и цинка. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 80-86.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.80-86

Для корреспонденции: Брин Вадим Борисович, e-mail: vbbrin@yandex.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Оганесян Д.Х., Брин В.Б., Кабисов О.Т.; сбор и обработка материала – Оганесян Д.Х., Брин В.Б., Кабисов О.Т.; подготовка иллюстративного материала – Оганесян Д.Х., Брин В.Б., Кабисов О.Т.; статистическая обработка – Оганесян Д.Х., Брин В.Б., Кабисов О.Т.; написание текста – Оганесян Д.Х., Брин В.Б., Кабисов О.Т.; редактирование – Оганесян Д.Х., Брин В.Б., Кабисов О.Т. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.04.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликовано 21.08.2020

Oganesyan D.H.^{1,2}, Brin V.B.^{1,2}, Kabisov O.T.²**Changes in parameters of systemic hemodynamics associated with hypercalcemia in combined and isolated administration of cobalt and zinc**¹North Ossetian State Medical Academy, Pushkinskaya Str. 40, Vladikavkaz 362025, North Ossetia-Alania, Russia;²Institute of Biomedical Research of the Vladikavkaz Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya Str. 47, Vladikavkaz 362025. North Ossetia-Alania, Russia

Calcium belongs to essential macronutrients. In the human body, calcium exists in three forms: bound to proteins, primarily to albumin; as a complex with bicarbonate, lactate, phosphate, or citrate; and as an ionized form of Ca^{2+} (which accounts for 50% of circulating Ca). Zinc is one of the most important trace elements of the body and an integral part of metalloenzymes, such as carbonic anhydrase, carboxypeptidase, and DNA polymerase. Cobalt belongs to the metals with which calcium interacts in metal-active enzyme systems. Cobalt is able to deposit in the lysosomal matrix by complexation with anionic groups and to compete with Ca^{2+} and Mg^{2+} for binding to active centers of the proton pump.

The aim of this work was to study changes in parameters of the systemic hemodynamics during hypercalcemia in combined and isolated administration of heavy metal salts of cobalt and zinc.

Methods. Experimental hypercalcemia was induced in Wistar rats by intragastrical administration of a water-soluble vitamin D-3 drug Aquadetrim (3,000 IU, daily for one month). Cobalt chloride (4 mg/kg) and zinc chloride (20 mg/kg) were administered intragastrically with a probe, daily for one month. Upon completion of the experiment, the following major indexes of the systemic hemodynamics were determined: blood pressure was measured invasively, with a catheter inserted into the femoral artery, and minute blood volume was recorded using the thermodilution method, with a thermistor introduced into the aortic arch through the left common carotid artery. Mean blood pressure, cardiac index, stroke index, and specific peripheral vascular resistance were calculated using special formulas.

Results showed that the monthly intragastric administration of cobalt chloride and zinc chloride was associated with hypokinetic type hypertension. Experimental hypercalcemia provided some protection against cobalt intoxication but the combined administration of the metals during hypercalcemia enhanced their toxicity. The combined administration of cobalt and zinc chloride produced a less pronounced effect on indexes of the systemic hemodynamics than each metal alone.

Conclusion. Excessive intake of cobalt chloride and zinc chloride results in arterial hypertension. Hypercalcemia may change the toxic effects of heavy metals. The combined administration of cobalt with zinc produced a less pronounced effect on parameters of the systemic hemodynamics.

Keywords: heavy metals; cobalt chloride; zinc chloride; systemic hemodynamics; hypercalcemia; rats.

For citation: Oganesyan D.H., Brin V.B., Kabisov O.T. Changes in parameters of systemic hemodynamics associated with hypercalcemia in combined and isolated administration of cobalt and zinc. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 80-86. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.80-86

For correspondence: Vadim B. Brin, Doctor of Medical Sciences, Professor, FSBEI of HE «North Ossetian State Medical Academy» of the Ministry of Health, 40 Pushkinskaya str., 362025, North Ossetia-Alania, Vladikavkaz, Russia. Head of the department of physiology and pathology of visceral systems, FSBI «Institute of Biomedical Research VSC RAS», 47 Pushkinskaya str., 362025. North Ossetia-Alania, Vladikavkaz, Russia. e-mail: vbbrin@yandex.ru

Contribution: research concept and design – Oganesyan D.H., Brin V.B., Kabisov O.T.; material collecting and processing – Oganesyan D.H., Brin V.B., Kabisov O.T.; preparation of illustrative material – Oganesyan D.H., Brin V.B., Kabisov O.T.; statistical processing of results – Oganesyan D.H., Brin V.B., Kabisov O.T.; writing text – Oganesyan D.H., Brin V.B., Kabisov O.T.; text editing – Oganesyan D.H., Brin V.B., Kabisov O.T. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:Brin V.B., <https://orcid.org/0000-0001-8382-3210>Oganesyan D.H., <https://orcid.org/0000-0002-6097-438X>

Received 09.04.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Кальций относится к эссенциальным макроэлементам. В организме он находится в 3 формах — связанный с белком, главным образом с альбумином, во-

дит в комплекс с бикарбонатом, лактатом, фосфатом и цитратом, и 50% Са в крови находится в ионизированном виде Ca^{+2} . Ионы кальция могут выступать мо-

лекулярным триггером для внутриклеточной и синаптической передачи, участвуют в регуляции проницаемости клеточных мембран [1].

Главными регуляторами кальциевого гомеостаза в организме являются паратирин, витамин D₃ и кальцитонин¹. Гиперкальциемический эффект витамина D₃ обусловлен его способностью увеличивать всасывание иона в кишечнике и повышать его реабсорбцию в канальцах почек [2]. Обладая выраженными ионообменными (замещающими) свойствами, кальций относится к конкурентным биометаллам по отношению к большинству тяжёлых металлов и в условиях повышенных концентраций способен снижать их токсические эффекты [3,4].

Цинк – один из важнейших микроэлементов нашего организма является составной частью металлоэнзимов, таких как карбоангидраза, карбоксипептидаза и ДНК-полимераза, является кофактором более 300 металлоферментов и более 200 транскрипционных факторов. При алкогольном и других видах поражения печени добавление в рацион пищевых добавок с цинком значительно снижает тяжесть течения заболевания [5].

Кобальт также относится к тем металлам, с которыми кальций взаимодействует в металлоактивных ферментных системах. Установлено, что кобальт может депонироваться в матриксе лизосом в результате образования комплекса с анионными группами и вступать в конкурентную борьбу с ионами Ca²⁺ и Mg²⁺ за связывание с активными центрами протонной помпы [6]. В эксперименте показано, что добавление наночастиц кобальта в рацион способствует благоприятному влиянию на организм в виде накопления эссенциальных макроэлементов, в том числе кальция, в организме. Однако чрезмерное поступление кобальта в организм в количествах, превышающих ПДК, приводит к кумуляции ксенобиотика в органах и тканях (печень, сердце, почки, кости) и к их структурно-функциональным повреждениям [7]. В экспериментах на крысах наблюдалось значительное увеличение систолического, диастолического и среднего артериального давления, и изменения электрокардиограммы.

В научной литературе имеются данные о влиянии кобальта и цинка на отдельные органы и на организм в целом при их изолированном избыточном поступлении в организм. Вместе с тем анализ влияния на системную гемодинамику сочетанного введения цинка

и кобальта на фоне гиперкальциемии в современной литературе практически отсутствует.

Цель исследования – изучение особенностей изменения параметров системной гемодинамики на фоне гиперкальциемии в условиях сочетанного и изолированного введения солей тяжелых металлов кобальта и цинка.

Методика

Работа выполнена на 96 половозрелых крысах-самцах Вистар с средней массой 276±20 г. Сформировано 8 опытных групп животных (в каждой группе 12 крыс): 1-я группа – контрольная; 2-я группа – животные с интрагастральным введением витамина D₃; 3-я группа – животные с изолированным внутрижелудочным (в/ж) введением хлорида цинка (суточная доза 20 мг/кг); 4-я группа – животные с комбинированным введением хлорида цинка и витамина D₃; 5-я группа – животные с изолированным введением хлорида кобальта (4 мг/кг); 6-я группа – комбинированное введение хлорида кобальта и витамина D₃; 7-я группа – животные с комбинированным введением металлов (цинк+ кобальт); 8-я группа – животные с комбинированным введением металлов (цинк, кобальт) при гиперкальциемии, вызванной введением витамина D₃.

Животные находились на стандартном пищевом рационе, при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Исследование проводили в весенний период года. При проведении экспериментов руководствовались 11-й статьёй Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных» (1985 г.) (пересмотр 2008 г.) и правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 01.04.16 № 199). Все исследования проводились под золотильным наркозом (5 мг на 100 г массы).

Гиперкальциемию моделировали ежедневным интрагастральным введением через атравматичный зонд препарата «Аквадетрим» (аналог витамина D₃) в дозировке 3000 МЕ (0,2 мл)/100 г массы.

По завершении эксперимента (30 сут) определяли артериальное давление путём катетеризации бедренной артерии. Катетер заполняли 10 % раствором гепарина и подключали к электроманометру «ДДА» монитора МХ-04. Для измерения минутного объёма крови через левую общую сонную артерию в дугу аорты вводили термистор МТ-54М. Физиологический раствор фиксируемой комнатной температуры объёмом 0,2 мл вводили в правое предсердие через катетеризирован-

¹Брин В.Б. и др. Способ моделирования хронической токсической артериальной гипертензии и кардиопатии у экспериментальных животных. Патент 2462762, РФ; 2012. Патент 2462762, РФ; 2012.

ную правую яремную вену. Кривые терморазведения регистрировали на самописце ЭПП-5. Рассчитывали среднее артериальное давление (САД), сердечный индекс (СИ), ударный индекс (УИ) и удельное периферическое сосудистое сопротивление (УПСС). Частоту сердечных сокращений (ЧСС) определяли с помощью монитора МХ-04.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 10. Для количественной оценки данных рассчитывали статистические показатели: среднюю арифметическую и ошибку средней ($M \pm m$), медиану (Me) и [25–75] процентиля выборки. Для оценки статистической значимости отличий ввиду небольшого количества животных в сравниваемых группах использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. О наличии значимых различий и факторных влияний судили при критическом уровне значимости (p) меньше 0,05.

Результаты и обсуждение

Определение основных параметров системной гемодинамики позволило установить, что изолированное пероральное введение хлорида цинка способствует повышению среднего артериального давления, что было обусловлено нарастанием УПСС (табл. 1) по сравнению с контрольной группой животных. Под влиянием

хлорида цинка было отмечено изменение параметров, характеризующих насосную деятельность сердца – снижался сердечный индекс в результате уменьшения ударного индекса по сравнению с группой контроля. При этом имело место повышение частоты сердечных сокращений.

В доступной литературе имеются данные о том, что повышенная концентрация цинка вызывает усиленную гибель клеток различных типов [8], в том числе и гибель кардиомиоцитов [9]. Данное влияние скорее всего и приводит к вышеописанным изменениям насосной функции сердца. Сочетанное введение аналога витамина D_3 и хлорида цинка также приводило к изменениям параметров системной гемодинамики, аналогичным изолированному введению металла (табл. 1). Вероятнее всего, происходит суммация эффекта тяжелого металла и витамина D_3 , так как в группе с изолированным введением витамина также наблюдается изменение параметров системной гемодинамики в виде нарастания САД, ЧСС, УПСС и снижения насосной функции сердца.

Параметры системной гемодинамики при интрагастральном введении солей кобальта менялись аналогично эффектам введения хлорида цинка, но изменения были более выраженными (табл. 2). Отмечалось более значимое повышение среднего артериального

Таблица 1

Параметры системной гемодинамики на фоне гиперкальциемии в условиях интоксикации хлоридом цинка

Условия опыта	Стат. показат.	САД (мм рт. ст.)	ЧСС (уд. в мин.)	СИ (мл/100г)	УИ (мл/100г)	УПСС (усл. ед)
Фон	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	103,80±1,01 105 [100-106]	364,00±8,16 358 [348-381]	55,24±2,35 55,17 [52-58]	0,15±0,01 0,15 [0,14-0,16]	1,46±0,05 1,43 [1,32-1,58]
Введение витамина D_3	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	114,10±2,38 115 [107-120]	390,00±10,40 395 [376-408]	43,82±1,81 47,37 [40-48]	0,12±0,01 0,12 [0,10-0,13]	2,01±0,05 1,94 [1,82-2,26]
	$p_{\text{фон}}$	<0,05	<0,05	<0,002	<0,001	<0,001
Введение Zn	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	127,30±0,98 128 [126-129]	399,50±4,31 396 [393-402]	46,89±1,29 47,35 [43-48]	0,126±0,001 0,13 [0,12-0,13]	2,49±0,04 2,51 [2,44-2,53]
	$p_{\text{фон}}$	<0,001	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001
Введение Zn + витамина D_3	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	127,90±3,80 131 [122-132]	372,10±10,50 376 [347-389]	43,92±2,27 43,21 [40-45]	0,129±0,003 0,13 [0,13-0,14]	2,37±0,17 2,22 [2,16-2,74]
	$p_{\text{фон}}$	<0,001	----	<0,001	<0,01	<0,001
	p_{Zn}	----	----	----	----	----
	$p_{\text{вит } D_3}$	<0,01	----	----	<0,01	<0,05

Примечание. $M \pm m$ – среднееарифметическое значение выборки, Me – медиана, Pr- [25–75] процентиля выборки, p – уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей.

давления по сравнению с группой контроля. Приросту давления способствовало нарастание сосудистого сопротивления. Интоксикация хлоридом кобальта, видимо, приводит к повреждению миокарда, поскольку имеет место снижение показателей, характеризующих насосную деятельность сердца (ударный и сердечный индексы). Таким образом, тяжелые металлы вызывают артериальную гипертензию гипокинетического типа, так как снижается сердечный выброс и растет сосудистое сопротивление.

У экспериментальных животных, получавших хлорид кобальта в условиях гиперкальциемии имеет место меньший подъём среднего артериального давления (табл. 2) по сравнению с группой животных, изолированно получавших хлорид кобальта, что было обусловлено наличием менее выраженных изменений УПСС. Вероятнее всего, данное явление связано с тем, что кобальт и кальций являются двухвалентными катионами и вступают в конкурентные отношения.

Одновременно с этим наблюдалось частичное восстановление сердечного и ударного индексов относительно значений группы животных, получавших изолированно хлорид кобальта, что позволяет судить об улучшении насосной функции сердца за счёт протекторного воздействия гиперкальциемии.

В группе, где имела место интоксикация двумя металлами, было отмечено значимое увеличение средне-

го артериального давления по сравнению с группой контроля, но величина давления была ниже при сравнении с изолированным введением цинка и кобальта. В этой же группе наблюдалось повышение удельного периферического сосудистого сопротивления, так же по отношению к группе контроля, а по отношению к изолированному введению металлов была отмечена тенденция к восстановлению параметра. На фоне длительной интоксикации двумя металлами было также отмечено падение сердечного индекса относительно группы контроля вследствие уменьшения ударного индекса, но изменения были менее выраженными, чем при раздельном введении металлов. В доступной литературе есть сведения о том, что дефицит цинка в клетках эндотелия сосудов, усиливает воспалительный ответ [10] через механизмы, связанные с увеличением клеточного окислительного стресса, однако цинковые добавки в рацион защищают сосудистую систему от окислительного повреждения [11].

В группе животных, где сочеталось введение металлов (цинк + кобальт), длительное поступление цинка в организм, вероятнее всего, оказывало протекторное влияние на сердечно-сосудистую систему в условиях интоксикации кобальтом. Возможно, взаимодействие в организме цинка с кобальтом схоже с результатами изучения взаимодействия цинка с кадмием, где показано, что цинк либо вытесняет кадмий, либо является

Таблица 2

Параметры системной гемодинамики на фоне гиперкальциемии в условиях интоксикации хлоридом кобальта

Условия опыта	Стат. показат.	САД (мм рт. ст.)	ЧСС (уд. в мин.)	СИ (мл/100г)	УИ (мл/100г)	УПСС (усл. ед)
Фон	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	103,80±1,01 105 [100-106]	364±8,16 358 [348-381]	55,24±2,35 55,17 [52-58]	0,15±0,01 0,15 [0,14-0,16]	1,46±0,05 1,43 [1,32-1,58]
	Введение витамина D ₃	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	114,10±2,38 115 [107-120]	390±10,4 395 [375-408]	43,82±1,81 47,37 [40-48]	0,115±0,005 0,12 [0,10-0,13]
Введение Co	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	135,00±3,80 136 [128-141]	400±8,60 402 [389-414]	42,50±2,08 43,34 [37-46]	0,109±0,006 0,11 [0,11-0,12]	2,66±0,11 2,67 [2,52-2,73]
	$p_{\text{фон}}$	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Введение Co+ витамина D ₃	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	118,50±2,40 119 [116-120]	392±5,90 392 [380-401]	47,42±1,92 46,69 [45-50]	0,10±0,01 0,10 [0,10-0,11]	2,27±0,08 2,27 [2,07-2,40]
	$p_{\text{фон}}$	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	p_{Co}	<0,05	---	---	---	<0,01
	$p_{\text{вит D}}$	---	---	---	<0,005	<0,005

Примечание. $M \pm m$ – среднее арифметическое значение выборки, Me – медиана, Pr- [25–75] проценти выборки, p – уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей.

Параметры системной гемодинамики на фоне гиперкальциемии в условиях сочетанной интоксикации хлоридом кобальта и цинка

Условия опыта	Стат. показат.	САД (мм рт. ст.)	ЧСС (уд. в мин.)	СИ (мл/100г)	УИ (мл/100г)	УПСС (усл. ед.)
Фон	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	103,80±1,01 105 [100-106]	364,00±8,16 358 [348-381]	55,24±2,35 55,17 [52-58]	0,15±0,01 0,15 [0,14-0,16]	1,46±0,05 1,43 [1,32-1,58]
Введение витамина D ₃	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	114,10±2,38 115 [107-120]	390,00±10,40 395 [376-408]	43,82±1,81 47,37 [40-48]	0,12±0,01 0,12 [0,10-0,13]	2,01±0,05 1,94 [1,82-2,26]
Введение Co + Zn	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	123,80±2,27 126 [121-126]	410,00±7,86 413 [401-423]	44,09±2,15 45,90 [40-48]	0,10±0,003 0,11 [0,10-0,11]	2,28±0,11 2,15 [2,11-2,44]
	$p_{\text{фон}}$	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	p_{Co}	<0,01	<0,005	----	----	<0,005
	p_{Zn}	<0,01	<0,001	----	<0,005	<0,01
Введение Co + Zn + витамина D ₃	$M \pm m$, Me, Pr.[25–75]	130,80±2,02 132 [122-126]	405,00±6,35 404 [396-414]	40,63±0,96 40,24 [40-43]	0,10±0,002 0,10 [0,10-0,11]	2,59±0,095 2,61 [2,41-2,70]
	$p_{\text{фон}}$	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	p_{Co}	----	----	----	----	----
	p_{Zn}	----	----	<0,001	<0,05	----
	$p_{\text{вит D}}$	<0,05	----	----	----	----

Примечание. $M \pm m$ – среднеарифметическое значение выборки, Me – медиана, Pr- [25–75] проценти выборки, p – уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей.

конкурентом за места связывания кадмия при его поступлении в организм [12]. Кроме того, известно, что кобальт ведет к активации процесса перекисного окисления липидов, а цинк обладает антиоксидантной активностью [13].

При анализе результатов исследований в группах, где комбинированное введение двух металлов сочеталось с гиперкальциемией было установлено, что измененный кальциевый гомеостаз способствует статистически значимому повышению среднего артериального давления (табл. 3) по сравнению как с группой контроля, так и с группой изолированного введения витамина D₃ и даже с группой крыс, получавших кобальт и цинк сочетанно.

Повышение давления в этих группах сопровождалось нарастанием величины УПСС. Сочетанное введение металлов на фоне гиперкальциемии способствовало уменьшению ударного и сердечного индексов по сравнению с контрольной группой животных и с группой крыс, получавших цинк изолированно.

Анализ результатов показал, что, вероятнее всего, имеет место суммирование эффекта металлов и гиперкальциемии, так как известно, что кальций угнетает синтез оксида азота в эндотелии сосудов под влиянием различных факторов (тяжелые металлы и др. токсиканты), вследствие чего происходит нарушение вазорелаксации мышечной стенки [14].

Выводы

1. Избыточное поступление хлорида кобальта и цинка в организм вызывает артериальную гипертензию гипокинетического типа.
2. Экспериментальная гиперкальциемия оказывает некоторое протекторное влияние на развитие проявлений кобальтовой интоксикации.
3. Сочетание введения кобальта с цинком оказывает менее выраженное влияние на параметры системной гемодинамики.
4. Экспериментальная гиперкальциемия усиливает действие кобальта и цинка при их сочетанном поступлении в организм.

Литература

(п.п. 3; 4; 6; 8–12; 14 см. References)

1. Гайдуков А.Е., Балезина О.П. СамкII участвует в вызванном холином торможении секреции ацетилхолина в моторных синапсах мыши. *Acta Naturae*. 2017; 9, №4 (35): 51–5.
2. Ахполова В.О., Брин В.Б., Цаллаева Р.Т. Влияние экспериментальной гипо- и гиперкальциемии на содержание кальция, свин-

- ца и цинка в бедренных костях крыс с кратковременной свинцовой и цинковой интоксикацией. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2016; 11(3): 370-3.
5. Шейбак В.М., Горещкая М.В., Павлюковец А.Ю. Биологическая роль цинка при алкогольном и вирусном поражениях печени (обзор литературы). *Проблемы здоровья и экологии*. 2013; 2(36): 14-20.
 7. Мирошникова Е.П., Аринжанов А.Е., Глушенко Н.Н., и др. Обмен химических элементов в организме карпа при использовании наночастиц кобальта и железа в корме. *Вестник ОГУ*. 2012; 6(142): 170-5.
 13. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. Современные подходы при анализе окислительного стресса, или как измерить неизмеримое. *Acta Biomedica Scientifica*. 2016; Т. 1, №3-2(109): 174-80.
6. Bresson C., Darolles C., Carmona A., et al. Cobalt chloride speciation, mechanisms of cytotoxicity on human pulmonary cells, and synergistic toxicity with. *Metallomics*. 2013; 5(2): 133-43.
 7. Miroshnikova E.P., Arinzhanov A.E., Glushchenko N.N., et al. Exchange of chemical elements in carp using cobalt and iron nanoparticles in feed. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2012; 6(142): 170-5. (In Russian)
 8. Tuncay E.; Turan B. Intracellular Zn²⁺ increase in cardiomyocytes induces both electrical and mechanical dysfunction in heart via endogenous generation of reactive nitrogen species. *Biol. Trace Element Res.* 169(2): 294–302.
 9. Suresh K. Prediction of metal Ion binding sites in proteins from amino acid sequences by using simplified amino acid alphabets and random forest model. *Genomics & Informatics*. 2017; 15(4): 162–9.
 10. Miao X., Wang Y., Sun J., et al. Zinc protects against diabetes-induced pathogenic changes in the aorta: roles of metallothionein and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. *Cardiovascular diabetology*. 2013; 12(54). doi:10.1186 1475-2840-12-54.
 11. Tunçdemir M., Ertürküner S., Özçelik D. Investigation of lipid peroxidation and antiapoptotic effects of zinc against liver damage in diabetic rats. *Human & Experimental Toxicology*. 2017; 36(8): 813–22.
 12. Moussa S.A., Alaamer A., Abdelhalim M.A. The influence of zinc on the blood serum of cadmium-treated rats through the rheological properties. *Gen. Physiol. Biophys.* 2016; 35(1): 71-5.
 13. Mentshchikova E.B., Zenkov N.K. Modern approaches in the analysis of oxidative stress, or how to measure the immeasurable. *Acta Biomedica Scientifica*. 2016; 1(3-2 (109)): 174-80. (In Russian).
 14. Oyagbemi A.A., Omobowale T.O., Awoyomi O.V. et al. Cobalt chloride toxicity elicited hypertension and cardiac complication via induction of oxidative stress and upregulation of COX-2/Bax signaling pathway. *Human & Experimental Toxicology*. 2019; 38 (5): 519-32.

References

1. Gaydukov A.E., Balezina O.P. CamkII is involved in choline caused by the inhibition of secretion of acetylcholine at motor synapses of the mouse. *Acta Naturae*. 2017; 9(4 (35)): 51–5. (In Russian)
2. Akhpolova V.O., Brin V.B., Tsallaeva R.T. Effect of experimental Hypo- and hypercalcemia on calcium, lead and zinc content in the thighs of rats with short-term lead and zinc intoxication. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2016; 11(3): 370-3. (In Russian)
3. Eichhorn A., Lochner S., Belz G.G. Vitamin D for prevention of diseases? *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2012; 137(17): 906-12.
4. Jiang T.L., Wang C., Zhang T.T., et al. Protective effects of zinc-bearing clinoptilolite on broilers challenged with *Salmonella pullorum*. *Poultry Science*. 2012; 91(8): 1838–45.
5. Sheybak V.M., Goretskaya M.V., Pavlyukovets A.Yu. Biological role of zinc in alcoholic and viral liver lesions. *Problemy zdorovya i ekologii*. 2013; 2(36): 14-20. (In Russian)

Сведения об авторах:

Брин Вадим Борисович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России; зав. отделом физиологии и патологии висцеральных систем ИБМИ ВНЦ РАН, e-mail: vbbrin@yandex.ru;

Кабисов Олег Тасолтанович, канд. мед. наук, науч. сотр., ФГБНУ «Институт биомедицинских исследований» ВНЦ РАН;

Оганесян Давид Хачатурович, мл. науч. сотр., ФГБНУ «Институт биомедицинских исследований» ВНЦ РАН; ассистент каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России, e-mail: datosever@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.017.11.062:577.112.386:57.089.23

Фефелова Е.В., Терешков П.П., Цыбиков Н.Н., Максименя М.В.

Изменение фенотипа лимфоцитов периферической крови здоровых и больных ишемической болезнью сердца при экзогенной гипергомоцистеинемии

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия»,
672000, г. Чита, Россия, ул. Горького 39а

Цель исследования – изучение изменения фенотипа лимфоцитов периферической крови под влиянием гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона в краткосрочной культуре клеток.

Методика. Исследована венозная кровь 15 относительно здоровых, некурящих добровольцев – мужчин в возрасте 30 – 40 лет и 16 больных ишемической болезнью сердца (стабильная стенокардия 2-го функционального класса), сопоставимых по возрасту с донорами. Кровь брали из локтевой вены в пробирки с добавлением антикоагулянта гепарина Li. В 3 стерильные пластиковые пробирки, содержащие по 1 мл крови, добавляли по 1 мл культуральной среды RPMI-1640 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) с 10% содержанием сыворотки, в 2 из них вносили растворы либо гомоцистеина (50 мкмоль/л), либо гомоцистеин-тиолактона (50 нмоль/л). 3-я и 4-я (контрольные) пробирки содержали эквивалентный объем физиологического раствора или культуральной среды. Фенотип лейкоцитов определяли после 4-часовой инкубации в 4,8% CO₂ при 37 °C.

Результаты. Общее количество лейкоцитов, моноцитов и нейтрофилов в исследуемых группах не имело значимых различий. Было зафиксировано лишь увеличение содержания лимфоцитов в образцах периферической крови больных ишемической болезнью сердца за счет увеличения числа всех субпопуляций лимфоцитов. При изучении фенотипа лимфоцитов в культуре под воздействием высоких доз гомоцистеина и гомоцистеин-тиолактона количественные сдвиги наблюдались только в субпопуляции Т-лимфоцитов: в образцах крови условно здоровых добровольцев наблюдалось снижение количества Т-лимфоцитов за счет фракции Т-хелперов. В пробах больных ишемической болезнью сердца под воздействием гипергомоцистеинемии число Т-лимфоцитов не имело значимых различий по сравнению с контролем, но при этом содержание Т-хелперов снижалось на 20%, так же как в образцах крови условно здоровых добровольцев. Уровень цитотоксических лимфоцитов при добавлении гомоцистеина в культуру клеток условно здоровых добровольцев увеличивался на 50%, а при добавлении гомоцистеин-тиолактона – практически в 2 раза, в то же время у больных ишемической болезнью сердца эта фракция лимфоцитов увеличивалась на 70% как под воздействием гомоцистеина, так и гомоцистеин-тиолактона.

Заключение. Высокие дозы гомоцистеина снижают количество Т-хелперов и увеличивают число цитотоксических лимфоцитов. Изменения более выражены в образцах крови лиц, страдающих атеросклерозом. Механизмы развития данного феномена требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: гомоцистеин; гомоцистеин-тиолактон; фенотип лимфоцитов

Для цитирования: Фефелова Е.В., Терешков П.П., Цыбиков Н.Н., Максименя М.В. Изменение фенотипа лимфоцитов периферической крови здоровых и больных ишемической болезнью сердца при экзогенной гипергомоцистеинемии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 87-92.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.87-92

Для корреспонденции: Фефелова Елена Викторовна, e-mail: fefelova.elena@mail.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Фефелова Е.В., Терешков П.П., Цыбиков Н.Н., Максименя М.В.; сбор и обработка материала – Фефелова Е.В., Терешков П.П., Максименя М.В.; статистическая обработка материала – Фефелова Е.В.; написание текста статьи – Фефелова Е.В., Терешков П.П., Максименя М.В.; редактирование – Цыбиков Н.Н.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.03.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликовано 21.08.2020

Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Tsybikov N.N., Maximenya M.V.

Changes in the phenotype of peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and patients with ischemic heart disease in exogenous hyperhomocysteinemia

Chita State Medical Academy, Gorkogo Str. 39a, Chita 672000, Russia

Aim. To study changes in the phenotype of peripheral blood lymphocyte induced by homocysteine and homocysteine thiolactone in a short-term cell culture.

Methods. Venous blood was obtained from 15 conventionally healthy, non-smoking male volunteers aged 35.4 ± 4.7 years and 16 patients with ischemic heart disease (functional class II stable angina). Blood was collected from the ulnar vein into tubes containing heparin Li as an anticoagulant. Then 1 ml of RPMI-1640 culture medium (Miltenyi Biotec GmbH, Germany) with 10% of serum was added to each of 3 sterile plastic tubes containing 1 ml of blood each. A solution of either homocysteine (50 $\mu\text{mol/l}$) or homocysteine-thiolactone (50 nmol/l) was added to two of these tubes. The remaining two tubes (control) contained an equivalent volume of saline or the culture medium. The leukocyte phenotype was determined after 4 hours of incubation at 37°C in 4.8% CO_2 .

Results. Total counts of leukocytes, monocytes and neutrophils did not significantly differ between the study groups. Only an increase in lymphocyte count was observed in blood samples from IHD patients due to increases in all lymphocyte subpopulations. Quantitative changes in the phenotype of lymphocytes exposed to high doses of homocysteine and homocysteine thiolactone were found only for the T-lymphocyte subpopulation; in blood samples from conventionally healthy volunteers, the T-lymphocyte count was decreased due to a decrease in the T-helper fraction. In blood samples from IHD patients exposed to hyperhomocysteinemia, the number of T-lymphocytes did not differ from the control. However, the T-helper level was decreased by 20% similar to that in blood samples of healthy volunteers. The level of cytotoxic lymphocytes in the cell culture from conditionally healthy volunteers exposed to homocysteine was increased by 50% and in the culture exposed to homocysteine thiolactone, it practically doubled. In the blood from IHD patients exposed to homocysteine or homocysteine thiolactone, this lymphocyte fraction was increased by 70%.

Conclusion. High doses of homocysteine reduced the number of T-helpers and increased the number of cytotoxic lymphocytes. These changes were more pronounced in blood samples from patients with atherosclerosis. Mechanisms of this phenomenon require a further study.

Keywords: homocysteine; homocysteine-thiolactone; lymphocyte phenotype.

For citation: Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Tsybikov N.N., Maximenya M.V. Changes in the phenotype of peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and patients with ischemic heart disease in exogenous hyperhomocysteinemia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 87-92. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.87-92

For correspondence: Elena Fefelova, Department of Pathological physiology, Chita state medical academy of Russia, 672000, Russia, Chita, ul. Gorky 39a e-mail: fefelova.elena@mail.ru

Contribution: research concept and design – E.V. Fefelova, P.P. Tereshkov, N.N. Tsybikov, M.V. Maximenya; material collecting and processing – E.V. Fefelova, P.P. Tereshkov, M.V. Maximenya; statistical processing of results – E.V. Fefelova; writing text – E.V. Fefelova, P.P. Tereshkov, M.V. Maximenya; text editing – N.N. Tsybikov. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgments. The study did not have sponsorship.

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

Information about authors:

Fefelova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-0724-0352>

Tereshkov P.P., <http://orcid.org/0000-0002-8601-3499>

Tsybikov N.N., <http://orcid.org/0000-0002-0975-2351>

Maximenya M.V., <http://orcid.org/0000-0001-6308-3411>

Received 05.03.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Иммунокомпетентные клетки отвечают на протекающие в организме процессы, такие как воспаление, колебания гормонального фона, стресс и др., путем изменения степени экспрессии, появления или исчезновения как поверхностных, так и внутриклеточных функциональных молекул. Это позволяет клеткам иммунной системы адаптироваться к сложившимся ус-

ловиям и выполнять присущие ей регуляторные или эффекторные функции наиболее рационально [1].

Известно, что повышенный уровень гомоцистеина является триггером разнообразной патологии [2–5]. Гомоцистеин (ГЦ) — это аминокислота, образующаяся в ходе взаимопревращений метионина и цистеина. Он обнаруживается в крови преимущественно в комплексе с ци-

стеином белков, а также в виде продуктов его спонтанного окисления. Содержание общего ГЦ в крови человека в норме не превышает 10 мкмоль/л [2]. Повышение концентрации гомоцистеина приводит к развитию эндотелиальной дисфункции, активации пролиферации гладкомышечных клеток сосудов, модификации липопротеинов плазмы, ремоделированию экстрацеллюлярного матрикса, стимуляции вазоконстрикции, воспаления и гиперкоагуляции [3,4]. В предыдущих исследованиях было показано, что экспериментальная умеренная экзогенная гипергомоцистеинемия сопровождается увеличением количества лимфоцитов в основном за счет Т-цитотоксических клеток, снижением иммунорегуляторного индекса в 2 раза ($p=0,012$), а также повышением концентрации TNF α , INF γ и IL 17 α как в сыворотке крови, так и в цитоплазме мононуклеарных клеток. При этом концентрация самого гомоцистеина в мононуклеарах не изменяется [5].

Цель исследования – изучение изменения фенотипа лимфоцитов периферической крови под влиянием гомоцистеина и гомоцистеина-тиолактона в краткосрочной культуре клеток.

Методика

Материалом для исследования являлась венозная кровь, полученная у 15 относительно здоровых, некурящих добровольцев – мужчин в возраст 30–40 лет, и 16 больных ишемической болезнью сердца (стабильная стенокардия 2-го функционального класса). Кровь забирали из локтевой вены в пробирки с добавлением антикоагулянта гепарина Li. Затем по 1 мл крови помещали в стерильные пластиковые пробирки, добавляли в каждую из них по 1 мл культуральной среды (полная культуральная среда RPMI-1640 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) с 10% содержанием сыворотки. В 2 пробирки вносили растворы либо гомоцистеина (50 мкмоль/л), либо гомоцистеин-тиолактона (50 нмоль/л), в 3-ю (контрольную) добавляли эквивалентный объем физиологического раствора, в 4-ю (контрольную) пробирку добавляли эквивалентный объем культуральной среды. После 4 ч инкубации при 37 °C в 4,8% CO₂ определяли фенотип лейкоцитов. В дальнейшем не было найдено отличий в показателях 3-й и 4-й пробирок, что позволило объединить результаты контрольных проб.

Проточная цитофлюориметрия. Клетки крови обрабатывали «пятицветной» комбинацией моноклональных антител к CD4/CD19, конъюгированных с флуоресцентным красителем FITC (изогиоцианат флуоресцеина), CD162-PE (фикоэритрин), CD8/CD14-ECD (комплекс PE с тexasским красным), CD62L-PC5 (комплекс PE с цианином-5) и к CD3-PC7 (комплекс PE с цианином-7).

Клетки фиксировали 1% раствором формальдегида в фосфатном буфере pH 7,4 (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлюориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США).

Для корректного исключения из зоны анализа всех частиц, которые не соответствовали по размерам и гранулярности живым лимфоцитам и моноцитам, вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения частиц по малоугловому и боковому светорассеянию, CD3 и CD14. В каждой пробе анализировали не менее 10⁴ клеток.

Математическую обработку цитометрических данных проводили при помощи программ CXP v. 2.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft). Описательная статистика представлена медианой и межквартильным интервалом (25-го; 75-го перцентиль); сравнение зависимых выборок проводили с помощью критерия Вилкоксона; сравнение независимых выборок – *U*-критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали при $p < 0,05$.

Результаты

Общее количество лейкоцитов, моноцитов и нейтрофилов в исследуемых группах не имело значимых различий. Было зафиксировано лишь увеличение содержания лимфоцитов в образцах периферической крови больных ишемической болезнью сердца (ИБС), за счет увеличения числа всех субпопуляций лимфоцитов. Максимальный сдвиг зарегистрирован со стороны Т-НК (**табл. 1**).

При изучении фенотипа клеток периферической крови в культуре под воздействием высоких доз гомоцистеина и гомоцистеин-тиолактона количественные сдвиги наблюдались только в субпопуляции Т-лимфоцитов. Так, в образцах крови условно здоровых добровольцев под воздействием гипергомоцистеинемии наблюдалось снижение количества Т-лимфоцитов за счет фракции Т-хелперов. В пробах больных ИБС под воздействием гипергомоцистеинемии число Т-лимфоцитов не имело значимых различий по сравнению с контролем, но при этом содержание Т-хелперов снижалось так же, как в образцах крови условно здоровых добровольцев на 20% ($p=0,002$). Уровень цитотоксических лимфоцитов при добавлении гомоцистеина в культуру клеток условно здоровых добровольцев увеличивался на 50% ($p=0,002$), а при добавлении гомоцистеина-тиолактона – практически в 2 раза ($p=0,002$), в то время как у больных ИБС эта фракция лимфоцитов увеличивалась на 70% под воздей-

ствием как ГЦ, так и гомоцистеин-тиолактона ($p=0,04$ и $0,008$ соответственно). Уровень Т-НК возростал под влиянием изучаемых аминотиолов только в образцах крови условно здоровых добровольцев (табл. 2).

Обсуждение

В настоящее время атеросклеротический процесс все чаще рассматривают как воспалительный и репаративный ответ на повреждение интимы артериальных сосудов, в котором принимают участие клетки иммунной системы, тромбоциты, фибробласты [6, 7]. Роль Т-лимфоцитов в атерогенезе заключается в антигенном распознавании и инициации клеточно-опосредованного воспалительного ответа [7]. Показано, что у пациентов с различными формами атеросклероза наблюдается увеличение количества лимфоцитов, несущих маркеры активации, не только в зоне повреждения, но и в периферической крови [6]. А.С. Гольдерова и соавт. (2011 г.) убедительно продемонстрировали наличие существенных фенотипических различий лимфоцитов периферической крови у больных ИБС в зависимости от локализации и распространенности атеросклеротического процесса [8].

Полученные данные формируют закономерный вопрос: каким образом при неизменном количестве клеток в культуре возможны выявленные изменения?

Возможны следующие варианты ответов.

Во-первых, наличием дважды положительных Т-клеток (CD4+CD8+) – ДП Т-клетки, обнаруженных еще в конце прошлого столетия в периферической крови человека. В среднем от общей популяции Т-лимфоцитов их число составляет от 1 до 3% [9]. В то

же время в отдельных случаях у здоровых людей в периферической крови может содержаться значительная доля ДП Т-клеток [10]. Показано, что большинство из них имеет фенотип клеток памяти и способно продуцировать более высокие уровни цитокинов, чем клетки, экспрессирующие по отдельности маркеры CD4+ и CD8+ [11, 12].

Во-вторых, возможна модификация рецепторного аппарата клеток ГЦ и гомоцистеин-тиолактоном. Так, в предыдущих исследованиях было показано, что высокие концентрации ГЦ вызывают модификацию белковых структур организма [13]. Модификация возможна как за счет разрыва дисульфидных связей ГЦ [14], так и путем образования N-гомоцистеинилированных белков при взаимодействии с ними гомоцистеин-тиолактона. Тиолактон ГЦ является ацилирующим агентом и при нормальных условиях предпочтительнее реагирует с ϵ -аминогруппой бокового радикала лизина [14]. Кроме этого, доказано, что гипергомоцистеинемия активизирует процессы перекисного окисления липидов и образовавшиеся в большом количестве свободные радикалы также могут изменять химическую структуру белковых молекул.

CD4-рецептор представляет собой одноцепочечную молекулу, состоящую из четырех иммуноглобулиноподобных доменов. Домены D1 и D2, а также D3 и D4 образуют между собой парные, плотно упакованные жесткие структуры. Эти пары соединены гибким шарнирным участком, в составе которого присутствует аминокислота лизин [15]. CD8 структурно отличается от маркера Т-хелперов. Он представляет собой ге-

Таблица 1

Общее содержание лейкоцитов и их подвидов в исследуемых краткосрочных культурах (Me [25%; 75%])

Показатель	Образцы крови условно здоровых добровольцев			Образцы крови больных ИБС		
	контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ-Т	контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ-Т
Лейкоциты, абс.	1742,5 [1450,0; 2035,0]	1996,5 [1306,0; 2687,0]	2007,0 [1222,0; 2792,0]	2296,0 [2200,0; 2392,0]	2250,5 [2088,0; 2413,0]	2313,0 [2164,0; 2462,0]
Лимфоциты, абс.	473,5 [467,0; 480,0]	477,0 [432,0; 522,0]	486,0 [451,0; 521,0]	963,5 [894,0; 1033,0] $p_4=0,001$	984,0 [910,0; 1058,0] $p_4=0,001$	972,0 [863,0; 1081,0] $p_4=0,001$
Моноциты, абс.	15,5 [14,0; 17,0]	21,5 [15,0; 28,0] $p_1=0,01$	21,5 [12,0; 31,0] $p_1=0,01$	19,0 [11,0; 27,0]	23,0 [21,0; 25,0]	23,5 [23,0; 24,0]
Нейтрофилы, абс.	1151,5 [835,0; 1468,0]	1379,5 [777,0; 1982,0]	1374,5 [657,0; 2092,0]	1135,5 [1066,0; 1205,0]	1078,0 [958,0; 1198,0]	1159,0 [1108,0; 1210,0]

Примечание. p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеин-тиолактона, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами и больными ИБС.

Таблица 2

Субпопуляции лимфоцитов в исследуемых краткосрочных культурах (Ме [25%; 75%])

Показатель	Образцы крови условно здоровых добровольцев			Образцы крови больных ИБС		
	контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т	контроль	с добавлением НСУ	с добавлением НСУ -Т
Т-лимфоциты (CD3+), абс. в 1 мкл крови	366,5 [357,0; 375,0]	292,5 [217,0; 367,0] $p_1=0,001$	426,0 [422,0; 431,0] $p_2=0,005$	827,5 [614,0; 1041,0] $p_3=0,0001$	776,5 [594,0; 959,0] $p_3=0,0001$	784,0 [627,0; 941,0] $p_3=0,0001$
Т-хелперы (CD3+, CD4+), абс. в 1 мкл крови	210,0 [185,0; 229,0]	164,0 [123,0; 227,0] $p_1=0,002$	230,0 [211,0; 246,0] $p_1=0,002$ $p_2=0,008$	563,0 [465,0; 606,0] $p_3=0,001$	430,0 [346,0; 509,0] $p_1=0,002$ $p_3=0,001$	443,0 [372,0; 512,0] $p_1=0,002$ $p_2=0,008$ $p_3=0,001$
Т-цитотоксические (CD3+, CD8+), абс. в 1 мкл крови	79,0 [67,0; 91,0]	118,0 [106,0; 126,0] $p_1=0,002$	148,0 [138,0; 169,0] $p_1=0,002$ $p_2=0,008$	250,0 [214,0; 332,0] $p_3=0,001$	428,0 [320,0; 450,0] $p_2=0,04$ $p_3=0,001$	403,5 [309,0; 450,0] $p_2=0,008$ $p_3=0,001$
Т-хелперы/Т-цитотоксические	2,76 [2,31; 2,89]	1,38 [1,16; 1,8] $p_1=0,002$	1,66 [1,25; 1,68] $p_1=0,002$	2,17 [1,83; 2,25] $p_3=0,048$	1,08 [0,96; 1,19] $p_1=0,002$ $p_3=0,048$	1,21 [0,98; 1,27] $p_1=0,002$ $p_3=0,048$
В-лимфоциты, (CD3-, CD45RA+), абс. в 1 мкл крови	68,5 [47,0; 89,0]	67,5 [48,0; 87,0]	79,0 [51,0; 107,0]	110,5 [100,0; 120,0] $p_3=0,001$	104,0 [96,0; 112,0] $p_3=0,001$	102,5 [79,0; 126,0] $p_3=0,001$
НК, (CD3-, CD56+, CD16+), абс. в 1 мкл крови	7,5 [4,0; 11,0]	7,5 [7,0; 8,0]	8,5 [5,0; 12,0]	13,0 [4,0; 22,0] $p_3=0,01$	24,5 [8,0; 41,0] $p_3=0,01$	24,5 [11,0; 38,0] $p_3=0,01$
Т- NK, (CD3+ , CD56+, CD16+), абс. в 1 мкл крови	1,5 [1,0; 2,0]	2,5 [2,0; 3,0] $p_1=0,05$	2,5 [1,0; 4,0] $p_1=0,03$ $p_2=0,04$	34,0 [4,0; 64,0] $p_3=0,001$	37,5 [3,0; 72,0] $p_3=0,001$	25,5 [0,0; 51,0] $p_3=0,001$

Примечание. p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, p_2 – уровень статистической значимости различий образцов с добавлением гомоцистеина по сравнению с образцами с добавлением гомоцистеин-тиолактона, p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с условно здоровыми добровольцами и больными ИБС.

теродимер, каждая цепь которого включает один иммуноглобулиноподобный домен [15]. Исходя из выше сказанного, можно предположить, что в первую очередь происходит модификация протеинов CD4-рецептора.

В-третьих, стимуляция протеолитического шеддинга, являющегося в свою очередь следствием активации моноцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов на фоне атеросклеротического процесса у больных ИБС [16]. Протеолитическое отщепление внеклеточной части мембранных белков с поверхности клеток, или кливдж (расщепление) – процесс достаточно распространенный, в его реализации участвуют различные типы ферментов, как внеклеточные (цинкзависимые, сериновые и аспартилзависимые протеиназы), так и внутриклеточные протеолитические ферменты клеток, что приводит к образованию растворимых форм рецепторов и как следствие – уменьшению количества поверхностных структур.

Заключение

Общее содержание лейкоцитов, моноцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в культуре клеток периферической крови под влиянием высоких концентраций гомоцистеина и гомоцистеин-тиолактона не изменилось, но при этом под влиянием высокой дозы гомоцистеина наблюдалось снижение количества фракции Т-хелперов и увеличение числа цитотоксических лимфоцитов, более выраженное в образцах крови лиц, страдающих атеросклеротическим процессом. Механизмов развития данного феномена возможно несколько, что требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Кузник Б.И., Цыбиков Н.Н., Витковский Ю.А. Единая гуморальная система защиты организма. *Забайкальский медицинский вестник*. 2004; 4: 13-9.
2. Цыбиков Н.Н., Цыбикова Н.М. Роль гомоцистеина в патологии человека. *Успехи современной биологии*. 2007; 127(5): 471-82.

3. Мирошниченко И.И., Птицына С.Н., Кузнецова Н.Н., Калмыков Ю.М. Гомоцистеин — предиктор патологических изменений в организме человека *Российский медицинский журнал*. 2009; 17(4): 224-7.
4. Авдонин П.В., Кириенко А.П., Кожевникова Л.М., Шостак И.А., Бабалаева Н.М., Леонтьев С.Г. и др. Корреляция наличия мутации С677Т в гене метилентетрагидрофолатредуктазы и повышенный риск тромбоэмболии легочных артерий у больных из центрального региона России с венозными тромбозами. *Терапевтический архив*. 2006; 78(6): 70-6.
5. Boldyrev A. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. *Biochemistry* (Moscow). 2009; 74: 725-36.
6. Фефелова Е.В., Терешков П.П., Дутов А.А., Цыбиков Н.Н. Субпопуляции лимфоцитов и уровень цитокинов при экспериментальной гипергомоцистеинемии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015, 159(3): 336-8.
7. Пигаревский П.В. Морфометрическое исследование клеток иммунорегуляторного и эффекторного звеньев иммунитета в аорте и парааортальных лимфатических узлов при атерогенезе у человека. *Цитокины и воспаление*. 2002, (4): 21-6.
8. Czyz A., Kołacz E., Angerer D. et al. Expression of activation antigens on lymphocyte surface and circulating platelet-leukocyte aggregates in ischaemic heart disease. *Kardiol. Pol.* 2005; 62: 189-200.
9. Гольдерова А.С., Николаева И.Н., Романова А.Н., Козлов В.А. Фенотипическая характеристика лимфоцитов периферической крови при коронарном и мультифокальном атеросклерозе. *Бюллетень СО РАМН*. 2011, 31(3): 27-32.
10. Blue M.L., Daley J.F., Levine H., Schlossman S.F. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J. Immunol.* 1985; 134: 2281-6.
11. Хайдуков С.В. Малые субпопуляции Т-хелперов (Th наивные тимические, Th наивные центральные, TH9, TH22 и CD4+CD8+ дважды положительные т-клетки). *Медицинская иммунология*. 2013; 15(6): 503-12.
12. Pahar B., Lackner A.A., Veazey R.S. Intestinal double-positive CD4+CD8+ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines. *Eur. J. Immunol.* 2006, 36: 583-92.
13. Фефелова Е.В., Измest'ев С.В., Цыбиков Н.Н., Терешков П.П. Ответ иммунной системы на модификацию аминокислотами белковых структур организма [Электронный ресурс]. *Забайкальский медицинский вестник*. 2017; 2: 101-11.
14. Jakubowski H. Homocysteine-thiolactone and S-nitroso-homocysteine mediate incorporation of homocysteine into protein in humans. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41: 1462-6.
15. Janeway C.A. Jr. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 1992; 10: 645-74.
16. Samodova A.V., Dobrodeeva L.K. The role of shedding in the activity of immunocompetent cells with the reagin protective mechanism. *Human Physiology*. 2012; 38(4): 438-43.
2. Tsybikov N.N., Tsybikova N.M. The role of homocysteine in human pathology. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2007; 127(5): 471-82. (in Russian)
3. Miroshnichenko I.I., Ptitsyna S.N., Kuznetsova N.N., Yu.M. Kalmykov Homocysteine — a predictor of pathological changes in the human body. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; 17(4): 224-7. (in Russian)
4. Avdonin P.V., Kirienko A.I., Kozhevnikova L.M., Shostak N.A., Babadaeva N.M., Leontyev S.G. et al. C677T mutation in methyl-tetrahydrofolatereductase gene in patients with venous thromboses from the central region of Russia correlates with a high risk of pulmonary artery thromboembolism. *Therapevticheskiy arkhiv*. 2006; 78 (6): 70-6. (in Russian)
5. Boldyrev A. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. *Biochemistry* (Moscow). 2009; 74: 725-736.
6. Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Dutov A.A., Tsybikov N.N. Lymphocytes subpopulations and cytokine levels in experimental hyperhomocysteinemia *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2015; 159(3): 336-8. (in Russian)
7. Pigarevsky P.V. Morphometric research of cells of immunoregulatory and effector components of immune system in aorta and paraaortic lymph nodes at human atherogenesis. *Tsitokiny i vospalenie*. 2002; (4): 21-6. (in Russian)
8. Czyz A., Kołacz E., Angerer D. et al. Expression of activation antigens on lymphocyte surface and circulating platelet-leukocyte aggregates in ischaemic heart disease. *Kardiol. Pol.* 2005; 62: 189-200.
9. Gol'derova A.S., Nikolaeva I.N., Romanova A.N., Kozlov V.A. The phenotypic characteristic of peripheral blood lymphocytes at the coronary and multifocal atherosclerosis. *Bulleten SO RAMS*. 2011; 31(3): 27-32. (in Russian)
10. Blue M.L., Daley J.F., Levine H., Schlossman S.F. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J. Immunol.* 1985; 134: 2281-6.
11. Khaidukov S.V. Minor subsets of t-helper cells (Th thymic naive, Th central naive, Th9, Th22 and CD4+CD8+ double positive T-cells). *Meditsinskaya immunologiya*. 2013; 15(6): 503-12. (in Russian)
12. Pahar B., Lackner A.A., Veazey R.S. Intestinal double-positive CD4+CD8+ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36: 583-92.
13. Fefelova E.V., Izmest'ev S.V., Tsybikov N.N., Tereshkov P.P. Response of the immune system to aminothioli modification by the body's protein structures [Electronic resource]. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2017; 2: 101-11. (in Russian)
14. Jakubowski H. Homocysteine-thiolactone and S-nitroso-homocysteine mediate incorporation of homocysteine into protein in humans. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41: 1462-6.
15. Janeway C.A. Jr. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 1992; 10: 645-74.
16. Samodova A.V., Dobrodeeva L.K. The role of shedding in the activity of immunocompetent cells with the reagin protective mechanism. *Human Physiology*. 2012; 38(4): 438-43.

References

1. Kuznik B.I., Tsybikov N.N., Vitkovskiy Yu.A. A single humoral system for protecting the body. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2004; 4: 13-9. (in Russian)

Сведения об авторах:

Фефелова Елена Викторовна, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: fefelova.elena@mail.ru;

Терешков Павел Петрович, канд. мед. наук, зав. лаб. экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: trp6915@mail.ru;

Цыбиков Намжил Нанзатович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЧГМА; e-mail: thybikov@mail.ru;

Максименя Мария Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: mmmv4510@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 57.084.1.615.015

Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Воронина Т.А.

Влияние гимантана в наружной лекарственной форме на вызванную полным адьювантом Фрейнда неспецифическую воспалительную реакцию у крыс при разных схемах применения

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

Цель исследования – оценка способности гимантана (N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорида) в наружной гелевой лекарственной форме ослаблять у крыс неспецифическую воспалительную реакцию, вызванную полным адьювантом Фрейнда (ПАФ).

Методика. Воспалительный процесс моделировали субплантарным введением ПАФ в левую заднюю лапу аутобредных крыс. Оценивали степень отёчности лапы животных по изменению диаметра стопы и голеностопного сустава до и после введения ПАФ. Гимантан в виде 5% гелевой лекарственной формы и препарат сравнения диклофенак в виде 1% гелевой лекарственной формы наносили ежедневно на повреждённую конечность крыс в течение 14 сут. Эксперимент проводили в 2 этапа. На 1-м этапе исследования препараты начинали наносить за 1 сут до индукции воспаления; на 2-м этапе препарат наносили ежедневно спустя 2 нед после индукции воспаления. Во время 1-го этапа работы на 4-е сут после введения ПАФ у животных регистрировали «Orto-Varimex» (Columbus Instruments, США).

Результаты. Установлено, что на 1-м этапе (на 3-и и 7-е сут после индукции воспаления) гель гимантана значительно снижает отёчность стопы и голеностопного сустава поврежденной лапы животных, по эффективности не уступая гелю диклофенака; на 14-е сут после введения ПАФ значимого влияния на выраженность отёка поврежденной конечности не зафиксировано. На 4-е сут после введения ПАФ у животных с моделью воспаления наблюдается снижение на 34,03% числа горизонтальных перемещений в актометре «Orto-Varimex»; 5% гель гимантана и 1% гель диклофенака улучшают координацию движений крыс соответственно на 52,35% и 45,72%. На 2-м этапе исследования установлено, что 5% гель гимантана уменьшает отёчность стопы животных с экспериментальным воспалением через 7 и 14 сут применения препарата, 1% гель диклофенака значимого влияния не оказывает.

Заключение. Курсовое ежедневное применение гимантана в наружной гелевой лекарственной форме снижает выраженность отёчного синдрома у аутобредных крыс с неспецифической воспалительной реакцией, вызванной субплантарным введением в левую заднюю лапу животных флогогенного агента. Эффективность лечения гимантаном, начатого как за 1 сут до введения ПАФ, так и через 2 нед после индукции воспаления, не уступает диклофенаку, применяемому в наружной лекарственной форме.

Ключевые слова: полный адьювант Фрейнда; воспаление; гимантан; диклофенак; крысы.

Для цитирования: Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Воронина Т.А. Влияние гимантана в наружной лекарственной форме на вызванную полным адьювантом Фрейнда неспецифическую воспалительную реакцию у крыс при разных схемах применения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020;64(3): 93-101.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.93-101

Для корреспонденции: Иванова Елена Анатольевна, e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Иванова Е.А., Воронина Т.А.; сбор и обработка материала – Иванова Е.А., Матюшкин А.И.; статистическая обработка – Матюшкин А.И.; написания текста – Иванова Е.А.; редактирование – Воронина Т.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование: Работа выполнена в рамках Гос. задания по теме № 0521-2019-0007.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.11.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Ivanova E.A., Matyushkin A.I., Voronina T.A.

Effect of different dosage regimens of a topical formulation of Hemantane on complete Freund's adjuvant-induced nonspecific inflammation in ratsLaboratory of Psychopharmacology, V.V. Zakusov Institute of Pharmacology,
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

The aim of the study was to evaluate the ability of different once-daily treatment regimens with N-(2-adamantyl) hexamethylenimine hydrochloride (hemantane) topical gel vs. diclofenac topical gel to reduce nonspecific inflammation in rats induced with complete Freund's adjuvant. **Methods.** Inflammation was induced by a subplantar injection of complete Freund's adjuvant into the left hind paw of outbred rats. Edema of the left hind paw was measured. 5% hemantane gel (provided by the Laboratory of Finished Dosage Forms, V.V. Zakusov Institute of Pharmacology) and 1% diclofenac gel (produced by Hemofarm) were applied daily to the affected rat limb for 14 days. The experiment was performed in two stages. At the first stage, the drugs in the form of topical gels were applied to the left hind paw daily starting one day before the induction of inflammation. At the second stage, the topical gel formulations were applied daily starting two weeks after the induction of inflammation. At the first stage of the investigation, on day 4 after the injection of complete Freund's adjuvant, coordination disorder of rats induced by the experimental pathology was evaluated using an Opto-Varimex actometer (Columbus Instruments, USA). **Results.** At the first stage of the study, hemantane gel significantly reduced edema of the foot and ankle joint of the left hind paw on days 3 and 7 after the induction of inflammation and was non-inferior to diclofenac gel. On day 14 after the injection of complete Freund's adjuvant into the rat hind paw, the drugs had no significant effect on edema of the paw. On day 4 after the injection, the number of horizontal movements decreased by 34.03% as indicated by the Opto-Varimex actometer; 5% hemantane gel and 1% diclofenac gel improved coordination in rats by 52.35% and 45.72%, respectively. At the second stage of the study, 5% hemantane gel reduced foot edema in the model of inflammation after 7 and 14 days of treatment, whereas 1% diclofenac gel exerted no significant effect. **Conclusion.** Hemantane as a topical formulation reduces edema in outbred rats with nonspecific inflammation induced by the subplantar injection of complete Freund's adjuvant into the left hind paw when applied daily, starting either one day before the induction of inflammation or two weeks after the complete Freund's adjuvant administration, and its efficacy was not inferior to diclofenac as a topical formulation.

Key words: complete Freund's adjuvant; inflammation; hemantane; diclofenac; rats.

For citation: Ivanova E.A., Matyushkin A.I., Voronina T.A. Effect of different dosage regimens of a topical formulation of Hemantane on complete Freund's adjuvant-induced nonspecific inflammation in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 93-101. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.93-101

For correspondence: *Elena A. Ivanova*, Senior Researcher, Laboratory of Psychopharmacology, FSBSI "Zakusov Institute of Pharmacology", Baltiyskaya Str. 8, 125215, Moscow, Russia, e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Contribution: research concept and design – Ivanova E.A., Voronina T.A.; material collecting and processing – Ivanova E.A., Matyushkin A.I.; statistical processing of results – Matyushkin A.I.; writing text – Ivanova E.A.; text editing – Voronina T.A. Approval of the final version of the article – all co-authors

Acknowledgments. The work was performed according to The State order № 0521-2019-0007.

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

Information about the authors:Ivanova E.A., <http://orcid.org/0000-0003-4961-2051>Matyushkin A.I., <https://orcid.org/0000-0001-7640-0551>Voronina T.A., <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

Received 25.11.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) широко используются для терапии боли и воспаления, однако их применение ограничено побочными эффектами в первую очередь в отношении желудочно-кишечного тракта и сердечно-сосудистой системы. НПВП в лекарственных формах для наружного применения эффективны для лечения острой и хронической боли у людей с болезнями костно-мышечной системы и практически не вызывают класс-

специфических осложнений, что обеспечивает возможность их назначения пациентам с серьезной коморбидной патологией [1-4].

В качестве действующих веществ для создания новых противовоспалительных и противоболевых препаратов в наружных лекарственных формах могут рассматриваться обладающие высокой липофильностью соединения, содержащие в своей структуре адамантовый фрагмент [5]. В частности, одно из произво-

дных адамантана — N-(2-адамантил)-гексаметиленим инагидрохлорид(гимантан) в опытах на животных оказывает противоболевое и противовоспалительное действие как при внутривенном и пероральном введении, так и при наружном нанесении в виде 5% геля [6-8]. Ранее нами было установлено, что гимантан в 5% гелевой лекарственной форме (серия 130317) снижает выраженность отёчности у крыс с воспалительным процессом, вызванным полным адьювантом Фрейнда (ПАФ). При ежедневном нанесении на повреждённую заднюю лапу, начиная за 1 сут до индукции воспаления, гимантан не уступает препарату сравнения 1% гелю диклофенака [9].

Цель исследования — оценка способности 5% геля гимантана серии 190219 снижать неспецифическую воспалительную реакцию у крыс, вызванную полным адьювантом Фрейнда (ПАФ), при разных схемах ежедневного наружного применения.

Методика

В работе использованы половозрелые аутбредные белые крысы-самцы массой 230–280 г в начале эксперимента. Животных получали из питомника лабораторных животных «Столбовая» (Московская область). Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Содержание животных осуществлялось в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51. Опыты проводили в соответствии с международными правилами (Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» (протокол №1 от 18 февраля 2019 г.).

Воспалительный процесс моделировали субплантарным введением крысам в левую заднюю стопу 0,1 мл ПАФ (взвесь БЦЖ в вазелиновом масле, Sigma-Aldrich, США) [10]. Экспериментальная работа выполнена в 2 этапа. На 1-м этапе исследования оценивали влияние 5% геля гимантана серии 190219 (предоставлен лабораторией готовых лекарственных форм ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова») в

сравнении с 1% гелем диклофенака (производства фирмы Немофарм, Сербия) на неспецифическую воспалительную реакцию у крыс, вызванную ПАФ, при ежедневном нанесении гелей гимантана и диклофенака на повреждённую лапу животных начиная за 1 сут до инъекции ПАФ. На 2-м этапе работы изучали влияние наружных лекарственных форм на отёчность повреждённых задних лап крыс с 2-недельным воспалительным процессом. Препараты в виде гелей применяли ежедневно в течение 14 сут начиная лечение через 2 нед после инъекции ПАФ. В проводимом исследовании в качестве препарата сравнения был выбран 1% гель диклофенака, так как ранее было установлено, что противовоспалительный эффект изучаемого 5% геля гимантана в острых опытах на крысах (в методиках каррагенанового и формалинового отёков) был сопоставим с эффектом 1% геля диклофенака производства фирмы Немофарм [11].

Животные были распределены на группы: 1-я группа «Пассивный контроль» — крысы без экспериментальной патологии; 2-я — «Адьювантный артрит» (АА) — крысы, в левую заднюю конечность которых вводили ПАФ; 3-я — крысы с АА, которым наружно наносили 5% гель гимантана; 4-я — крысы с АА, которым наружно наносили 1% гель диклофенака. О выраженности воспаления судили по увеличению диаметра стоп и диаметра голеностопных суставов левой задней конечности животных по сравнению с фоновыми значениями (до введения ПАФ). Диаметр стопы и голеностопного сустава измеряли с помощью инженерного штангенциркуля (в мм).

На первом этапе исследования регистрацию отёчности повреждённой конечности проводили на 3-й, 7-й и 14-й сут после введения воспалительного агента. Кроме того, оценивали степень нарушения функции суставов крыс, регистрируя двигательную активность животных на 4-й сут после введения ПАФ в актометре «Opto-Varimex» (Columbus Instruments, США). Актометр представлял собой квадратную арену со стороной 39 см и высотой 20 см, с располагающимися по периметру фиксирующими передвижения животных фотоэлементами. Двигательную активность оценивали в условных единицах по показателю «горизонтальная активность», который фиксировали у каждого животного в течение 2 мин. Массу тела (в г) крыс регистрировали за 1 сут и через 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13 сут после введения ПАФ.

На втором этапе исследования отёчность повреждённой конечности оценивали на 14-й, 21-й и 28-й сут после введения ПАФ. В те же сроки после введения ПАФ регистрировали массу тела крыс (в г).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 10.0. Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена. В случае нормального распределения в экспериментальных группах и соблюдения межгруппового равенства дисперсий дальнейшую обработку проводили с помощью метода параметрической статистики критерия Даннета. При отсутствии нормального распределения в экспериментальных группах либо при несоблюдении межгруппового равенства дисперсий дальнейшую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики критерия Манна–Уитни. В зависимости от использования параметрических или непараметрических методов анализа результаты в таблицах представлены: в случае применения параметрической статистики как среднее \pm ошибка среднего (стандартное отклонение) – Mean \pm SEM (SD); в случае анализа непараметрическими методами как медиана, первый и третий квартили – Mediana (Q1; Q3); на рисунке данные представлены как медианы. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Модель адьювантного артрита (АА) у крыс, вызванного субплантарным введением ПАФ, рассматривают в качестве модели артрита, при которой к первоначально развивающейся неспецифической воспалительной реакции присоединяется аутоиммунный процесс.

На первом этапе исследования неспецифическая воспалительная реакция у крыс с АА была максимальной на 3-и сут после введения ПАФ и характеризовалась в группе «Адьювантный артрит» увеличением диаметра стопы (табл. 1) и голеностопного сустава (табл. 2) по сравнению с фоновыми показателями до моделирова-

ния патологического процесса. К 7-м сут отёчность лап этих крыс снижалась и оставалась стабильной до 14-х сут после индукции воспаления (табл. 1); наблюдаемое увеличение диаметра голеностопного сустава к 14-м сут уменьшалось (табл. 2).

5% гель гимантана снижал выраженность неспецифического воспаления у крыс с АА, что проявлялось значимым уменьшением отёка подушечки и голеностопного сустава левой задней лапы на 3-и и 7-е сут после введения животным ПАФ. По сравнению с группой «Адьювантный артрит» на фоне 5% геля гимантана на 3-и сут отёчность подушечки левой задней лапы крыс снижалась на 38,21%, голеностопного сустава левой задней лапы – на 41,25%. На 7-е сут в группе животных, которым на повреждённую лапу наносили 5% гель гимантана, отёк подушечки уменьшился на 30,49%, голеностопного сустава на – 56,42% (табл. 1, 2). На 14-е сут после введения индуктора воспаления в группе крыс, которым наружно наносили 5% гель гимантана, уменьшение отёчности подушечки и голеностопного сустава левой задней лапы было не значимым по сравнению с «нелеченой» группой. (табл. 1, 2). Статистически значимых различий показателей при использовании 5% геля гимантана и 1% геля диклофенака не выявлено (табл. 1, 2).

Развитие воспалительного процесса после инъекции ПАФ в заднюю лапу крыс сопровождалось сниженной динамикой прироста массы тела животных по сравнению с группой крыс без экспериментальной патологии. Уже начиная с 1-х сут после индукции воспаления у животных с АА наблюдалось замедление набора массы тела. Статистической значимости ($p < 0,05$) разница массы тела между группой крыс с АА, которые не получали препаратов и группой «Пассивный контроль») достигала на 7-е сут после введения ПАФ. В последующие дни регистрации значимые ($p < 0,05$) отличия массы тела крыс группы «Адьювантный ар-

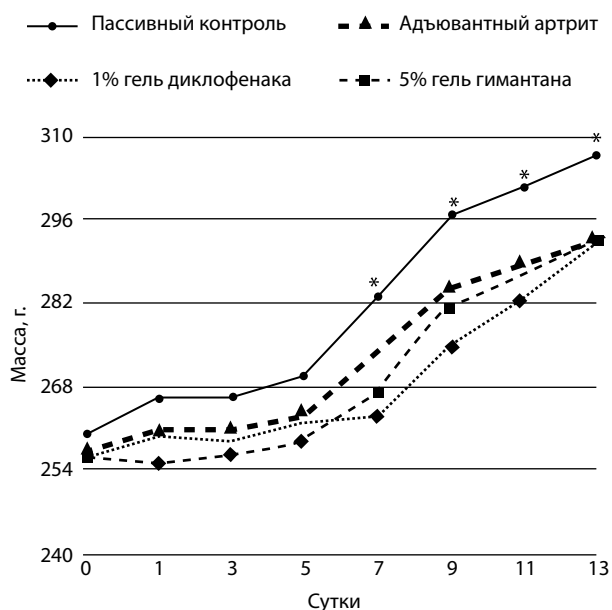
Таблица 1

Изменение диаметра стопы левой задней конечности крыс с моделью адьювантного артрита на фоне ежедневного нанесения гелей гимантана и диклофенака на повреждённую лапу животных начиная за 1 сут до индукции воспаления

Группа	Изменение диаметра стопы левой задней конечности в области подушечки лапы крысы (мм) относительно фоновых значений после введения полного адьюванта Фрейнда		
	3-и сут	7-е сут	14-е сут
Пассивный контроль	-0,05 (-0,22; 0,08)*	-0,06 \pm 0,07 (0,23)*	0,00 (-0,10; 0,10)*
Адьювантный артрит	2,80 (2,40; 3,10)	1,64 \pm 0,15 (0,44)	1,56 (0,86; 2,00)
Гимантан, 5% гель	1,73 (0,86; 2,16)*	1,14 \pm 0,10 (0,30)*	1,22 (0,50; 1,40)
Диклофенак, 1% гель	1,18 (0,76; 1,48)*	1,19 \pm 0,15 (0,40)*	0,91 (0,50; 1,08)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с группой «Адьювантный артрит», критерий Манна–Уитни/критерий Даннета.

триг» от соответствующих значений группы «Пассивный контроль» сохранялись: на 9-е и 11-е сут уменьшение составило – 12,5 г; на 13-е сут – 14,5 г. На массу тела животных с АА 5% гель гимантана, как и препарат сравнения 1% гель диклофенака влияния не оказывал (рисунк).



Влияние 5% геля гимантана и 1% геля диклофенака на массу тела крыс с экспериментальным адьювантным артритом на фоне ежедневного нанесения гелей гимантана и диклофенака на повреждённую лапу животных начиная за 1 сут до индукции воспаления.

По оси абсцисс обозначены: 0-е сутки – день взвешивания крыс за 1 сут до введения им полного адьюванта Фрейнда (ПАФ); 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13-е сутки после введения животным ПАФ. Представлены медианы массы тела крыс.

* – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Адьювантный артрит», критерий Манна–Уитни.

Необходимо отметить, что на фоне 2-недельного ежедневного нанесения на повреждённую лапу крысам с АА 1% геля диклофенака с 5-х по 9-е сут зафиксирована гибель 4 животных из 10. В других группах ($n=10$) смертности крыс не наблюдалось. В проводимом ранее эксперименте была зарегистрирована подобная картина: на фоне 2-недельного наружного нанесения на лапу 1% геля диклофенака крысам с АА, погибли 4 из 11 животных, причём 3 из них в период с 6-х по 9-е сут после введения ПАФ [9].

На 4-е сут после индукции воспаления у крыс с АА регистрировали двигательную активность в актометре «Opto-Varimex». У животных группы «Адьювантный артрит» наблюдалось значимое снижение (34,03%) числа горизонтальных перемещений по сравнению с крысами без экспериментальной патологии (табл. 3). 5% гель гимантана улучшал координацию движения у крыс с АА, повышая число горизонтальных перемещений на 52,35% ($p=0,026$) по сравнению с группой «Адьювантный артрит», не уступая 1% гелю диклофенака. Увеличение числа горизонтальных перемещений животных на фоне диклофенака составило 45,72% ($p=0,058$) (табл. 3).

Таким образом, результаты проведённого эксперимента подтвердили полученные ранее данные об эффективности 5% геля гимантана [9]. В описанном выше эксперименте установлено, что 5% гель гимантана серии 190219 снижает выраженность неспецифической воспалительной реакции у крыс с АА и улучшает координацию движений, по эффекту не уступая препарату сравнения НПВП 1% гелю диклофенака. Значимых отличий от препарата сравнения не зафиксировано.

На втором этапе исследования оценивали влияние наружной гелевой формы гимантана в сравнении с гелем диклофенака на развивавшийся в течение 14 сут неспецифический воспалительный процесс у

Таблица 2

Изменение диаметра голеностопного сустава в динамике на фоне ежедневного нанесения гелей гимантана и диклофенака на повреждённую лапу животных, начиная за 1 сут до индукции воспаления

Группа	Изменение диаметра голеностопного сустава (мм) относительно фоновых значений после введения полного адьюванта Фрейнда		
	3 сутки	7 сутки	14 сутки
Пассивный контроль	0,17±0,15 (0,48)*	0,20±0,16 (0,50)*	-0,16±0,07 (0,22)*
Адьювантный артрит	4,00±0,50 (1,50)	2,18±0,27 (0,82)	1,25±0,27 (0,85)
Гимантан, 5% гель	2,35±0,34 (1,02)*	0,95±0,12 (0,38)*	1,03±0,23 (0,60)
Диклофенак, 1% гель	2,22±0,35 (1,10)*	1,30±0,31 (0,81)*	0,79±0,23 (0,57)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с группой «Адьювантный артрит», критерий Даннета.

крыс. Показатели отёчности левой задней лапы на 14-е сут после инъекции ПАФ в группах с АА не различались между собой (табл. 4, 5). После 7 сут ежедневного нанесения гелей гимантана и диклофенака на повреждённую конечность (21-е сут опыта) отёчность левых задних лап у животных снижалась по сравнению с группой «Адьювантный артрит». Однако значимые различия с группой «Адьювантный артрит» при использовании 5% геля гимантана, составившие 33,3% зафиксированы только по показателю

«изменение диаметра стопы левой задней конечности» (табл. 4, 5). При этом через 7 сут ежедневного нанесения крысам 1% геля диклофенака в группе погибли 5 животных из 20, в остальных группах крыс с АА ($n=20$) гибели крыс не наблюдалось. Через 14 сут нанесения гелей (28-е сут опыта) при использовании 5% геля гимантана также зарегистрировано значимое снижение отёка стопы крыс в области плюсны на 45,0% по сравнению с группой «Адьювантный артрит». На фоне 1% геля диклофенака диаметр левой

Таблица 3

Влияние наружных лекарственных форм на горизонтальную двигательную активность крыс с моделью адьювантного артрита на фоне ежедневного нанесения гелей гимантана и диклофенака на повреждённую лапу животных начиная за 1 сут до индукции воспаления

Группа	Число горизонтальных перемещений за 2 мин, ед.	Уровень значимости p по сравнению с группой «Активный контроль», критерий Даннета
Пассивный контроль	1169,71±108,44 (286,90)	0,042
Активный контроль	771,63±87,43 (247,28)	-
Гимантан, 5% гель	1175,56±116,52 (349,57)	0,026
Диклофенак, 1% гель	1124,44±100,96 (302,87)	0,058

Таблица 4

Изменение диаметра стопы левой задней конечности крыс с моделью адьювантного артрита на фоне ежедневного нанесения гелей гимантана и диклофенака на повреждённую лапу животных с 2-недельным воспалительным процессом

Группа	Изменение диаметра стопы левой задней конечности в плюсневой области (мм) относительно фоновых значений после введения полного адьюванта Фрейнда		
	14-е сут	21-е сут	28-е сут
Пассивный контроль	0,10 (-0,05; 0,35)*	0,00 (-0,15; 0,30)*	0,00 (-0,15; 0,40)*
Адьювантный артрит	2,90 (2,50; 3,50)	2,35 (2,00; 3,03)	2,00 (1,38; 2,58)
Гимантан, 5% гель	3,00 (2,50; 3,70)	1,55 (1,30; 1,80)*	1,10 (0,90; 1,43)*
Диклофенак, 1% гель	3,00 (2,25; 3,55)	1,70 (1,35; 2,60)	2,00 (1,45; 2,40)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с группой «Адьювантный артрит», критерий Манна–Уитни.

Таблица 5

Изменение диаметра голеностопного сустава в динамике на фоне ежедневного нанесения гелей гимантана и диклофенака на повреждённую лапу животных с 2-недельным воспалительным процессом

Группа	Изменение диаметра голеностопного сустава (мм) относительно фоновых значений после введения полного адьюванта Фрейнда		
	14-е сут	21-е сут	28-е сут
Пассивный контроль	-0,20 (-0,35; 0,00)*	0,00 (-0,45; 0,25)*	0,00 (-0,15; 0,20)*
Адьювантный артрит	1,25 (0,85; 1,60)	0,90 (0,68; 1,13)	0,40 (0,10; 0,63)
Гимантан, 5% гель	1,10 (0,80; 1,65)	0,55 (0,03; 1,30)	0,30 (-0,40; 0,80)
Диклофенак, 1% гель	1,05 (0,50; 1,90)	0,50 (0,00; 1,00)	0,00 (-0,10; 0,50)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с группой «Адьювантный артрит», критерий Манна–Уитни.

стопы животных не отличался от показателя группы крыс с «нелеченым» АА (табл. 4).

Отёк голеностопного сустава левой задней лапы крыс с АА (группа «Адьювантный артрит») с 14-х по 28-е сут опыта постепенно снижался: степень отёчности голеностопного сустава на 28-е сут снизилась в 3,1 раза по сравнению с 14-и сут после введения ПАФ (табл. 5). Изучаемые препараты в наружных лекарственных формах значимого влияния на диаметр голеностопного сустава не оказывали. При этом следует отметить, что за 14 сут нанесения на повреждённую конечность 1% геля диклофенака погибли 9 из 20 животных; в остальных группах гибели крыс не зафиксировано.

Масса тела животных с АА значимо не отличалась от массы тела крыс группы «Пассивный контроль». Изучаемые препараты не оказывали влияния на массу тела крыс. Ранее было показано, что на 21-е сут после введения ПАФ значимого ухудшения координации движений животных с АА по сравнению с крысами без экспериментальной патологии не наблюдалось [12], поэтому на 2-м этапе исследования не оценивали влияние гимантана и диклофенака в наружных лекарственных формах на двигательную активность животных с АА.

Таким образом, результаты 2-го этапа экспериментальной работы свидетельствуют об эффективности 5% геля гимантана в плане снижения отёчности лап у крыс с 2-недельным воспалительным процессом.

Обсуждение

Введение ПАФ в заднюю лапу крыс приводит к хроническому иммунному воспалению, при котором развивается повреждение суставов других конечностей, помимо той, в которую вводят ПАФ, что рассматривается в качестве модели ревматоидного артрита. Критическую роль в патогенезе ревматоидного артрита играют В-, Т-лимфоциты и макрофаги [13]. Известно, что на лимфоцитах человека находятся ионотропные глутаматные рецепторы [14] и иммунные клетки выделяют глутамат, который модулирует их активность [15–16]. Установлено, что антагонисты NMDA-рецепторов (МК-801, мемантин, ифенпродил) оказывают иммуносупрессивное действие, угнетая антигенспецифическую Т-клеточную пролиферацию, снижая цитотоксичность и способность контролируемой хемокинами миграции Т-клеток [17].

Гимантан является антагонистом ионного канала глутаматных рецепторов NMDA-подтипа [18], что наряду с зарегистрированной эффективностью препара-

та при ежедневном 2-недельном использовании в отношении неспецифической воспалительной реакции обуславливает перспективу изучения его действия на моделях аутоиммунных заболеваний и, в частности, на вторичную иммунологическую реакцию, индуцируемую ПАФ у крыс.

Заключение

Антагонист ионного канала глутаматных рецепторов NMDA-подтипа гимантан в наружной гелевой лекарственной форме снижает выраженность отёчного синдрома у аутобредных крыс с неспецифической воспалительной реакцией, вызванной субплантарным введением в левую заднюю лапу животных полного адьюванта Фрейнда. По эффективности препарат гимантан сопоставим с широко используемым НПВП диклофенаком в наружной лекарственной форме при курсовом ежедневном применении, начиная как за 1 сут до индукции воспаления, так и через 2 нед после введения полного адьюванта Фрейнда. Учитывая, что ионотропные глутаматные рецепторы находятся в том числе на лимфоцитах, и блокада NMDA-рецепторов может обуславливать иммуносупрессивное действие, представляет интерес дальнейшее исследование влияния антагонистов NMDA-рецепторов, в частности гимантана, на моделях аутоиммунных заболеваний.

Литература

1. Каратеев А.Е., Насонов Е.Л., Ивашкин В.Т., Мартынов А.И., Яхно Н.Н., Арутюнов Г.П. и др. Рациональное использование нестероидных противовоспалительных препаратов. Клинические рекомендации. *Научно-практическая ревматология*. 2018; 56:1-29. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2018-1-29>
2. Moore R.A., Tramer M.R., Carroll D., Wiffen P.J., McQuay H.J. Quantitative systematic review of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs. *BMJ*. 1998; 316(7128): 333-8. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.316.7128.333>
3. Derry S., Moore R.A., Gaskell H., McIntyre M., Wiffen P.J. Topical NSAIDs for acute musculoskeletal pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015. 6:CD007402. DOI:10.1002/14651858.CD007402.pub3
4. Evans J.M., McMahan A.D., McGilchrist M.M., White G., Murray F.E., McDevitt D.G., MacDonald T.M. Topical non-steroidal antiinflammatory drugs and admission to hospital for upper gastrointestinal bleeding and perforation: a record linkage case-control study. *BMJ*. 1995; 311(6996): 22-6. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.311.6996.22>
5. Wanka L., Iqbal K., Schreiner P.R. The lipophilic bullet hits the targets: medicinal chemistry of adamantane derivatives. *Chemical Reviews*. 2013; 113(5): 3516–604. DOI: 10.1021/cr100264t
6. Иванова Е.А., Капица И.Г., Непоклонов А.В., Кокшенев И.И., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. Противовоспалительная активность гимантана на моделях периферического воспаления и нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом. *Xu-*

- мико-фармацевтических журнал.* 2013; 47(10): 12-5. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11094-014-0994-x>
- Ivanova E., Kapitsa I., Valdman E., Voronina T. (2016) Comparison of the analgesic activity of antiparkinsonian aminoadamantane derivatives amantadine and hemantane. *Advances in Parkinson's Disease*. 2016; 5: 50-60. <http://dx.doi.org/10.4236/apd.2016.53007>
 - Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Блынская Е.В., Воронина Т.А. Оценка анальгетической активности гелевых форм гимантана для местного применения в формалиновом тесте у крыс. *Химико-фармацевтический журнал.* 2018; 52(8): 51-5. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-8-51-55
 - Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Воронина Т.А. Влияние гимантана в лекарственной форме для наружного применения на вызванный полным адьювантом Фрейнда воспалительный процесс у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2019; 82(4): 26-31. DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2019-82-4-23-27>
 - Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д. Методические рекомендации по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. В кн.: Миронова А.Н. и др., ред. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств.* Часть первая. М.: Гриф и К; 2012: 746–58.
 - Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Воронина Т.А. Оценка противовоспалительного действия 5% гелевых форм гимантана. В сборнике: Актуальные вопросы разработки, изучения и обращения лекарственных средств. *Сборник научных работ, посвященный 35-летию фармацевтического факультета ЯГМУ.* 2017: 180-3.
 - Матюшкин А.И., Иванова Е.А., Алексеева С.В., Качалов К.С., Воронина Т.А. Комплексная оценка воспалительного процесса у крыс с первичной и вторичной иммунологической реакцией, вызванной инъекцией полного адьюванта Фрейнда. *Биомедицина.* 2019; 2:75-87. DOI: 10.33647/2074-5982-15-2-75-87
 - Yap H.Y., Tee S.Z., Wong M.M., Chow S.K., Peh S.C., Teow S.Y. Pathogenic role of immune cells in rheumatoid arthritis: implications in clinical treatment and biomarker development. *Cells.* 2018; 7(10): E161. DOI: 10.3390/cells7100161
 - Lombardi G., Dianzani C., Miglio G., Canonico P.L., Fantozzi R. Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes. *British Journal of Pharmacology.* 2001; 133: 936-44. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704134
 - Pacheco R., Oliva H., Martinez-Navio J.M., Climent N., Ciruela F., Gatell J.M., et al. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. *Journal of Immunology.* 2006; 177(10): 6695–704. DOI: 10.4049/jimmunol.177.10.6695
 - Affaticati P., Mignen O., Jambou F., Potier M.C., Klingel-Schmitt I., Degrouard J., et al. Sustained calcium signalling and caspase-3 activation involve NMDA receptors in thymocytes in contact with dendritic cells. *Cell Death Differ.* 2011; 18(1): 99-108. DOI: 10.1038/cdd.2010.79
 - Kahlfuß S., Simma N., Mankiewicz J., Bose T., Lowinus T., Klein-Hessling S., et al. Immunosuppression by N-methyl-d-aspartate receptor antagonists is mediated through inhibition of K_v 1.3 and K_{Ca} 3.1 channels in T cells. *Molecular and Cellular Biology.* 2013; 34(5): 820-31. DOI: 10.1128/MCB.01273-13
 - Elshanskaya M.V., Sobolevskii A.I., Khodorov B.I., Val'dman E.A. Interaction of the new adamantane derivative a-7 – a potential antiparkinsonian drug – with NMDA receptor channels. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2001; 64(1): 18-21.
- ## References
- Karateev A.E., Nasonov E.L., Ivashkin V.T., Martynov A.I., Yakhno N.N., Arutyunov G.P., et al. Rational use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clinical guidelines. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya. Rheumatology Science and Practice.* 2018; 56(Suppl. 1): 1-29 DOI: 10.14412/1995-4484-2018-1-29 (In Russian)
 - Moore R.A., Tramer M.R., Carroll D., Wiffen P.J., McQuay H.J. Quantitative systematic review of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs. *BMJ.* 1998; 316(7128): 333-8. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.316.7128.333>
 - Derry S., Moore R.A., Gaskell H., McIntyre M., Wiffen P.J. Topical NSAIDs for acute musculoskeletal pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2015; 6:CD007402. DOI:10.1002/14651858.CD007402.pub3
 - Evans J.M., McMahon A.D., McGilchrist M.M., White G., Murray F.E., McDevitt D.G., MacDonald T.M. Topical non-steroidal antiinflammatory drugs and admission to hospital for upper gastrointestinal bleeding and perforation: a record linkage case-control study. *BMJ.* 1995; 311(6996): 22-6. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.311.6996.22>
 - Wanka L., Iqbal K., Schreiner P.R. The lipophilic bullet hits the targets: medicinal chemistry of adamantane derivatives. *Chemical Reviews.* 2013; 113(5), 3516–604. DOI: 10.1021/cr100264t
 - Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Nepoklonov A.V., Kokshenev I.I., Val'dman E.A., Voronina T.A. Anti-inflammatory activity of hemantane on peripheral inflammation and lipopolysaccharideinduced neuro-inflammation models. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2014. 47(10): 517-20. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11094-014-0994-x> (in Russian)
 - Ivanova E., Kapitsa I., Valdman E., Voronina T. (2016) Comparison of the analgesic activity of antiparkinsonian aminoadamantane derivatives amantadine and hemantane. *Advances in Parkinson's Disease.* 2016; 5: 50-60. <http://dx.doi.org/10.4236/apd.2016.53007>
 - Ivanova E.A., Matyushkin A.I., Blynskaya E.V., Voronina T.A. Evaluation of the analgesic activity of topical gel dosage forms of hemantane in the formalin test in rats. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2018; 52(8): 740-3. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1890-6> (in Russian)
 - Ivanova E.A., Matyushkin A.I., Voronina T.A. Effect of a topical formulation of hemantane on complete Freund's adjuvant-induced inflammation in rats. *Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya.* 2019. 82(4): 26-31. DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2019-82-4-23-27> (in Russian)
 - Shvarts G.Ya., Syabaev R.D. Methodological instructions on the study of new nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Mironov A.N., et al., eds. *Guidance on preclinical study of new pharmacological substances. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv] Part 1.* Moscow: Grif and K; 2012: 746–58. (in Russian)
 - Ivanova E.A., Matyushkin A.I., Voronina T.A. *Evaluation of the anti-inflammatory effect of 5% topical formulation of hemantane. Collection of scientific papers dedicated to the 35th anniversary of the faculty of pharmacy of YAGMU [V sbornike: Aktual'nye voprosy razrabotki, izucheniya i obrashcheniya lekarstvennykh sredstv. Sbornik nauchnykh rabot, posvyashhennyy 35-letiyu farmatsevticheskogo fakul'teta YaGMU].* 2017: 180-3. (in Russian)
 - Matyushkin A.I., Ivanova E.A., Alekseeva S.V., Kachalov K.S., Voronina T.A. Comparison of inflammation severity in rats with a primary reaction and secondary immunological reaction to an injection of Freund's complete adjuvant. *Biomeditsina.* 2019; 2. 75-87. DOI: 10.33647/2074-5982-15-2-75-87 (in Russian)

13. Yap H.Y., Tee S.Z., Wong M.M., Chow S.K., Peh S.C., Teow S.Y. Pathogenic role of immune cells in rheumatoid arthritis: implications in clinical treatment and biomarker development. *Cells*. 2018; 7(10): E161. DOI: 10.3390/cells7100161
14. Lombardi G., Dianzani C., Miglio G., Canonico P.L., Fantozzi R. Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes. *British Journal of Pharmacology*. 2001; 133: 936-44. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704134
15. Pacheco R., Oliva H., Martinez-Navio J.M., Climent N., Ciruela F., Gatell J.M. et al. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. *Journal of Immunology*. 2006; 177(10): 6695–704. DOI: 10.4049/jimmunol.177.10.6695
16. Affaticati P., Mignen O., Jambou F., Potier M.C., Klingel-Schmitt I., Degrouard J., et al. Sustained calcium signalling and caspase-3 activation involve NMDA receptors in thymocytes in contact with dendritic cells. *Cell Death Differ*. 2011; 18(1): 99-108. DOI: 10.1038/cdd.2010.79
17. Kahlfuß S., Simma N., Mankiewicz J., Bose T., Lowinus T., Klein-Hessling S., et al. Immunosuppression by N-methyl-d-aspartate receptor antagonists is mediated through inhibition of K_v 1.3 and K_{Ca} 3.1 channels in T cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2013; 34(5): 820-31. DOI: 10.1128/MCB.01273-13
18. Elshanskaya M.V., Sobolevskii A.I., Khodorov B.I., Val'dman E.A. Interaction of the new adamantane derivative a-7 - a potential antiparkinsonian drug - with NMDA receptor channels. *Экспериментальная и Клиническая Фармакология*. 2001; 64(1): 18-21.

Сведения об авторах:

Иванова Елена Анатольевна, канд. фарм. наук, ст. науч. сотр. лаб. психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», e-mail: iwapanowaea@yandex.ru;

Матюшкин А.И., аспирант лаб. психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Воронина Т.А., доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова».

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092 9

Афанасьевская Е.В.¹, Медведева Е.В.¹, Газимиева Б.М.¹, Куренкова А.Д.¹, Кытько О.В.², Панюшкин П.В.², Истранов Л.П.¹, Истранова Е.В.¹, Шехтер А.Б.¹, Лычагин А.В.³, Чагин А.С.^{1,4}, Тельпухов В.И.^{1,2}

Сравнение хондропластических свойств коллагеновых мембран Chondro-Gide® и Хондротек не выявило различий в условиях модели полнослойного повреждения артикулярного хряща у крыс

¹ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Минздрава России, Институт регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины, 119991, Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

²ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Минздрава России, Кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, 119991, Москва, Россия, ул. Россолимо 15/13, стр.1;

³ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Минздрава России, Кафедра травматологии, ортопедии и хирургии катастроф, 119991, Москва, Россия, ул. Большая Пироговская, д. 6-1;

⁴Кафедра Физиологии и Фармакологии, Каролински Институт, Сольнаваген 9а, 17177, Стокгольм, Швеция

Введение. Для заполнения костно-хрящевых дефектов широкое применение получили коллагенсодержащие импланты. Наибольшей популярностью пользуется коллагеновая мембрана Chondro-Gide® (Швейцария). Предполагается, что после пересадки она запускает естественный механизм хондрогенеза. Однако некоторые клинические исследования показывают, что отдаленные результаты не всегда положительны. В ПМГМУ им. И.М. Сеченова изготовлена коллагеновая мембрана Хондротек (рабочее название), которая в эксперименте показала хорошие результаты при выполнении реконструкции дефектов гиалинового хряща.

Цель исследования – сопоставление хондропластических свойств двух коллагеновых мембран по восстановлению полнослойного дефекта суставного хряща у крыс в эксперименте и оценка возможности импортозамещения.

Методика. Выполнено 3 серии экспериментов на коленных суставах 18 крыс линии Вистар: контрольная группа – без восстановления дефекта и две опытные группы с имплантацией одной из мембран в область дефекта. Полнослойный дефект хряща воспроизводили в межмышечковой ямке коленного сустава фрезой диаметром 2,5 мм до появления кровяной росы на дне дефекта. Импланты из мембран соответствующего размера помещали в дефект и прикрывали надколеником. Дополнительной фиксации не требовалось. Срок наблюдения 2 и 4 мес. Процессы репаративной регенерации оценивали визуально с применением шкалы ICRS и с помощью гистологических методов исследования.

Результаты. Применение коллагеновых мембран ускоряло восстановление тканей в области дефекта. Хондропластические свойства импортной и отечественной мембран были аналогичными. Признаков восстановления гиалинового хряща не было обнаружено ни в контрольной, ни в одной из опытных групп. Утраченные ткани замещались фиброзным хрящом.

Заключение. Обе исследованные коллагеновые мембраны (отечественная Хондротек и импортная Chondro-Gide®) могут быть использованы для восстановления целостности поврежденного хряща и восстановления конгруэнтности суставных поверхностей. Процесс восстановления происходил за счет формирования фиброзного хряща, регенерация гиалинового хряща не наблюдалась ни в одной из групп. Хондропластические свойства импортной и отечественной мембран оказались аналогичными, что доказывает возможность рекомендовать применение последней в клинической практике. Полученные данные позволяют рекомендовать мембраны Хондротек для импортозамещения.

Ключевые слова: локальный дефект хряща; коллагеновые мембраны; репаративная регенерация.

Для цитирования: Афанасьевская Е.В., Медведева Е.В., Газимиева Б.М., Куренкова А.Д., Кытько О.В., Панюшкин П.В., Истранов Л.П., Истранова Е.В., Шехтер А.Б., Лычагин А.В., Чагин А.С., Тельпухов В.И. Сравнение хондропластических свойств коллагеновых мембран Chondro-Gide® и Хондротек не выявило различий в условиях модели полнослойного повреждения артикулярного хряща у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2020; 64(3): 102-109.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.102-109

Для корреспонденции: Тельпухов Владимир Иванович, e-mail: telpuhov@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ по теме «Фундаментальные проблемы клеточных технологий» (Грант № 19-29-04115)

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Тельпухов В.И., Чагин А.С.; изготовление коллагеновой мембраны Хондротек – Истранов Л.П., Истранова Е.В.; выполнение экспериментальных операций – Афанасьевская Е.В., Медведева Е.В., Газимиева Б.М., Тельпухов В.И.; забор морфологического материала – Афанасьевская Е.В., Куренкова А.Д., Панюшкин П.В., Кытько О.В.; приготовление, обработка гистологического материала – Куренкова А.Д., Кытько О.В., Панюшкин П.В.; описание гистологического материала – Шехтер А.Б.; визуальная оценка репаративной регенерации по шкале восстановления хряща ICRS – Афанасьевская Е.В., Лычагин А.В.; написание текста – Афанасьевская Е.В., Медведева Е.В., Тельпухов В.И.; редактирование – Чагин А.С., Тельпухов В.И., Медведева Е.В.

Поступила 15.09.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликовано 21.08.2020

Afanasyevskaya E.V.¹, Medvedeva E.V.¹, Gazimieva B.M.¹, Kurenkova A.D.¹, Kytko O.V.², Panyushkin.P.V.², Istranov, L.P.¹, Istranova E.V.¹, Shekhter A.B.¹, Lychagin A.V.³, Chagin A.S.^{1,4}, Telpukhov V.I.^{1,2}

Comparison of chondroplastic properties of the Chondro-Gide® and Chondroteck collagen membranes did not reveal reparative differences in the rat model of full thickness defect of articular cartilage

¹I M Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Regenerative Medicine of the Science and Technology Park of Biomedicine, Trubetskaya Str 8, Bldg 2, Moscow 119991, Russia;

²Department of Topographic Anatomy and Operative Surgery, I M Sechenov First Moscow State Medical University, Rossolimo Str 15/13, Bldg 1, Moscow 119991, Russia;

³Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Surgery, I M Sechenov First Moscow State Medical University, Bolshaya Pirogovskaya Str 6-1, Moscow 119991, Russia;

⁴Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Solnavagen 9a, Stockholm 17177, Sweden

Background. Collagen-based membranes and scaffolds are widely used for implantation into various bone and cartilage defects. The Chondro-Gide® (Switzerland) collagen membrane is among membranes widely used for defects of articular cartilage in orthopedic practice of the Russian Federation. This membrane is considered to trigger a natural chondrogenesis mechanism. However, some clinical studies have shown that remote results are not always beneficial. A collagen-based membrane (working name, Chondroteck), which showed properties compatible to those of Chondro-Gide® in *in vitro* experiments, was recently developed at the Sechenov University (1st MSMU).

Aim. To compare chondrogenic properties of these two membranes *in vivo* and to explore a possibility of using the Chondroteck membrane for restoration of full-thickness defects in articular cartilages.

Methods. The full-thickness defects were created in the intercondylar fossa of 18 adult Wistar rats by drilling a 2.5 mm diameter hole into the subchondral bone (until small blood drops appeared on the bottom of the defect). Then rats were divided into three groups, control (no membrane added) and two experimental groups, one group with Chondro-Gide® and another group with the Chondroteck membrane implanted into the defect. Membranes were cut to the appropriate size, placed into the defect and covered with the patella. No additional fixation of membranes was required. Cartilage repair was assessed using the ICRS scoring system on histological sections stained with hematoxylin/eosin or toluidine blue.

Results. Both collagen membranes improved the curvature of the articular surface and macroscopic appearance of the cartilage and protected the tissues surrounding the defect area as compared to the control. However, no formation or restoration of hyaline cartilage was detected in any group. Instead, fibrous tissue was formed at the defect area, and this fibrous tissue was similar in both groups with membranes.

Conclusions. Both Chondro-Gide® and Chondroteck membranes can be utilized for restoration of cartilage surface. Formation of hyaline cartilage does not occur with either membrane. Thus, chondroplastic properties of both membranes are comparable, which allows to recommend the locally made Chondroteck membrane for further testing.

Keywords: full thickness cartilage defect; collagen membranes; reparative regeneration.

For citation: Afanasyevskaya E.V., Medvedeva E.V., Gazimieva B.M., Kurenkova A.D., Kytko O.V., Panyushkin P.V., Istranov L.P., Istranova E.V., Shekhter A.B., Lychagin A.V., Chagin A.S., Telpukhov V.I. Comparison of chondroplastic properties of the chondro-gide and chondro-teck collagen membranes did not reveal reparative differences in the rat model of full thickness defect of articular cartilage. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 102-109 (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.102-109

For correspondence: *Telpukhov Vladimir Ivanovich*, MD, Laboratory of Skeletal Tissue Regeneration, IRM, 1st Moscow State Medical University (Sechenov University), e-mail: telpuhov@mail.ru

Contribution: the concept and design of the study – Telpukhov V.I., Chagin A.S.; production of a collagen membrane Chondrotek – Istranov L.P., Istranova E.V.; performing experimental operations – Afanasyevskaya E.V., Medvedeva E.V., Gazimieva B.M., Telpukhov V.I.; collection of morphological material – Afanasyevskaya E.V., Kurenkova A.D., Panyushkin P.V., Kytko O.V.; preparation, processing of histological material – Kurenkova A.D., Kytko O.V., Panyushkin P.V.; description of the histological material – Schekhter A.B.; visual assessment of reparative regeneration on the ICRS cartilage restoration scale – Afanasyevskaya E.V., Lychagin A.V.; writing the text – Afanasyevskaya E.V., Medvedeva E.V., Telpukhov V.I.; editing – Chagin A.S., Telpukhov V.I., Medvedeva E.V.

Acknowledgment. This study was supported by The Russian Scientific Foundation (RSF, grant #19-15-00241 to ASC)

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

Information about the authors:

Medvedeva E.V., <https://orcid.org/0000-0002-6263-0986>

Kurenkova A.D., <https://orcid.org/0000-0001-6905-9703>

Shekhter A.B., <https://orcid.org/0000-0003-2914-318X>

Lychagin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-2202-8149>

Chagin A.S., <https://orcid.org/0000-0002-2696-5850>

Telpukhov V.I., <https://orcid.org/0000-0002-2221-7353>

Received 15.09.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Локальные костно-хрящевые дефекты в суставе возникают вследствие прямого травмирующего воздействия, а также в результате повреждения менисков, связочного аппарата и других суставных элементов. Также локальные дефекты являются следствием различных заболеваний воспалительного и ревматического генеза, рассекающего остеохондроза (болезнь Кенига – рассекающий остеохондрит) [1]. В подавляющем большинстве случаев подобные изменения завершаются развитием остеоартроза (ОА), что приводит с возрастом к инвалидизации населения [2]. На данный момент наиболее эффективным подходом к лечению локальных дефектов суставного хряща является хирургическое вмешательство. В клинической практике широко применяются артроскопическая перфорация или микрофрактурирование субхондральной костной пластинки, а также мозаичная костно-хрящевая аутопластика. Подобных операций в Европе выполняется более 300 тыс. в год [3].

В настоящее время для заполнения костно-хрящевых дефектов широкое применение получили коллагеносодержащие импланты. Во многих клиниках используется коллагеновая мембрана Chondro-Gide® (Geistlich Pharma AG, Швейцария) [4]. Производители рекомендуют использовать ее для укрытия «супергустка» из стволовых клеток, формирующегося в результате перфорации субхондральной кости через дно дефекта. Считается, что далее мембрана запускает естественный механизм хондрогенеза [5].

Однако некоторые клинические исследования показывают, что отдаленные результаты не всегда поло-

жительны. В ряде случаев в сроки до 2 лет наблюдали отсутствие деградации и отслойки мембраны Chondro-Gide® [6].

В ПМГМУ им. И.М. Сеченова была изготовлена коллагеновая мембрана Хондротек (рабочее название), которая в эксперименте показала хорошие результаты при выполнении реконструкции дефектов гиалинового хряща [7]. Как и зарубежный аналог, мембрана Хондротек состоит из двух слоев. Первый слой представляет плотную пленку коллагеновых волокон, второй слой является рыхлой коллагеновой губкой, структурированной формальдегидом.

Цель исследования – сопоставление хондропластических свойств двух коллагеновых мембран по восстановлению полнослойного дефекта суставного хряща у крыс в эксперименте и оценка возможности импортозамещения.

Методика

Все этапы исследования выполнялись согласно Приказу Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13.11.1984, утвердившего «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных». Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом (07-17 от 13.09.17).

Выполнено 3 группы экспериментов на 18 животных: контрольная – без укрытия дефекта (1-я группа) и две экспериментальные группы с имплантацией одной из мембран в область дефекта (2-я и 3-я группы). Самцы крыс линии Вистар массой 300–350 г были оперированы под наркозом (золетил 100 – 0,14 мл внутримышеч-

но). Доступ к межмышечковой ямке коленного сустава осуществляли послойным медиальным парапателлярным разрезом с последующим отведением надколенника латерально. Далее у всех животных формировали дефект посредством вращающих движений фрезы диаметром 2,5 мм до появления небольших кровянистых выделений (кровяная роса) на дне дефекта. В 1-й (контрольной) группе имплантацию коллагеновых мембран не проводили; в одной экспериментальной группе (2-й) в область дефекта имплантировали мембраны Chondro-Gide®, в другой (3-я группа) – мембраны Хондротек отечественного производства (создана в ПМГМУ им. И.М.Сеченова). Импланты из мембран вырезали строго диаметром 2,5 мм, что позволяло добиться надежного закрепления мембраны в очаге повреждения без применения дополнительных методов фиксации. Результаты исследования оценивали визуально по шкале восстановления ткани хряща The International Cartilage Repair Society, ICRS [8]. Применяли методы морфологического исследования. Образцы окрашивали гематоксилином и эозином, толуидиновым синим и сафранином О.

Результаты

При визуальной оценке оперированных коленных суставов через 2 мес область дефекта четко идентифицировалась (рис. 1, А-В). Ни в одной из групп полнослойного заполнения дефекта новообразованной тканью не наблюдалось (рис. 1, А-В). Наиболее полное, равномерное и однородное заполнение дефекта было отмечено в группе с имплантацией мембраны Chondro-Gide®, где можно было идентифицировать плотную блестящую новообразованную ткань (рис. 1, Б). В то же время в контроле и в группе с имплантацией мембраны Хондротек заполнение дефекта было неполным и неравномерным (рис. 1, А, В).

Гистологический анализ подтвердил частичное заполнение дефекта (рис. 1, Г-Е). В обеих группах с имплантацией коллагеновых мембран был идентифицирован нерезорбированный имплант (рис. 1, Д, Е, З, И, Л, М). В некоторых случаях отмечено образование новой хрящеподобной ткани от периферии к центру дефекта (рис. 1, М). Указанная ткань содержала крупные круглые клетки, продуцирующие матрикс с высоким содержанием протеогликанов (рис. 1, М). На препаратах из контрольной серии на дне дефекта был идентифицирован тонкий слой фиброзной ткани (рис. 1, К). Значительного воспалительного процесса, субхондрального фиброза и формирования остеоцитов не наблюдалось (рис. 1, А-В).

На макропрепаратах образцов групп со сроками наблюдения 4 мес выявлено более полное (в сравне-

нии со сроком наблюдения 2 мес) заполнение дефекта плотной и однородной новообразованной тканью (рис. 2, А-В). Дефект заполнен равномерно, поверхность гладкая, блестящая, с нечетко выраженной бугристостью, однако, отличимая по внешнему виду от интактного хряща (рис. 2, А-В). По внешним признакам восстановление дефекта в группе с имплантацией мембраны Chondro-Gide® выглядело несколько лучше, чем в группе с мембраной Хондротек (рис. 2, Б, В). Во всех группах отмечены эрозивные изменения на мышечках бедренной кости вне зоны дефекта (рис. 2, А-В). Патоморфологическое исследование срезов ткани суставов сроком наблюдения 4 мес подтвердило практически полное заполнение дефекта новообразованной фиброзной соединительной тканью и фиброзным хрящом (рис. 2, Г-И). При этом имплантированная коллагеновая мембрана не определялась в связи с полной деградацией (рис. 2, Д, Е). При имплантации мембраны Chondro-Gide® отмечалось более однородное заполнение дефекта в сравнении с группой Хондротек (рис. 2, З, И). Важно отметить, что признаков формирования гиалинового хряща не было обнаружено ни в одной из экспериментальных групп (рис. 2, Г-И).

Обсуждение

Процесс регенерации гиалинового хряща у крыс и человека идентичен. Суставной гиалиновый хрящ у крыс обладает способностью к спонтанной регенерации, однако регенеративный процесс у них выражен в меньшей степени, чем у других животных [9]. Это стало основанием для моделирования полнослойного замещения остеохондрального дефекта именно на крысах. Модель максимально приближена к клинике (перфорация дна дефекта для получения суперсгустка). Гипертрофическое разрастание соединительной ткани в суставе, как и признаки активного воспалительного процесса, не были обнаружены ни в одной из серий. Это свидетельствует о том, что воспалительные и другие патологические процессы в ответ на имплантацию коллагеновых мембран не запускались. Манипулировать мембраной Хондротек нам показалось более удобно, так как компактный наружный слой мембраны позволял надежно зафиксировать последнюю в зоне дефекта. При использовании мембраны Chondro-Gide® отмечено изменение ее физических свойств при контакте со сгустком на дне дефекта. При макроскопической оценке препаратов по шкале восстановления хряща ICRS более высокие результаты получены при пластике дефекта мембраной Chondro-Gide®, однако при патоморфологическом исследовании в каждой группе новообразованная ткань имела фиброзную структуру, т.е. признаков регенера-

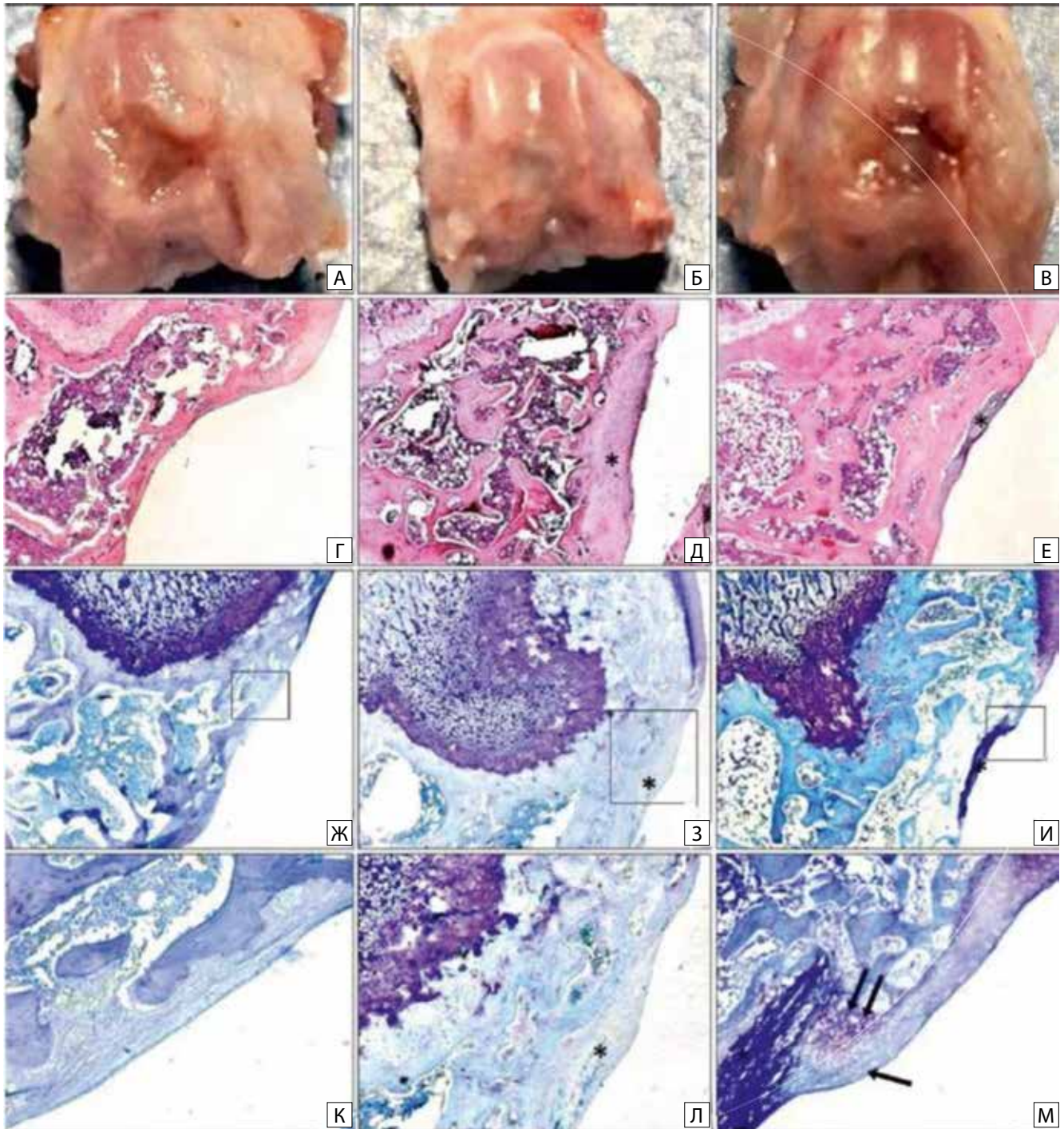


Рис. 1. Срок наблюдения 2 мес. По вертикали: А, Г, Ж, К – 1-я группа без заполнения дефекта мембраной (контроль); Б, Д, З, Л – 2-я группа – замещение дефекта мембраной Chondro-Gide®; В, Е, И, М – 3-я группа – замещение дефекта мембраной Хондротек. По горизонтали: А, Б, В – макропрепараты; Г, Д, Е – микропрепараты. Окрашивание: Г, Д, Е – гематоксилином и эозином; Ж, З, И, К, Л, М – толуидиновым синим. Область, содержащая нерезорбированную мембрану, отмечена звездочкой. М – область формирования новой ткани обозначена одной стрелочкой; группа клеток, продуцирующих протеогликаны, – двумя стрелочками.

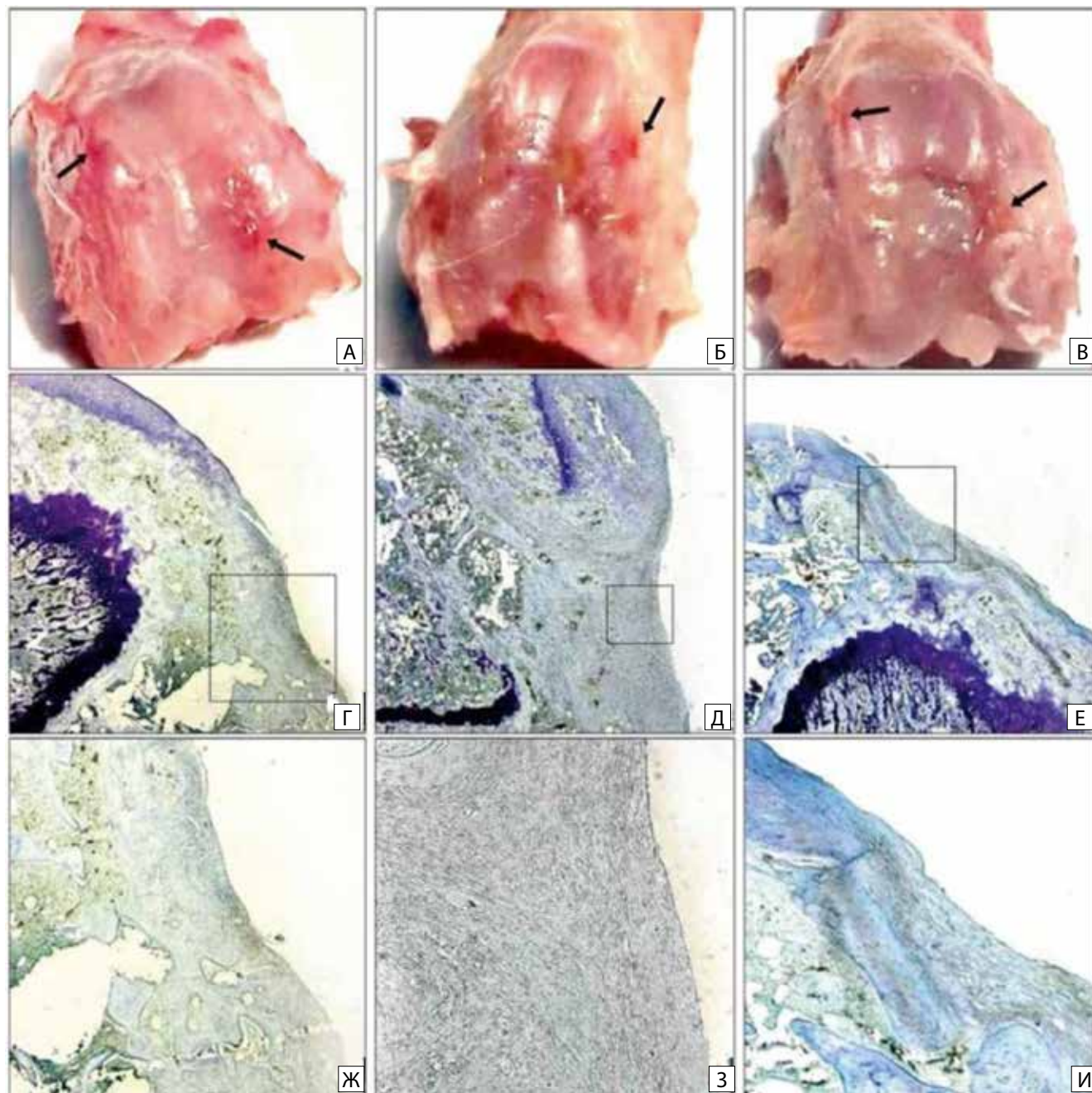


Рис. 2. Срок наблюдения 4 мес.

На макропрепаратах отмечены стрелочкой эрозивные изменения суставных поверхностей в контрольной группе (А), в группе с мембраной Chondro-Gide® (Б) и в группе с мембраной Хондротек (В). На срезах, окрашенных толуидиновым синим, новообразованная ткань имеет фиброзную структуру, а гиалиновый хрящ не идентифицируется ни в одной из групп (Г-И).

ции гиалинового хряща выявлено не было. Мы считаем, что репаративного потенциала коллагеновой пленки недостаточно для восстановления гиалинового хряща. Возможно, для достижения наиболее приемлемых резуль-

татов необходимо добавление специфического клеточного субстрата или стимуляторов хондрогенеза. Различий в сроках биодegradации разных мембран не обнаружено. Коллагеновая мембрана Хондротек была

изготовлена по оригинальной авторской методике и на данный момент не является зарегистрированным медицинским изделием. Мембрана Хондротек может быть использована в клинической практике как отечественный аналог импортного изделия. При этом себестоимость мембраны Хондротек в несколько раз ниже стоимости мембраны Chondro-Gide®, что позволит снизить затраты лечебного учреждения без потери качества оказания медицинской помощи.

Заключение

Процесс формирования новой ткани в зоне полнослойного дефекта при использовании коллагеновых мембран происходит раньше, чем в контрольной группе. Следовательно, коллагеновые мембраны способствуют процессам регенерации хрящевой ткани в эксперименте, что дает основание для их применения в клинической практике. Однако новообразованный хрящ по структуре отличен от интактного. Обе коллагеновые мембраны могут быть использованы для восстановления целостности поврежденного хряща и конгруэнтности суставных поверхностей. Регенерация гиалинового хряща не наблюдалась ни в одной из групп.

Литература

1. Митрофанов В.А., Жаденов И.И., Пучиньян Д.М. Остеоартроз: факторы риска, патогенез и современная терапия. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2008; 2(20): 23-30.
2. Allen K.D., Golightly Y.M. Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence. *Current opinion in rheumatology*. 2015; 27(3): 276-83.
3. Anders S, Wiech O, Schaumburger J, et al. Autologous Matrix induced chondrogenesis (AMIC) for focal chondral defects of the knee — first results. *J Bone Joint Surg Br*. 2009; 91(Suppl.1): 83–7.
4. Мурин Д.В., Волошин В.П., Казанцева И.А., Безуглова Т.В., Гаганов Л.Е. Морфологические изменения при использовании коллагеновой мембраны Chondro Gide и аутохондропластики коленного сустава. *Сборник статей XI Конгресса Российского Артроскопического Общества, посвященного 130-летию со дня рождения академика Н.Н. Приорова*. Москва, 22-25/04/2015, 58-9.
5. Fontana A. A novel technique for treating cartilage defects in the hip: a fully arthroscopic approach to using autologous matrix-induced chondrogenesis. *Arthroscopy Techniques*. 2012; 1(1): e63-8.
6. Лазышвили Г.Д., Затикиан В.Р., Шукюр-заде Э.Р., Корнаев А.С., Акматалиев К.И., Данилов М.А. Актуальные вопросы хондропластики. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2013; 3: 13-7.
7. Хубутия М.Ш., Ключкин И.Ю., Истранов Л.П., Хватов В.Б., Шехтер А.Б., Ваза А.Ю. и др. Стимуляция регенерации гиали-

нового хряща при костно-хрящевой травме в эксперименте. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2008; 146(11): 597-600.

8. Van den Borne M.P., Raijmakers N.J., Vanlauwe J., Victor J., de Jong S.N., Bellemans J. et al. International Cartilage Repair Society. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007; 15(12): 1397-402.
9. McCoy A.M., Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Veterinary Pathology*. 2015; 52(5): 803–18.

References

1. Mitrofanov V.A., Zhadenov I.I., Puchinyan D.M. Osteoarthritis: risk factors, pathogenesis and modern therapy. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2008; 2(20): 23-30. (in Russian)
2. Allen K.D., Golightly Y.M. Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence. *Current opinion in rheumatology*. 2015; 27(3): 276-83.
3. Anders S, Wiech O, Schaumburger J, et al. Autologous Matrix induced chondrogenesis (AMIC) for focal chondral defects of the knee — first results. *J Bone Joint Surg Br*. 2009; 91(Suppl.1): 83–7.
4. Murin D.V., Voloshin V.P., Kazantseva I.A., Bezuglova T.V., Gagaganov L.E. Morphological changes when using the Chondro Gide collagen membrane and knee joint autochondroplasty. *Collection of articles of the XI Congress of the Russian Arthroscopic Society, dedicated to the 130th anniversary of the birth of Academician N.N. Priorov. [Morfologicheskie izmeneniya pri ispol'zovanii kollagenovoy membrany Chondro Gide i avtokhondroplastiki kolennogo sustava. Sbornik statey XI Kongressa Rossiyskogo Artroskopicheskogo Obshchestva, posvyashchennogo 130-letiyu so dnya rozhdeniya akademika N.N. Priorova]*. Moscow, 22-25 / 04/2015, 58-9. (in Russian)
5. Fontana A. A novel technique for treating cartilage defects in the hip: a fully arthroscopic approach to using autologous matrix-induced chondrogenesis. *Arthroscopy Techniques*. 2012; 1(1): e63-8.
6. Lazishvili G.D., Zatikyan V.R., Shukyr-Zadeh E.R., Kornayev A.S., Akmatayev K.I., Danilov M.A. Actual Directions of Chondroplasty. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2013; 3: 13-7. (in Russian)
7. Hubutija M.Sh., Klyukvin I.Yu., Istranov L.P., Khvatov V.B., Shekhter A.B., Vaza A.Yu., Kanakov I.V., Bocharova V.S. Stimulation of the hyaline cartilage regeneration in osteochondral injury in the experiment. *Bull. Experimental. Biologii and Meditsine*. 2008; 146(11): 597-600. (in Russian)
8. Van den Borne M.P., Raijmakers N.J., Vanlauwe J., Victor J., de Jong S.N., Bellemans J. et al. International Cartilage Repair Society. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007; 15(12): 1397-402.
9. McCoy A.M., Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Veterinary Pathology*. 2015; 52(5): 803–18.

Сведения об авторах:

Афанасьевская Е.В., ординатор, лаб. регенерации скелетных тканей, ИРМ, (Сеченовский Университет);

Медведева Е.В., канд. биол. наук, зам. зав. лаб. регенерации скелетных тканей, ИРМ, (Сеченовский Университет);

Газимиева Б.М., ординатор, лаб. регенерации скелетных тканей, ИРМ, (Сеченовский Университет);

Куренкова А.Д., канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. регенерации скелетных тканей, ИРМ, (Сеченовский Университет);

Кытько О.В., канд. мед. наук, доцент каф. оперативной хирургии и топографической анатомии, ИКМ, (Сеченовский Университет);

Панюшкин П.В., канд. мед. наук, доцент каф. оперативной хирургии и топографической анатомии, ИКМ, (Сеченовский Университет);

Истранов Л.П., доктор фарм. наук, проф., гл. науч. сотр. отдела современных биоматериалов, ИРМ, (Сеченовский Университет);

Истранова Е.В., канд. фарм. наук, вед. науч. сотр. отдела современных биоматериалов, ИРМ, (Сеченовский Университет);

Шехтер А.Б., доктор мед. наук, проф., зав. лаб. экспериментальной морфологии, ИРМ, (Сеченовский Университет);

Лычагин А.В., доктор мед. наук, проф., зав. каф. травматологии, ортопедии и хирургии катастроф, ИКМ, (Сеченовский Университет);

Чагин А.С., PhD, проф., зав. лаб. регенерации скелетных тканей, ИРМ, (Сеченовский Университет);

Тельпухов В.И., доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. регенерации скелетных тканей ИРМ, проф. каф. оперативной хирургии и топографической анатомии ИКМ, (Сеченовский Университет), e-mail: telpuhov@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-006.04+612.085.2

Касатова А.И.¹⁻³, Каныгин В.В.², Разумов И.А.^{2,4}, Таскаев С.Ю.^{2,3}, Касатов Д.А.^{2,3}, Бывальцев В.А.^{1,5}

Исследование биологической эффективности бор-нейтронозахватной терапии на клетках глиомы и меланомы человека

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

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», 630090, г. Новосибирск, Россия, ул. Пирогова, д. 2;

³ФГБНУ «Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера» СО РАН, 630090, г. Новосибирск, Россия, проспект академика Лаврентьева, д. 11;

⁴ФГБНУ ФИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН, 630090, г. Новосибирск, Россия, проспект академика Лаврентьева, д. 10;

⁵НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский», 664082, г. Иркутск, Россия, ул. Боткина, д. 10

Введение. Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) является перспективной экспериментальной методикой лечения онкологических заболеваний. По данным клинических исследований пациентов с глиобластомой и меланомой, леченных БНЗТ на ядерных реакторах, отмечены рост медианы выживаемости и улучшение качества жизни. Для получения эпитепловых нейтронов ведется разработка новых источников на основе ускорителей заряженных частиц. Один из проектов был реализован в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, достигнутые параметры пучка позволяют проводить доклинические исследования.

Цель работы – выявление на клеточных линиях глиомы и меланомы зависимости эффективности БНЗТ от концентрации бора при использовании пучка, генерируемого на источнике эпитепловых нейтронов ускорительного типа Института ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН и оценка перспектив использования этого источника эпитепловых нейтронов для дальнейших клинических исследований.

Методика. Клеточные линии U251 (глиома) и SK-Mel28 (меланома) опухолей человека инкубировали с добавлением в ростовую среду различных концентраций бора, используя препарат борфенилаланин, в течение 24 ч, затем облучали потоком нейтронов. Измерение концентрации изотопа бора ¹⁰B в опухолевых клетках проводили на атомно-эмиссионном спектрометре ICPE-9820 (Shimadzu, Япония). Клоногенный тест использовали для оценки влияния бор-нейтронозахватной терапии на клетки глиомы и меланомы.

Результаты. Анализ данных БНЗТ показал, что колониеобразующие свойства облученных клеток глиомы и меланомы уменьшались с повышением концентрации бора. Так, по мере накопления бора линией SK-Mel28 увеличивается количество погибших клеток после облучения, а концентрация ¹⁰B 25 мкг/мл обеспечивает летальную дозу для 100% клеток (LD100). Глиальная линия накапливает бор менее интенсивно и гибель 100% клеток происходит при концентрации ¹⁰B 50 мкг/мл. В образцах, облученных без бора, в сравнении с контролем также наблюдалось снижение выживаемости клеток из-за присутствия быстрых нейтронов и гамма-излучения.

Заключение. Данные экспериментов *in vitro* доказывают эффективность действия бор-нейтронозахватной терапии на клетки глиомы и меланомы при использовании источника эпитепловых нейтронов ускорительного типа ИЯФ СО РАН и борфенилаланина как агента доставки бора с концентрацией ¹⁰B 6,25-50 мкг/мл, а также перспективность использования данного метода в лечении таких опухолей, как глиома и меланома.

Ключевые слова: бор-нейтронозахватная терапия; источник эпитепловых нейтронов; борфенилаланин; клеточные линии; клоногенный тест.

Для цитирования: Касатова А.И., Каныгин В.В., Разумов И.А., Таскаев С.Ю., Касатов Д.А., Бывальцев В.А. Исследование биологической эффективности бор-нейтронозахватной терапии на клетках глиомы и меланомы человека *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(3): 110-116.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.110-116

Для корреспонденции: Касатова Анна Исмагиловна, e-mail: yarullinaai@yahoo.com

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Каныгин В.В., Бывальцев В.А.; сбор и обработка материала – Разумов И.А., Таскаев С.Ю., Касатова А.И., Касатов Д.А.; статистическая обработка – Касатова А.И., Касатов Д.А.; написание текста – Касатова А.И., Касатов Д.А.; редактирование – Каныгин В.В., Разумов И.А., Таскаев С.Ю., Бывальцев В.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ № 19-72-30005 (облучение клеточных культур потоком нейтронов и измерение концентрации изотопа бора на атомно-эмиссионном спектрометре) и гранта РФФИ № 18-29-01007 (закупка сред и расходных материалов для *in vitro* исследований) с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность А.Н. Макарову, И.М. Щудло, Я.А. Колесникову, Е.О. Соколовой, А.М. Кошкареву, Т.А. Быкову за обеспечение генерации нейтронов, Т.В. Сычевой за проведение расчетов поглощенной дозы.

Поступила 30.04.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликовано 21.08.2020

Kasatova A.I.¹⁻³, Kanygin V.V.², Razumov I.A.^{2,4}, Taskaev S.Yu.^{2,3}, Kasatov D.A.^{2,3} Byvaltsev V.A.^{1,5}

Biological effectiveness of boron neutron capture therapy in human glioma and melanoma cells

¹Irkutsk State Medical University, Krasnogo Vosstaniya Str. 1, Irkutsk 664003, Russia;

²Novosibirsk State University, Pirogova Str. 2, Novosibirsk 630090, Russia;

³G.I. Budker Institute of Nuclear Physics, Prospekt Akademika Lavrentieva 11, Novosibirsk 630090, Russia;

⁴Institute of Cytology and Genetics, Prospekt Akademika Lavrentieva 10, Novosibirsk 630090, Russia;

⁵Railway Clinical Hospital on the Irkutsk-Passazhirskiy Station, Botkina Str. 10, Irkutsk 664082, Russia

Boron neutron capture therapy (BNCT) is a promising experimental method for the treatment of oncological diseases. According to results of clinical trials, patients with glioblastoma and melanoma treated with BNCT at nuclear reactors showed an increase in median overall survival and an improvement in quality of life. To obtain epithermal neutrons, new sources based on charged particle accelerators are being developed. One of the projects was implemented at the G.I. Budker Institute of Nuclear Physics, and the obtained beam parameters allowed conducting preclinical experiments.

The aims were to identify the dependence of the effectiveness of BNCT in glioma and melanoma cell lines on boron concentrations using a beam generated at the accelerator based epithermal neutron source in the G.I. Budker Institute of Nuclear Physics and to evaluate prospects for using this epithermal neutron source for further clinical research.

Methods. The U251 glioma cell line and the SK-Mel28 melanoma cell line were incubated with various concentrations of boronophenylalanine added to the growth medium for 24 hours and then irradiated with a neutron flux. The ^{10}B accumulation in tumor cells was measured with an ICPE-9820 atomic emission spectrometer (Shimadzu, Japan). The effect of BNCT on glioma and melanoma cells was evaluated by the colony forming assay.

Results. Analysis of the BNCT experimental data showed that the colony-forming capabilities of irradiated glioma and melanoma cells decreased in proportion to the increase in boron concentration. Thus, increasing accumulation of boron by SK-Mel 28 cells provided a greater number of dead cells with irradiation at a concentration of 10^8 of 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ being a lethal dose for 100% of the cells (LD100). The glial cell line accumulated boron less intensively; death of 100% of cells occurred at a 10^8 concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In samples irradiated without boron, the number of colonies was also decreased compared to the control due to the presence of fast neutrons and gamma-radiation components. All differences between the control and the experiment were statistically significant ($p < 0.05$ for all).

Conclusion. The results of the *in vitro* experiments demonstrated the effectiveness of BNCT in glioma and melanoma cell lines with the use of accelerator based epithermal neutron source in BINP and boronophenylalanine as a boron delivery agent at 10^8 concentrations of 6.25-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Furthermore, this method proved promising for the treatment of tumors, such as glioma and melanoma.

Keywords: boron neutron capture therapy; accelerator based epithermal neutron source; boronophenylalanine; cell lines; colony forming assay.

For citation: Kasatova A.I., Kanygin V.V., Razumov I.A., Taskaev S.Yu., Kasatov D.A., Byvaltsev V.A. Biological effectiveness of boron neutron capture therapy in human glioma and melanoma cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 110-116. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.110-116.

For correspondence: Anna I. Kasatova, e-mail: yarullinaai@yahoo.com

Contribution: research concept and design – Kanygin V.V., Byvaltsev V.A.; material collecting and processing – Razumov I.A., Taskaev S.Yu., Kasatova A.I., Kasatov D.A.; statistical processing – Kasatova A.I., Kasatov D.A.; writing text – Kasatova A.I., Kasatov D.A.; text editing – Kanygin V.V., Razumov I.A., Taskaev S.Yu., Byvaltsev V.A. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgments. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant #19-72-30005 (irradiation of cell cultures with a neutron flux and measurement of the isotope concentration on an atomic emission spectrometer) and the Russian Foundation for Basic Research, grant #18-29-01007 (purchasing media and supplies for *in vitro* studies). The use of equipment at the “Center for Genetic Resources of Laboratory Animals” Core Facility of the Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, was supported by the Ministry of Education and Science of Russia (Project Unique ID: RFMEFI62117X0015).

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

Gratitude. The authors thank A.N. Makarov, I.M. Shchudlo, Ya.A. Kolesnikov, E.O. Sokolova, A.M. Koshkarev, and T.A. Bykov for providing neutron generation and T.V. Sycheva for calculation of absorbed doses.

Information about the authors:

Kasatova A.I., <https://orcid.org/0000-0002-6641-9344>

Kanygin V.V., <https://orcid.org/0000-0002-9220-8663>

Razumov I.A., <https://orcid.org/0000-0002-6756-1457>

Taskaev S.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5313-2563>

Kasatov D.A., <https://orcid.org/0000-0001-5649-524X>

Byvaltsev V.A., <https://orcid.org/0000-0003-4349-7101>

Received 30.04.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) — это перспективная экспериментальная методика лечения онкологических заболеваний [1]. Методика основана на эффективном захвате нейтрона ядром изотопа ^{10}B , в результате чего в 94% случаев образуются высокоэнергетические α -частица, атомное ядро лития и γ -квант с суммарной энергией 2,79 МэВ. В 6% случаев энергия реакции распределяется только между α -частицей и атомным ядром лития. Длина пробега частиц составляет от 5 до 10 мк, разрушение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и органелл происходит преимущественно в пределах клетки-мишени, не распространяясь на окружающие здоровые ткани мозга [2]. Лежащая в основе бор-нейтронозахватной терапии локальная ядерная реакция не имеет аналогов по селективности воздействия на клеточные структуры.

Глиома и меланома человека представляют собой наиболее распространенные злокачественные новообразования с низким значением медианы выживаемости пациентов. Эти опухоли агрессивны, склонны к рецидиву и плохо поддаются лечению по стандартным протоколам. Применение БНЗТ у таких больных продемонстрировало обнадеживающие результаты. По данным клинических исследований, осуществленных проф. Т. Ямомото в Японии на реакторе JRR-4, после БНЗТ у пациентов с глиобластомой отмечены рост медианы выживаемости и улучшение качества жизни [3]. В университете Кобэ этим методом пролечено 24 пациента с различными гистологическими типами меланом. При этом локальный контроль над опухолью достигнут в 60% случаев, а общая 5-летняя выживаемость составила 75% при первичных меланомах [4]. Подавляющее большинство клинических работ по БНЗТ было проведено на ядерных реакторах. Однако их использование влечет за собой высокую стоимость исследования, невозможность проведения работ в общеклинических условиях, а также имеет потенциальную опасность радиационной

катастрофы. В настоящее время клинические исследования в области БНЗТ в большинстве стран приостановлены. Альтернативным направлением получения эпитепловых нейтронов с характеристиками, позволяющими их использовать в клинике, является создание источников на основе ускорителей заряженных частиц. Они компактны, допустимо их размещение на территории лечебных центров, их эксплуатация дешевле и безопаснее, а главное — физические характеристики генерируемого пучка нейтронов оптимизированы для проведения БНЗТ. Источник эпитепловых нейтронов ускорительного типа сконструирован в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН (ИЯФ СО РАН) [5]. Достигнутые к настоящему времени параметры пучка позволяют проводить доклинические исследования [6]. Вместе с тем работы по увеличению тока протонного пучка [7, 8] и обеспечению стабильной генерации эпитепловых нейтронов на источнике продолжаются [9, 10].

Цель исследования — выявление зависимости эффективного проведения БНЗТ на клеточных линиях глиомы и меланомы от концентрации бора при использовании пучка, генерируемого на источнике эпитепловых нейтронов ускорительного типа ИЯФ СО РАН и оценка перспектив использования этого источника эпитепловых нейтронов для дальнейших клинических исследований.

В этой связи после проведения БНЗТ оценивали зависимость выживаемости клеток линий U251 и SK-Mel28 от накопления в них ^{10}B . Указанные клеточные линии глиомы и меланомы человека были выбраны потому, что пациенты с одноименными опухолями прошли успешное лечение методом БНЗТ на реакторах [11–13]. Так, БНЗТ, проведенная на японском реакторе JRR-4, увеличила среднюю продолжительность жизни пациентов до 25,7 мес (18 мес для стандартной терапии), а 2-летняя выживаемость составила 45,5% [11].

Методика

В исследовании использовали клеточные линии меланомы человека: U251 – глиома (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) и SK-Mel28 – меланома (ЦКП Центр генетических ресурсов лабораторных животных, SPF-виварий, ИЦИГ СО РАН, Новосибирск). Клетки культивировали на среде EMEM (Sigma, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma, США) в CO₂-инкубаторе 37 °C и 5% CO₂. Клетки пересеивали, используя раствор трипсин-версена 2-3 раза в неделю в соотношении 1:3 – 1:5.

В качестве агента адресной доставки бора использовали борфенилаланин (БФА), обогащенный изотопом ¹⁰B (более 99,5% ¹⁰B, Katchem, Чехия). Для приготовления раствора борфенилаланина применяли фруктозу в молярном избытке (БФА-Ф) [14]. Концентрация раствора изотопа ¹⁰B составляла 1,5 мг/мл. Ранее было показано, что максимальное накопление бора клетками происходит через 24 ч с начала инкубации с борфенилаланином [16], поэтому в данном исследовании этот период инкубации выбран как оптимальный.

Клеточные линии инкубировали в культуральных флаконах (Jet Biofil, Китай, площадь ростовой поверхности 25 см²), по 3 флакона на каждую группу в течение 24 ч, в логарифмической фазе роста среду заменяли на среду, содержащую ¹⁰B. Концентрация ¹⁰B в среде составила в различных экспериментальных группах 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл. Клетки с препаратом, содержащим ¹⁰B, инкубировали в течение 24 ч (контрольные образцы культивировали без препарата бора). Затем все группы клеток снимали трипсином, центрифугировали и переносили в среде без бора в объеме 1,5 мл в полипропиленовые криопробирки [15] для удобства расположения в фантоме.

Облучение проводили на ускорительном источнике эпитепловых нейтронов в ИЯФ СО РАН [6], обеспечивающем поток нейтронов в оптимальном для БНЗТ энергетическом диапазоне (от 1 до 30 кэВ [5]) с плотностью $3 \times 10^8 \text{ см}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Вклад гамма-излучения в поглощенную дозу зависит от концентрации бора: от 70% при отсутствии бора в клетках до 10% при концентрации ¹⁰B 50 мкг/мл. Облучение проводили, как было описано ранее [16].

Расчеты показывают, что при токе протонов и при концентрации ¹⁰B 50 мкг/мл мощность поглощенной дозы составляет 9,6 Гр (ОБЭ), при этом вклад дозы продуктов реакции ¹⁰B(n, α)⁷Li составляет 85%. При концентрации бора 25 мкг/мл мощность дозы равна 5,7 Гр (ОБЭ) (вклад дозы продуктов реакции ¹⁰B(n, α)⁷Li – 70%), при 12,5 мкг/мл – 3,7 Гр (ОБЭ) (вклад дозы продуктов реакции ¹⁰B(n, α)⁷Li – 54%), при 6,25 мкг/мл – 2,7 Гр (ОБЭ) (вклад дозы продуктов реакции ¹⁰B(n, α)⁷Li – 36%).

Коэффициент СБЕ для реакции ¹⁰B(n, α)⁷Li брали равным 3,8 для опухолевой ткани и 1,3 для здоровой; ОБЭ для нейтронов принимали 3,2, для гамма-излучения – 1,0 [1]. В расчёте были получены следующие физические величины мощности поглощенной дозы (Гр/с) компонентов излучения (табл. 1).

Клоногенный тест. Концентрацию клеток в облученной суспензии подсчитывали при помощи камеры Горяева и микроскопа Zeiss Primo Vert (Германия). Облученные и контрольные группы клеток высевали по 200 клеток на лунку 6-луночного культурального планшета. При посеве было выполнено по 3 повтора для каждой экспериментальной точки, что в итоге составило по 9 повторов на каждую группу и является достаточным для оценки статистической значимости полученных результатов [17].

Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °C, в течение 9–10 сут в зависимости от линии. При подсчете учитывали только те колонии, которые содержали более 50 клеток [17]. Колонии фиксировали 10% формалином (Panreac AppliChem, Германия) и окрашивали кристаллическим фиолетовым 1% (Sigma, США), затем подсчитывали их количество. Долю выживших клеток в экспериментальных точках рассчитывали с учетом выживаемости в контроле.

Определение накопления бора. Клетки линий U251 и SK-Mel28 инкубировали вышеописанным способом: опытные группы с борфенилаланином, контрольные без добавления препарата. Затем клетки отмывали от препарата при помощи трипсин-версена и проводили подсчет их количества в каждом образце. Подготовку проб осуществляли методом мокрого озоления при помощи концентрированной азотной кислоты. Поглощение бора клетками измеряли на атомно-эмиссионном спектрометре ICPE-9820 (Shimadzu, Япония).

Таблица 1

Вклад в дозу различных компонентов нейтронного пучка

Тепловые нейтроны, Гр/с	Быстрые нейтроны, Гр/с	Продукты реакции ¹⁰ B(n, α) ⁷ Li (Гр/с) при 1 ppm ¹⁰ B	Гамма-излучение, Гр/с
4,5·10 ⁻⁵	5,57·10 ⁻⁵	2,18·10 ⁻⁵	5,5·10 ⁻⁴

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010 и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартное отклонение. Используемый уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В эксперименте было проведено облучение нейтронами в присутствии ^{10}B с концентрациями 0–50 мкг/мл 2 опухолевых клеточных линий человека: глиомы U251 и меланомы SK-Mel28. Данные клоногенного анализа позволили оценить влияние нейтронного потока на эти линии клеток как в присутствии изотопа ^{10}B , так и без него.

На рис. 1 представлены данные изменения выживаемости клеток U251 (а) и SK-Mel28 (б) после воздействия нейтронов в зависимости от концентрации ^{10}B . Видно, что увеличение концентрации борфенилаланина с последующим облучением клеток пучком нейтронов приводит к уменьшению их выживаемости. Это может быть связано с увеличением количества атомов бора в клетках, а, следовательно, с увеличением количества нейтронозахватных событий, в результате которых образуются α -частицы и атомные ядра лития с высокой ЛПЭ (линейной передачей энергии).

При облучении клеток U251 (рис. 1, а) и SK-Mel28 (рис. 1, б), инкубированных с бором с концентрацией ^{10}B 6,25 мкг/мл, доля выживших клеток уменьшилась в 10 раз. При взаимодействии клеток глиомы, содержащих 25 мкг/мл бора с пучком нейтронов, доля выживших клеток U251 составляет лишь 1,5 %, то есть происходит уменьшение количества колоний в 67 раз в сравнении с контролем без облучения. Клетки мела-

номы, инкубированные с борфенилаланином с концентрацией ^{10}B 25 мкг/мл, не образовали ни одной колонии. Выживаемость клеток в образцах без препарата борфенилаланина, которые были также облучены, составила 44 % для линии меланомы и 40% для глиомы. Уменьшение выживаемости клеток без бора связано с полученной ими дозы следующих компонент ионизирующего излучения, неизбежно присутствующих в терапевтическом пучке нейтронов: гамма-излучения, испускаемого из мишени в результате взаимодействия протонов с литием, гамма-излучения, испускаемого при поглощении тепловых нейтронов атомными ядрами водорода, протонов отдачи, возникающих в результате поглощения тепловых нейтронов атомными ядрами азота, и протонов отдачи, возникающих в процессе упругого рассеяния быстрых нейтронов, преимущественно на атомных ядрах водорода. Похожие результаты получили ученые на реакторе XAPR: доля выживших клеток глиальных линий составила менее 0,01% после бор-нейтронозахватной терапии с борфенилаланином при поглощенной дозе 4–8 Гр (ОБЭ) [18]. На ядерном реакторе RA-3 в Аргентине была проведена БНЗТ на 2 линиях меланомы и оценена выживаемость клеток при помощи клоногенного теста. При поглощенной дозе 8 Гр (ОБЭ) и концентрации ^{10}B 10 мкг/мл фракция выживших клеток составила менее 1% [12].

Измерение концентрации бора *in vitro* выявило различное накопление борфенилаланина каждой клеточной линией (рис. 2). Поглощение ^{10}B клетками линии U251, инкубированными с препаратом борфенилаланин с концентрацией ^{10}B 6,25 мкг/мл в течение 24 ч, составило 0,438 мкг/ 10^7 клеток, а линии SK-Mel28 – 0,155 мкг/ 10^7 клеток. При инкубации с борфенилаланином с

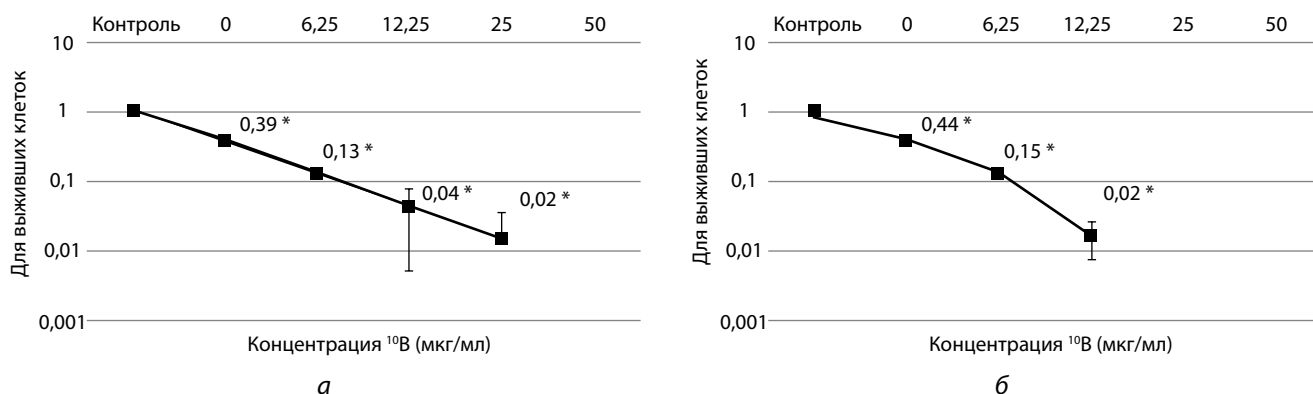


Рис. 1. Выживаемость клеток U251 (а) и SK-Mel28 (б) после воздействия нейтронов в зависимости от концентрации ^{10}B (* значимое отличие от контроля).

концентрацией ^{10}B 25 мкг/мл накопление ^{10}B клетками U251 составило 0,895 мкг/10⁷ клеток, а для SK-Mel28 — 1,309 мкг/10⁷ клеток. Эти данные свидетельствуют о лучшем поглощении и накоплении борфенилаланина клетками меланомы, чем клетками глиомы. Другие исследователи также оценивали накопление бора линиями меланомы, которые инкубировали с борфенилаланином в концентрации ^{10}B 50 мкг/мл. Концентрация ^{10}B составила 1,19–1,09 мкг/10⁷ клеток [14].

В исследовании Ёшида и соавторов, проведенном на клеточных линиях крысиной глиомы и мышинной саркомы, накопление бора через 24 ч после начала инкубации с борфенилаланином в концентрации ^{10}B 60 мкг/мл составило 2,5 мкг/10⁷ клеток для глиальной линии и 1,5 — для линии мышинной саркомы [19].

Таким образом, обе линии клеток, U251 и SK-Mel28 отвечают на БНЗТ снижением колониеобразующей способности, в особенности линия меланомы, которая накапливает бор в большей концентрации. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что увеличение накопления ^{10}B клетками с последующим облучением нейтронами приводит к снижению выживаемости клеточных культур, подвергнутых БНЗТ, с увеличением количества накапливаемого ^{10}B , т. е. отчетливо проявляется зависимость доза–эффект.

Ранее была доказана безопасность борфенилаланина *in vitro* при использовании в концентрациях, представленных в настоящей работе. О.Ю. Волкова и соавторы показали, что добавление борфенилаланина в ростовую среду в концентрации 100 ppm ^{10}B не влияет на эффективность колониеобразования клеток гли-

альных линий [15]. Это подтверждает, что полученный эффект вызван именно взаимодействием нейтронов с ядрами ^{10}B , а не с токсическим действием препарата.

Заключение

Бор-нейтронозахватная терапия является перспективным методом лечения пациентов с агрессивными, рецидивирующими опухолями. Несмотря на положительный результат, в настоящее время БНЗТ пациентов официально не проводится ни на реакторах, ни на разрабатываемых ускорителях. В России данный вид терапии ранее на практике не применялся. Сегодня появилась возможность проводить доклинические испытания для подтверждения эффективности и безопасности БНЗТ в присутствии конкретного пучка эпитепловых нейтронов, полученного на источнике ускорительного типа в ИЯФ СО РАН.

Учитывая уникальность ускорителя и дефицит прямой экспериментальной информации о характере и свойствах биологических эффектов генерируемого пучка, ценными данными в исследовании явились показатели снижения колониеобразования в облученном контроле клеток, не содержащих ^{10}B . Наличие различий в выживаемости клеток, облученных без бора и с бором, доказывает присутствие в спектре пучка составляющей тепловых нейтронов, достаточной для получения объективных свидетельств биологических эффектов бор-нейтронозахватных событий. Нарастание цитотоксических эффектов облучения с увеличением содержания внутриклеточного бора при облучении на ускорителе практически демонстрирует не только классические биологические эффекты бор-нейтронозахватных событий реакции $^{10}\text{B} (n, \alpha)^7\text{Li}$, их концентрационную зависимость, но и возможность дифференцированного подхода в экспериментах *in vitro* в отношении подбора и изменения поглощенных доз. При этом выявленные различия в накоплении бора клетками опухолей различных гистологических типов требуют при разработке рекомендательных протоколов как учета дозозависимой специфики накопления ^{10}B , так и проведения дополнительных экспериментов *in vivo*.

Литература

(п.п. 1-4; 9; 11-14; 17-19 см. References)

- Таскаев С. Ю. Ускорительный источник эпитепловых нейтронов. *Физика элементарных частиц и атомного ядра*. 2015; 46 (6): 1770-830.
- Иванов А.А., Касатов Д.А., Кошкарёв А.М., Макаров А.Н., Остринов Ю.М., Сорокин И.Н. и др. Получение протонного пучка с током 5 мА в ускорителе-тандеме с вакуумной изоляцией. *Письма в ЖТФ*. 2016; 42(12): 1-8.

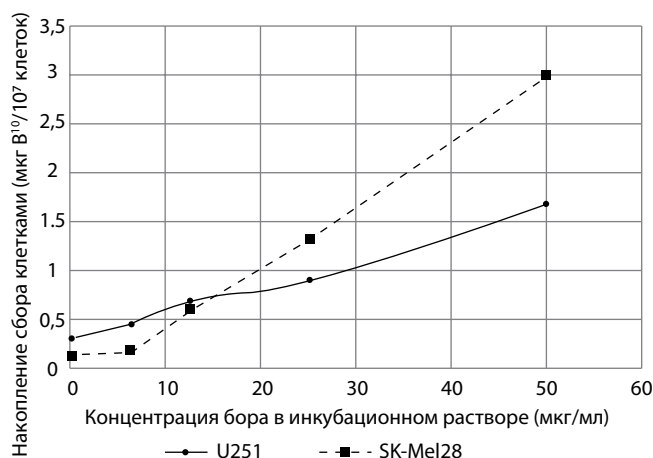


Рис. 2. Накопление ^{10}B клетками глиомы и меланомы после инкубации в течение 24 ч с борфенилаланином.

7. Быков Т.А., Касатов Д.А., Колесников Я.А., Кошкарёв А.М., Макаров А.Н., Остреинов Ю.М., и др. Измерение проволочным сканером пучка отрицательных ионов водорода, инъецируемого в ускоритель-тандем с вакуумной изоляцией. *Приборы и техника эксперимента*. 2018; 5: 90–5.
8. Заиди Л., Кашаева Е.А., Лежнин С.И., Малышкин Г.Н., Самарин С.И., Сычева Т.В. и др. Система формирования пучка нейтронов для бор-нейтронозахватной терапии. *Ядерная физика*. 2017; 1(80): 63–9.
10. Яруллина А.И., Каныгин В.В., Кичигин А.И., Жданова М.Г., Мухамадияров Р.А., Таскаев С.Ю. Лечение опухолей головного мозга методом бор-нейтронозахватной терапии: трудности и современные решения. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015; 4: 6–11.
15. Волкова О.Ю., Мечетина Л.В., Таранин А.В., Заборонок А.А., Nakai K., Лежнин С.И. и др. Влияние нейтронного излучения на жизнеспособность опухолевых клеток, культивируемых в присутствии изотопа бора ¹⁰B. *Вестник рентгенологии и радиологии*. 2016; 97(5): 283–8.
16. Бывальцев В.А., Завьялов Е.Л., Каныгин В.В., Касатова А.И., Кичигин А.И., Разумов И.А. и др. Цитопатические эффекты бор-нейтронозахватной терапии на ускорительном источнике эпителиальных нейтронов для культуры клеток глиобластомы человека. *Сибирский онкологический журнал*. 2019; 18(4): 34–42. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-4-34-42
7. Bykov T., Kasatov D., Kolesnikov Ya., Koshkarev A., Makarov A., Ostreynov Yu. et al. Use of a Wire Scanner for Measuring a Negative Hydrogen Ion Beam Injected in a Tandem Accelerator with Vacuum Insulation. *Instruments and Experimental Techniques*. 2018; 5: 713–8.
8. Zaidi L., Kashaev E.A., Lezhnin S.I., Malyshekin G.N., Samarin S.I., Sycheva T.V. et al. Neutron-Beam-Shaping Assembly for Boron Neutron-Capture Therapy. *Physics of Atomic Nuclei*. 2017; 80(1): 60–6.
9. Zaidi L., Belgaid M., Taskaev S., Khelifi R. Beam Shaping Assembly Design of ⁷Li(p,n)⁷Be Neutron Source for Boron Neutron Capture Therapy of Deep-seated Tumor. *Applied Radiation and Isotopes*. 2018; 139: 316–24.
10. Yarullina A.I., Kanygin V.V., Kichigin A.I., Zhdanova M.G., Mukhamadiyarov R.A., Taskaev S.Yu. Treatment of brain tumors using boron-neutron capture therapy method: difficulties and modern solutions. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 4: 6–11. (in Russian)
11. Yamamoto T., Nakai K., Tsurubuchi T., Matsuda M., Shirakawa M., Zaboronok A. et al. Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma: a pilot study in Tsukuba. *Appl Radiat Isot*. 2009; 67(7-8): 25–6.
12. Roth B.M., Bonomi M.R., Gonzalez S.J. et al. *BNCT clinical trials of skin melanoma patients in Argentina*. Proceedings of ICNCT-12. Edited by Nakagawa Y., Kobayashi T. and Fukuda H. 2006: 14–7.
13. Byvaltsev V., Kanygin V., Belykh E., Taskaev S. Prospects in Boron Neutron Capture Therapy of Brain Tumors. *World Neurosurgery*. 2012; 78: 8–9.
14. Rossini A.E., Dagrosa M.A., Portu A., Saint Martin G., Thorp S., Casal M. et al. Assessment of biological effectiveness of boron neutron capture therapy in primary and metastatic melanoma cell lines. *Int J Radiat Biol*. 2015; 91(1): 81–9.
15. Volkova O.Yu., Mechetina L.V., Taranin A.V., Zaboronok A.A., Nakai K., Lezhnin S.I. et al. Influence of neutron radiation on the viability of tumor cells cultured in the presence of isotope ¹⁰B. *Vestnik rentgenologii i radiologii*. 2016; 97(5): 283–8. (in Russian)
16. Byvaltsev V.A., Zavjalov E.L., Kanygin V.V., Kasatova A.I., Kichigin A.I., Razumov I.A. et al. Cytopathic effects of boron neutron capture therapy on an accelerator based epithermal neutrons source on human glioblastoma cell culture. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal*. 2019; 18(4): 34–42. DOI: 10/21294/1814-4861-2019-18-4-34-42. (in Russian)
17. Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J, Haveman J., van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006; 1(5): 2315–9.
18. Wang P., Zhen H., Jiang X., Zhang W., Cheng X., Guo G. et al. Boron neutron capture therapy induces apoptosis of glioma cells through Bcl-2/Bax. *BMC Cancer*. 2010; 661.
19. Yoshida F., Matsumura A., Shibata Y. Cell cycle dependence of boron uptake from two boron compounds used for clinical neutron capture therapy. *Cancer Letters*. 2002; 187: 135–41.

References

1. Sauerwein W.A.G., Wittig A., Moss R., Nakagawa Y. *Neutron Capture Therapy: Principles and Applications*. Springer; 2012.
2. Kinashi Y., Takahashi S., Kashino G., Okayasu R., Masunaga S., Suzuki M., Ono K. DNA double-strand break induction in Ku80-deficient CHO cells following boron neutron capture reaction. *Radiat Oncol*. 2011; 6: 106.
3. Yamamoto T., Nakai K., Matsumura A. Boron neutron capture therapy for glioblastoma. *Cancer Letters*. 2008; 262: 143–52.
4. Madoc-Jones H., Zamenhof R., Solares G., Harling O., Yam C-S., Riley K. et al. Atkins A Phase-I Dose-Escalation Trial of Boron Neutron Capture Therapy for Subjects with Metastatic Subcutaneous Melanoma of the Extremities. *Cancer Neutron Capture Therapy*. 1996; 707–16.
5. Taskaev S. Accelerator based epithermal neutron source. *Physics of Particles and Nuclei*. 2015; 46(6): 956–90.
6. Ivanov A., Kasatov D., Koshkarev A., Makarov A., Ostreynov Yu., Sorokin I. et al. Obtaining a Proton Beam with 5-mA Current in a Tandem Accelerator with Vacuum Insulation. *Technical Physics Letters*. 2016; 42(12): 608–11.

Сведения об авторах:

Касатова Анна Исмагиловна, аспирант каф. нейрохирургии ИГМУ, мл. науч. сотр. лаб. МБП БНЗТ НГУ, мл. науч. сотр. ИЯФ СО РАН, e-mail: yarullinaai@yahoo.com;

Каныгин Владимир Владимирович, канд. мед. наук, доцент, зав. лаб. МБП БНЗТ НГУ, e-mail: kanigin@mail.ru;

Разумов Иван Алексеевич, доктор биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. молекулярных механизмов патологических процессов, ИЦИГ СО РАН; МБП БНЗТ НГУ, e-mail: razumov@bionet.nsc.ru;

Таскаев Сергей Юрьевич, доктор физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. ИЯФ СО РАН, зав. лаб. БНЗТ НГУ, e-mail: taskaev@inp.nsk.su;

Касатов Дмитрий Александрович, мл. науч. сотр. ИЯФ СО РАН; лаб. МБП БНЗТ НГУ, e-mail: kasatovd@gmail.com;

Бывальцев Вадим Анатольевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нейрохирургии и инновационной медицины Иркутского государственного медицинского университета, главный нейрохирург Дирекции здравоохранения ОАО РЖД; руководитель Центра нейрохирургии «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Иркутска», e-mail: byval75vadim@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.9

Тучина Т.П., Рогоза О.В., Скотникова К.П., Лебедев Д.А., Грозов Р.В., Бабенко А.Ю., Галагудза М.М.

Морфологические особенности эндокриноцитов поджелудочной железы крыс с сахарным диабетом 2-го типа при разной длительности терапии инкретиномиметиками

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, 197341, г. Санкт-Петербург, Россия, пр. Пархоменко д. 15

Группа препаратов, основанных на инкретиновых эффектах (аналоги глюкагоноподобного пептида-1 агПП1) и ингибиторы дипептидилпептидазы-4, иДПП4), обладают способностью увеличивать репликацию β -клеток и ингибировать апоптоз. Инкретиномиметики способны влиять на функцию α -клеток, восстанавливая физиологическую регуляцию уровня глюкагона. При этом эффекты инкретиномиметиков на пролиферацию/апоптоз α -клеток изучены недостаточно. В единичных исследованиях отмечено увеличение пролиферации α -клеток, но факторы, определяющие выраженность этих изменений, не установлены.

Цель – оценка влияния терапии инкретиномиметиками разной продолжительности на морфологические и функциональные особенности α - и β -клеток поджелудочной железы крыс (12 мес) с сахарным диабетом 2-го типа (СД 2-го типа).

Методика. У крыс (возраст 12 мес), находящихся на высокожировой диете, моделировали стрептозотозин-никотинамид-индуцированный СД 2-го типа. Животные получали инкретиномиметики: агонист рецепторов ГПП1 (лираглутид) или ингибитор ДПП4 (вилдаглиптин) в течение 4, 10 и 24 нед. Макроскопически оценивали наличие/отсутствие видимых изменений поджелудочной железы. Парафиновые срезы поджелудочной железы окрашивали гематоксилином и эозином для оценки микроструктуры ткани. Проводили иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с применением антител (Abcam) к глюкагону, инсулину в аппарате для ИГХ «Thermo Autostainer 720». После процедуры ИГХ ядра доокрашивали гематоксилином в аппарате для окраски гистологических микропрепаратов LeicaST5020.

Результаты. Показано, что без лечения сахарный диабет приводил к снижению числа α - и β -клеток на всех сроках наблюдения. Лечение диабета лираглутидом и вилдаглиптином приводило к восстановлению пула как α -, так и β -клеток. При сравнении групп, получавших терапию и без терапии, с группой контроля значимые отличия сохранялись по количеству как α -, так и β -клеток во все сроки наблюдения. Через 4 нед в группах, получавших лираглутид, количество α -клеток стало сопоставимым с таковым в группе контроля, но количество β -клеток оставалось сниженным. После 10 и 24 нед терапии статистически значимой разницы между группой контроля и животными, получавшими терапию лираглутидом, по количеству как β -, так и α -клеток не выявлено.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что терапия инкретиномиметиками способствует восстановлению пула как α -, так и β -клеток поджелудочной железы.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа; инкретиномиметики; β -клетки; эндокриноциты.

Для цитирования: Тучина Т.П., Рогоза О.В., Скотникова К.П., Лебедев Д.А., Грозов Р.В., Бабенко А.Ю., Галагудза М.М. Морфологические особенности эндокриноцитов поджелудочной железы крыс с сахарным диабетом 2 типа при разной длительности терапии инкретиномиметиками. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 117-125.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.117-125

Для корреспонденции: Тучина Таисия Павловна, e-mail: tayka_91@mail.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Тучина Т.П., Бабенко А.Ю., Галагудза М.М.; сбор и обработка материала – Тучина Т.П., Лебедев Д.А., Скотникова К.П., Рогоза О.В., Грозов Р.В.; статистическая обработка – Тучина Т.П.; написания текста – Тучина Т.П.; редактирование – Бабенко А.Ю., Галагудза М.М. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-75-300-52 от 04.08.2017

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.08.2019

Принято к печати 24.06.2020

Опубликовано 21.08.2020

Tuchina T.P., Rogoza O.V., Skotnikova K.P., Lebedev D.A., Grozov R.V., Babenko A.Yu., Galagudza M.M.¹

Morphological features of pancreatic endocrinocytes in rats with type 2 diabetes mellitus receiving the incretin mimetic therapy of different duration

N. A. Almazov National Medical Research Centre,
Parkhomenko Str. 15, St. Petersburg 197341, Russia

Drugs based on incretin effects, including analogs of glucagon-like peptide-1 (GLP1) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors (DPP4), increase replication and inhibit apoptosis of β -cells. Incretin mimetics can influence the function of α -cells thereby restoring physiological regulation of glucagon. However, effects of incretin mimetics on proliferation and apoptosis of α -cells are understudied. A few studies reported increased α -cell proliferation, but the factors determining the degree of these changes were not established.

Aim. To evaluate the effect of incretin mimetic treatment of different duration on morphological and functional features of pancreatic α - and β -cells of 12-month-old rats with type 2 diabetes mellitus.

Method. Streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes mellitus was modeled in 12-month-old rats receiving a high-fat diet. The rats were treated with incretin mimetics, a GLP-1 receptor antagonist (Liraglutide) or a DPP-4 inhibitor (Vildagliptin) for 4, 10 or 24 weeks. Paraffin sections of the pancreas were stained with hematoxylin-eosin to evaluate the tissue microstructure. An immunohistochemical (IHC) study was performed using glucagon and insulin antibodies (Abcam) with a Thermo Autostainer 720 IHC instrument. After the IHC procedure, nuclei were additionally stained with hematoxylin using a Leica ST5020 stainer for histological micropreparations.

Results. Untreated diabetes mellitus resulted in decreased numbers of α - and β -cells at all timepoints of observation. The treatments with Liraglutide and Vildagliptin recovered the pools of α - and β -cells. Significant differences of both treated and untreated diabetic groups from the control group in the number of α - and β -cells remained at all timepoints of observation. In the Liraglutide group at 4 weeks, the number of α -cells became comparable with the control group, but the number of β -cells remained lower. At 10 and 24 weeks of treatment, statistically significant differences between the control group and the Liraglutide or Vildagliptin treatment groups in the number of α - and β -cells were not observed.

Conclusion. The results of the study suggested that the incretin mimetic therapy provided recovery of both α and β -cell pools in the pancreas.

Keywords: diabetes mellitus type 2; incretin mimetics; β -cells; endocrinocytes.

For citation: Tuchina T.P., Rogoza O.V., Skotnikova K.P., Lebedev D. A., Grozov R.V., Babenko A.Yu., Galagudza M.M. Morphological features of pancreatic endocrinocytes in rats with type 2 diabetes mellitus receiving the incretin mimetic therapy of different duration. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 117-125. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.117-125

For correspondence: *Taisiya P. Tuchina*, PhD of Department of Internal Medicine of the National Almazov Medical Research Centre, 197341, Parkhomenko d., 15, St-Petersburg, Russian Federation, e-mail: tayka_91@mail.ru

Contribution: research concept and design – Tuchina T.P., Babenko A.Yu., Galagudza M.M.; material collecting and processing – Tuchina T.P., Lebedev D.A., Skotnikova K.P., Grozov R.V., Rogoza, O.V.; statistical processing of results – Tuchina T.P.; writing text – Tuchina T.P.; text editing – Babenko A.Yu., Galagudza M.M. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgment. The work was supported by Russian Science Foundation Grant 17-75-300-52 from 04.08.2017.

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

Information about the authors:

Tuchina T.P., <https://orcid.org/0000-0003-0994-8650>

Rogoza O.V., <https://orcid.org/0000-0002-5258-5317>

Skotnikova K.P., <https://orcid.org/0000-0002-7883-5951>

Lebedev D.A., <https://orcid.org/0000-0003-1808-1331>

Grozov R.V., <https://orcid.org/0000-0001-8016-7692>

Babenko A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0559-697X>

Galagudza M.M., <https://orcid.org/0000-0001-5129-9944>

Received 23.08.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

В настоящее время поиск оптимальной терапии сахарного диабета 2-го типа (СД 2-го типа) и его осложнений становится все более актуальным, так как численность пациентов неуклонно растет [1]. Извест-

но, что физиологическое количество β -клеток поддерживается равновесием процессов апоптоза и пролиферации [2, 3]. По мере увеличения продолжительности течения СД 2-го типа происходит

прогрессирующая потеря β -клеток [4–6]. Складывается впечатление, что факторы, способствующие развитию β -клеточной недостаточности (пожилой возраст, длительное течение СД 2-го типа, терапия препаратами сульфонилмочевины), усиливают также и нарушение глюкагонового ответа, однако работы по изучению состояния α -клеток поджелудочной железы в зависимости от вышеперечисленных факторов крайне немногочисленны [7,8].

В этом контексте препараты, влияющие на инкретиновый баланс, – агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (аГПП1) и ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (идПП4), привлекают особое внимание. По данным литературы, эти препараты способны увеличивать репликацию β -клеток и ингибировать их апоптоз [9, 10]. Данные свойства инкретиномиметиков дают основания полагать, что они могут не только улучшать функцию оставшихся β -клеток, но и стимулировать образование новых β -клеток у больных СД 2-го типа [11]. Помимо эффектов на β -клетки, препараты аГПП1 и идПП4 способны оказывать влияние и на α -клетки, восстанавливая физиологическую регуляцию уровня глюкагона. При этом в единичных исследованиях показано увеличение пролиферации не только β -клеток, но и α -клеток [12]. Имеющиеся в настоящее время клинические исследования не смогли дать четкого ответа на вопрос о том, возрастает ли риск развития клинически значимой гиперплазии α -клеток. Это обусловлено тем, что длительность имеющихся исследований не превышает 5 лет, а факторы, повышающие риск неблагоприятных изменений, в частности пожилой возраст, обычно являются критерием исключения. Экспериментальные исследования дают возможность оценки эффекта данных препаратов в условиях, трудно реализуемых в клинических исследованиях: длительность непрерывной терапии (10 лет и более), возраст включенных в эксперимент животных, соответствующий пожилому возрасту человека, тщательная морфологическая и иммуногистохимическая (ИГХ) оценка морфофункциональных особенностей поджелудочной железы. В связи с этим было запланировано экспериментальное исследование по изучению влияния длительной терапии инкретиномиметиками на процессы пролиферации и апоптоза α - и β -клеток поджелудочной железы. Особенность исследования состоит еще в том, что в эксперимент включались только животные старше 1 года, что позволило в наибольшей степени достичь соответствия реальному возрасту продолжительности течения СД 2-го типа пациентов в клинике.

Цель исследования – оценка влияния терапии инкретиномиметиками разной продолжительности на

морфологические и функциональные особенности α - и β -клеток поджелудочной железы крыс (12 мес) с сахарным диабетом 2-го типа.

Методика

Все эксперименты проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (Публикация национального института здоровья, США №85-23). Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» МЗ России.

В эксперимент включались белые крысы-самцы Wistar. До моделирования СД 2-го типа животные в течение 5 нед получали высокожировую диету с добавлением говяжьего сала (итоговая общая калорийность 450 ккал/100 г). По достижении животными возраста 12 мес моделировали стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный СД 2-го типа. Стрептозотоцин вводили однократно интраперитонеально (65 мг/кг в 0,9% растворе хлорида натрия) с предварительным (за 15 мин до инъекции) введением никотинамида (интраперитонеально 230 мг/кг в 0,9% растворе хлорида натрия) [13]. Через 1 нед после моделирования диабета с помощью глюкозо-толерантного теста (ГТТ) диагностировали СД 2-го типа. ГТТ проводили натощак, через зонд животное получало 40% раствор глюкозы (3 мг/кг). Уровень глюкозы крови измеряли (глюкометр «One touche ultra» (Johnson and Johnson, USA) натощак, через 1 и 2 ч после сахарной нагрузки. Критерием для включения в эксперимент был уровень глюкозы крови более 9 ммоль/л через 2 ч для всех групп, кроме группы контроля. В течение 4 нед после индукции диабета крысы содержались без терапии, после чего получали препараты согласно сформированным 4 экспериментальным группам (рис. 1).

В эксперимент было включено 60 крыс. Каждая группа включала 15 животных: контроль (1-я группа интактных животных), группа СД-2-го типа (2-я группа с СД без терапии), 3-я группа (аГПП1) в качестве терапии получала лираглутид (агонист рецепторов глюкагоноподобного пептида-1), 0,2 мкг/кг и 4-я группа (идПП4) получала вилдаглиптин (ингибитор дипептидилпептидазы-4), 1,5 мг/кг.

Эксперимент продолжался 24 нед. Материал для иммуногистохимического исследования структуры поджелудочной железы брали на 4-, 10- и 24-й нед эксперимента по 5 животных из каждой группы. Взятие материала поджелудочной железы проводили под наркозом (хлоралгидрат, 430 мг/кг). Макроскопически

оценивали состояние поджелудочной железы, фиксировали наличие/отсутствие видимых структурных изменений.

На базе морфологической лаборатории готовили гистологические микропрепараты. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином для общей характеристики микроструктуры ткани. В дальнейшем проводили ИГХ-анализ с применением антител (все АТ Abscam) к глюкагону (1:10 000) и инсулину (1:1000)

с использованием прибора для ИГХ «Thermo Autostainer 720». После ИГХ-процедуры ядра докрасивали гематоксилином (аппарат для окраски LeicaST5020). Фотографии микропрепаратов делали с помощью аппаратуры Leica (рис. 2).

Морфометрический анализ проводили с использованием микрофотографий. Определяли объёмную долю эндокриноцитов α и β по отношению к площади островков.

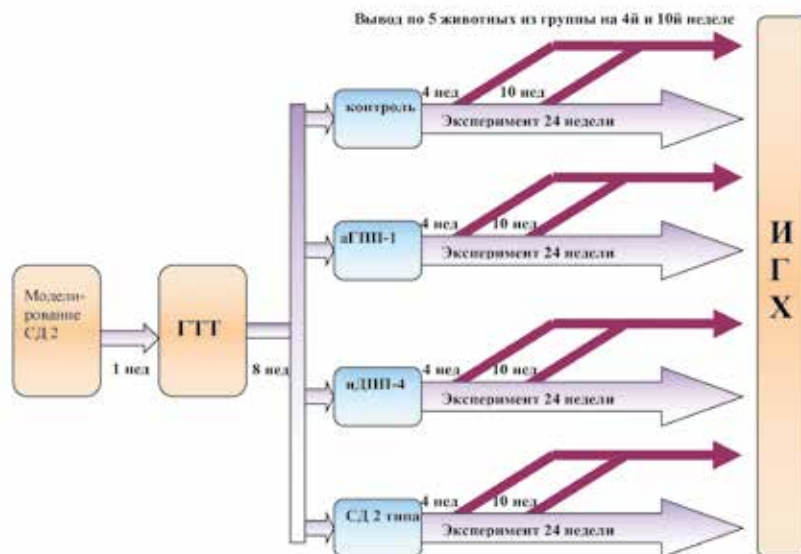
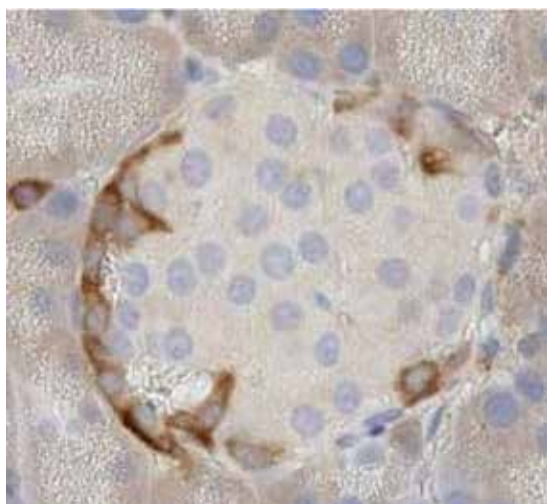
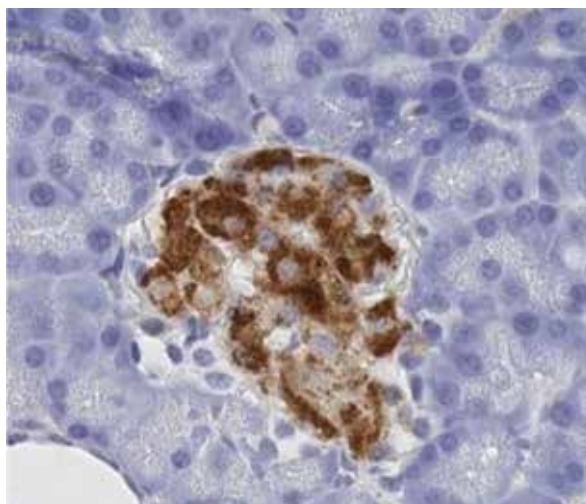


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

Контроль-группа интактных животных, СД 2 - группа животных с СД 2-го типа без терапии, аГПП-1 – группа, получающая аГПП1 (лираглутид) в дозе 0,2мкг/кг, идПП-4 – группа, получающая идПП4 (вилдаглиптин) в дозе 1,5 мг/кг.



а



б

Рис. 2. Микрофотографии, 24 нед.

а – ИГХ с антителами к глюкагону, б – ИГХ с антителами к инсулину.

Статистический анализ параметров при нормальном распределении проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с вероятностью ошибки $p < 0,05$.

Результаты

При визуальной оценке ни в одном из препаратов поджелудочной железы макроскопических изменений выявлено не было.

В группе животных с СД 2-го типа без лечения количество как β -, так и α - клеток было статистически значимо снижено по сравнению с контролем. Через 4 нед количество β -клеток в группах терапии как лираглутидом, так и вилдаглиптином оставалось сниженным по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Однако количество α -клеток в группе аГПП-1 было сопоставимым с показателями группы контроля.

Статистически значимые различия по сравнению с группой контроля перестали выявляться по количеству как β -клеток, так и α -клеток для группы вилдаглиптина с 10-й нед, а для группы лираглутида по количеству β -клеток также с 10-й нед исследования (табл.).

На рис. 3 представлена динамика изменения α - и β - клеток (а, б) на протяжении всего эксперимента. У животных с диабетом без терапии количество α -клеток было значимо снижено на ранних сроках наблюдения (до 10 нед) по сравнению с контролем, что, вероятно, вызвано цитотоксическим действием стрептозотоцина. При длительном наблюдении (24 нед) количество α -клеток резко возрастало и значимо превышало показатели как группы контроля, так и групп животных, получавших инкретиномиметики. Это в определенной степени подтверждает валидность использованной модели СД 2-го типа, так как аналогичная степень гиперплазии α -клеток обнаруживается и у пациентов с диабетом 2-го типа. Масса β -клеток

в поджелудочной железе животных при диабете без лечения была статистически значимо ниже как показателя контроля, так и животных, получавших терапию инкретиномиметиками (см. рис. 3, б). Как показано на рис. 3, а по мере увеличения длительности терапии инкретиномиметиками количество α -клеток в островках Лангерганса постепенно возвращается к норме интактного контроля.

У животных с диабетом без терапии количество α -клеток на протяжении 10 нед было снижено по сравнению с контролем. К 24-й неделе количество α -клеток резко возрастало и статистически значимо отличалось как от показателей контрольной группы, так и групп, получавших терапию инкретиномиметиками.

Обсуждение

Изучение характера изменений эндокриноцитов поджелудочной железы при сахарном диабете проводится уже многие годы. Между тем эти исследования в основном были сосредоточены на изучении изменений β -клеток поджелудочной железы. Исследования, изучавшие состояние α -клеток поджелудочной железы, носят единичный характер [8]. Установлено, что при естественном течении СД 2-го типа имеет место гиперплазия и гиперфункция α -клеток с развитием гипергликемии [14, 15]. Один из возможных механизмов гиперплазии хроническое воспаление, которое характеризуется гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, включая интерлейкин-6 (ИЛ-6), который, согласно ряду исследований, является ключевым регулятором численности и функции α -клеток [16, 17]. В нашей работе не изучалась экспрессия ИЛ-6 в клетках поджелудочной железы, но использованная модель с высокожировой нагрузкой, которая, согласно данным литературы, стимулирует продукцию ИЛ-6, позволяет предположить у

Таблица

Объемная доля эндокриноцитов (в %) по отношению к площади островка поджелудочной железы

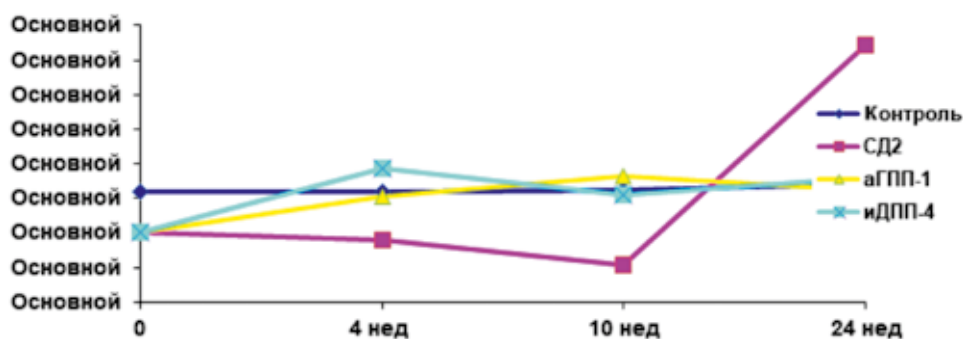
Группа животных	Тип клеток	Длительность наблюдения, нед		
		4	10	24
1-я (контроль), n=15	α	15,9±0,3	16,3±1,1	17,1±1,7
	β	69,0±0,7	68,9±2,5	63,6±5,3
2-я, n=15	α	9,0±0,1*	5,4±0,4*	37,1±1,6*
	β	39,9±0,9*	51,6±1,5*	41,2±1,0*
3-я, n=15	α	19,0±0,1*+	15,5±0,5 +	18±1,8 +
	β	50,4±0,4*+	59,3±0,9 +	57,0±0,8 +
4-я, n=15	α	15,2±0,4+o	18,2±0,9 +o	16,3±1,5 +
	β	60,7±0,5*+o	66±0,8 +o	68,5±3,8 +

Примечание. * $p < 0,05$ при сравнении с 1-й группой контроля; + $p < 0,05$ при сравнении со 2-й группой (СД 2-го типа без лечения); o $p < 0,05$ при сравнении с 3-й группой (СД 2-го типа, получавшая вилдаглиптин).

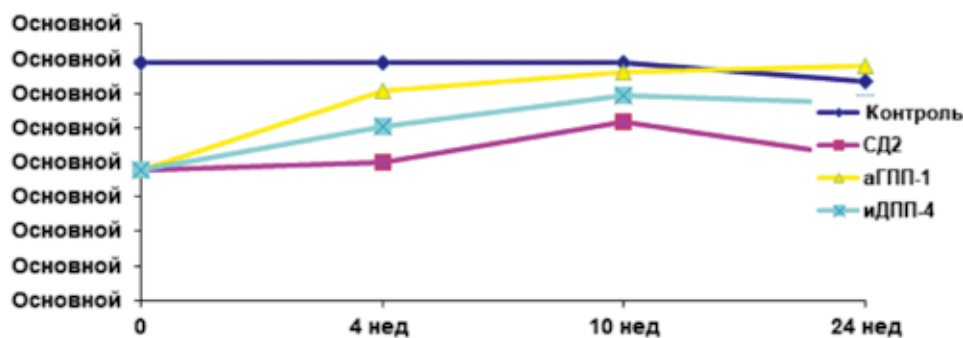
животных с СД 2-го типа повышенную продукцию ИЛ-6 [16]. Имеются сведения, демонстрирующие, что снижение уровня интерлейкина-1 (ИЛ-1) и ИЛ-6 сопровождается улучшением функции β -клеток и, вероятно, α -клеток [13, 17, 18]. Согласно данным литературы, инкретиномиметики снижают выработку провоспалительных цитокинов [19, 20], таким образом, возможно, влияя на функцию и численность α - и β -клеток. Второй возможный механизм гиперплазии α -клеток – это нарушение паракринной регуляции в поджелудочной железе. Известно, что клетки поджелудочной железы (α , β и δ) находятся в паракринных взаимодействиях, регулируя число и функцию друг друга. В некоторых исследованиях выявлено, что активация β -клеток приводит к ингибированию активности α -клеток и это опосредованно через δ -клетки [21]. Кроме того, согласно данным литературы, при гибели β -клеток существенное снижение уровней антител к глутаматдекарбоксилазе (serum anti-glutamic acid decarboxylase antibody (GAD)), гамма-ами-

нобутановой кислоты (ГАМК) и инсулина сопровождается активацией рецепторов рапамицина (phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR)) и увеличением массы α -клеток [29].

Механизмы влияния инкретинов и инкретиномиметиков на пролиферацию и апоптоз α - и β -клеток продолжают активно изучаться. В отношении эффектов нативного глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП1), многочисленные исследования свидетельствуют, что он увеличивает массу β -клеток, стимулирует пролиферацию и индукцию неогенеза островков [23]. В отношении влияния лираглутида (ГПП1) на α -клетки поджелудочной железы установлено, что ГПП1 значительно снижает секрецию глюкагона α -клетками и одновременно увеличивает секрецию соматостатина. Тот факт, что блокада рецепторов соматостатина увеличивает секрецию глюкагона, полностью устраняя ингибирующий эффект инкретомиметика ГПП1, свидетельствует о том, что влияние ГПП1 на α -клетки опосредуется со-



а



б

Рис. 3. Содержание α - и β -клеток островков поджелудочной железы в зависимости от продолжительности эксперимента.

а – процент α -клеток островков поджелудочной железы в зависимости от продолжительности эксперимента; б – процент β -клеток островков поджелудочной железы в зависимости от продолжительности эксперимента. Точка 0 – количество α/β клеток островков поджелудочной железы после индукции диабета 2-го типа и до начала терапии.

матостатином [24]. аГПП1, включая лираглутид, также стимулируют пролиферацию β -клеток, увеличивая клеточную массу и неогенез островков, что было продемонстрировано у крыс разных возрастов и на разных моделях сахарного диабета [18, 25, 26]. Для вилдаглиптин (идПП4) были продемонстрированы те же эффекты. В отличие от аГПП1 идПП4 за счет блокады активности ДПП4 сохраняют как ГПП1, так и гастроинтестинальный полипептид (ГИП), но активация рецепторов ГПП1 значительно менее выражена, чем на аГПП1. Согласно данным литературы, ГИП оказывает протекторное действие на β -клетки и способствует нормализации функции α -клеток [27]. Наше исследование показало, что число α -клеток у животных с СД 2-го типа, получавших инкретиномиметики, нормализовалось уже на ранних сроках наблюдения (4 нед). Количество β -клеток также становилось сопоставимым с группой контроля, но при длительности терапии 10 нед для аГПП1 или 24 нед для идПП4.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что терапия инкретиномиметиками способствует нормализации пула как α -, так и β -клеток поджелудочной железы. Тот факт, что нормализация количества α -клеток происходила в равные сроки на аГПП1 (лираглутид) и идПП4 (вилдаглиптин), но нормализация количества β -клеток на аГПП1 произошла уже к 10-й неделе наблюдения, а на идПП4 – только к 24-й неделе, может свидетельствовать о большем вкладе ГПП1 в нормализацию количества β -клеток. С учетом вышеописанных механизмов действия инкретинов можно предполагать, что нормализация количества β -клеток происходит в основном за счет повышения их пролиферации под воздействием ГПП1.

Работ, изучавших влияние различной длительности терапии инкретиномиметиками на количество α -клеток в эксперименте у возрастных животных, в доступной литературе мы не встретили. В исследовании A.S. Akarte у крыс с СД 2-го типа при терапии вилдаглиптином в течение 8 нед отмечалось увеличение β -клеток, но не α -клеток. В нашем исследовании, напротив, отмечалась более ранняя нормализация количества α -клеток (к 4-й неделе). Это может быть связано с тем, что мы изучали динамику клеточного состава у возрастных животных. Имеющиеся к настоящему времени исследования продемонстрировали увеличение числа α -клеток с развитием их гиперплазии в пожилом возрасте [28]. Помимо вышеупомянутых исследований, *in vitro* была продемонстрирована способность вилдаглиптина инициировать дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ASCs), полученных из жи-

ровой ткани в инсулинпродуцирующие клетки (insulin-producing cells (IPCs) [29]. Этот механизм тоже может быть вовлечен в нормализацию количества β -клеток на идПП4. На данном этапе работы дизайн выполненного фрагмента не позволяет точно установить механизм нормализации числа α -клеток. Для его уточнения необходимы дальнейшие исследования с оценкой уровня ИЛ-6, экспрессии его рецептора в эндокриноцитах поджелудочной железы, экспрессии рецепторов ГПП1 и ГИП в эндокриноцитах, а также с оценкой пула δ -клеток (антитела к соматостатину). Ограничением данного исследования является невозможность в условиях эксперимента воспроизвести все факторы, влияющие на процессы пролиферации и апоптоза эндокриноцитов поджелудочной железы при СД 2-го типа в клинике. Между тем использованная модель СД 2-го типа отражает наиболее значимые факторы, в частности высокожировая диета обеспечивает липотоксическое воздействие, а включение животных в возрасте 12 мес позволяет оценить состояние эндокриноцитов в возрасте, наиболее типичном для развития СД 2-го типа. Полученные данные могут быть экстраполированы в клинические исследования с оценкой функционального состояния α -клеток в процессе долговременной терапии инкретиномиметиками.

Литература

(п.п. 2-4; 6-12; 14-27; 29 см. References)

1. Дедов И.И. Russian Association of Endocrinologists expert consensus document on initiation and intensification of antihyperglycaemic therapy in type 2 diabetes mellitus. *Сахарный диабет*. 2011; 14(4): 6-17.
5. Снигур Г.Л. Особенности повреждения и регенерации бета-клеток панкреатических островков при экспериментальном сахарном диабете. *Сборник научных трудов VIII Всероссийской конференции по патологии клетки*. Москва; 2010; 232-3.
13. Байрашева В.К., Бабенко А.Ю., Дмитриев Ю.В. Новая модель сахарного диабета 2 типа и диабетической нефропатии у крыс. *Трансляционная медицина*. 2016; 3(4): 44-55.
28. Волков И.П. Функциональная морфология α -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы в возрастном аспекте. *Инновации в науке: сборник статей по материалам XXXIX международной научно-практической конференции*. Новосибирск. Сибак. 2014; 11(36).

References

1. Dedov I.I. The Russian Association of Endocrinologists Expert on Consensus document on initiation and intensification of diabetes mellitus. *Sacharniy diabet*. 2011; 14(4): 6-17. (In Russian)
2. F.Brereton M., Rohm M., Shimomura K., Holland C., Tornovsky-Babeay S., Dadon D. et al. Hyperglycaemia induces metabolic dysfunction and glycogen accumulation in pancreatic b-cells. *Nat Commun*. 2016; 24(7): 13496.

3. Maedler K., Carr R., Bosco D., A. Zuellig R., Berney T., Donath M. Sulfonylurea Induced β -Cell Apoptosis in Cultured Human Islets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004; 90(1): 501–6.
4. Butler A., Janson J., Bonner-Weir S. β -Cell deficit and increased β -Cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52: 102–10.
5. Snigur G.L. *Features of damage and regeneration of beta cells of pancreatic islets in experimental diabetes mellitus. [Osobennosti povregdeniya β regeneratsii beta-kletok pankreaticheskikh ostrovkov pri eksperimentalnom sakharnom diabete. Sbornic nauchnykh trudov VIII Vserossiyskoy konferentsii po patologii kletki]*. Moscow. 2010; 232–3. (In Russian)
6. Pick A., Clark J., Kubstrup C., Levisetti M., Pugh W., Bonner-Weir S., Polonsky K.S. Role of apoptosis in failure of β -cell mass compensation for insulin resistance and β -cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*. 1998; 47(3): 358–64.
7. Coon P.J., Rogus E.M., Drinkwater D., Muller D.C., Goldberg A.P. Role of body fat distribution in the decline in insulin sensitivity and glucose tolerance with age. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992; 75: 1125–32.
8. Kim J., Kang S., Seo B. Anti-diabetic activity of SMK001, a polyherbal formula in streptozotocin induced diabetic rats: therapeutic study. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29(3): 477–82.
9. Xu G., Staffers D.A., Habener J.F., Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both β -cell replication and neogenesis, resulting in increased β -cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 1999; 48: 2270–6.
10. Farilla L., Bulotta A., Hirdberg B., Li Calzi S., Khoury N., Noshmeh H., et al. Glucagon-Like Peptide 1 Inhibits Cell Apoptosis and Improves Glucose Responsiveness of Freshly Isolated Human. *Islets Endocrinology*. 2003; 144(12): 5149–58.
11. Perfetti R., Zhoy J., Doyle M., Egan J. Glucagon-Like Peptide-1 Induces Cell Proliferation and Pancreatic-Duodenum Homeobox-1 Expression and Increases Endocrine Cell Mass in the Pancreas of Old, Glucose-Intolerant Rats. *Endocrinology*. 2000; 141: 4600–5.
12. Butler A. Marked Expansion of Exocrine and Endocrine Pancreas With Incretin Therapy in Humans With Increased Exocrine Pancreas Dysplasia and the Potential for Glucagon-Producing Neuroendocrine Tumors. *Diabetes*. 2016; 62: 2595–604.
13. Bayrasheva V.K., Babenko A.Yu., Dmitriev Yu.V. A new model of type 2 diabetes and diabetic nephropathy in rats. *Translyatsionnaya meditsina*. 2016; 3(4): 44–55. (In Russian)
14. Yoon K.H., Ko S.H., Cho J.H., Lee J.M., Ahn Y.B., Song K.H. et al. Selective β -cell loss and α -cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 2300–8.
15. Gromada J., Franklin I., Wollheim C.B. α -cells of the endocrine pancreas: 35 Years of research but the enigma remains. *Endocr Rev*. 2007; 28: 84–116.
16. Spranger J., Haastert B., Müller-Scholze S., Koenig W., Thorand B., Holle R. et al. Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: Results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KO-RA S4). *Diabetes*. 2003; 54: 11–7.
17. Ellingsgaard H., Ehses J.A., Hammar E.B. Interleukin-6 regulates pancreatic α -cell mass expansion. *PNAS*. 2008; 105(35): 13163–8.
18. Tourrel C., Bailbe D., Meile M.-J., Kergoat M., Portha B. Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate β -cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes*. 2001; 50: 1562–70.
19. Courreges J.P., Vilsboll T., Zdravkovic M., Le-Thi T., Krarup T., Schmitz O., et al. Beneficial effects of once-daily liraglutide, a human glucagon-like peptide-1 analogue, on cardiovascular risk biomarkers in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2008; 25(9): 1129–31.
20. Akarte A.S., Srinivasan B.P., Gandhi S. Vildagliptin selectively ameliorates GLP-1, GLUT4, SREBP-1c mRNA levels and stimulates β -Cell proliferation resulting in improved glucose homeostasis in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Diabetes and Its Complications*. 2012; 26: 266–74.
21. Briant J.B., Reinbothe T.M., Spiliotis I., Miranda C., Rodriguez B., Rorsman P. δ -cells and β -cells are electrically coupled and regulate α -cell activity via somatostatin. *The Journal of Physiology*. 2018; 596(2): 197–215.
22. Feng A.L., Yun-Yan Xiang., Le Gui., Kaltsidis G., Feng Q., Wei-Yang Lu. Paracrine GABA and insulin regulate pancreatic α cell proliferation in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017; 60: 1033–42.
23. Drucker D.J. Glucagon-Like Peptides: Regulators of Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis. *Molecular Endocrinology*. 2003; 17(2): 161–71.
24. Orgaard A., Holst J.J. The role of somatostatin in GLP-1-induced inhibition of glucagon secretion in mice. *Diabetologia*. 2017; 60(9): 1731–9.
25. Perfetti R., Zhou J., Doyle M.E., Egan J.M. Glucagon like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose intolerant rats. *Endocrinology*. 2000; 141: 4600–5.
26. Tourrel C., Bailbe D., Lacorne M., Meile M.J., Kergoat M., Portha B. Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the β -cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes*. 2002; 51: 1443–52.
27. Yanagimachi T., Fujita Y., Takeda Y., Honjo J., Atageldiyeva K.K., Takiyama Y. et al. Pancreatic glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) (1–30) expression is upregulated in diabetes and PEGylated GIP(1–30) can suppress the progression of low-dose-STZ-induced hyperglycaemia in mice. *Diabetologia*. 2016; 59(3): 533–41.
28. Volkov V. P. Functional morphology of A-cells of the islets of Langerhans of the pancreas in the age aspect. *Innovatsii v nauke: sbornik statey po materialam XXXIX mezhdunarodnoy nauchno-practicheskoy konferentsii*. Novosibirsk. Sibak. 2014; 11(36). (In Russian)
29. Karimi S., Ai J., Khorsandi L., Nejad D.B., Saki G. Vildagliptin Enhances Differentiation of Insulin Producing Cells from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2019; 4: 477–82.

Сведения об авторах:

Тучина Таисия Павловна, аспирант, мл. науч. сотр. НИЛ диабетологии Института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», e-mail: tayka_91@mail.ru;

Рогоза Ольга Владимировна, биолог патологоанатомической лаб. ЛРК-1 ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»;

Скотникова Ксения Петровна, ординатор по специальности эндокринология ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»;
Лебедев Денис Андреевич, аспирант, мл. науч. сотр. НИЛ диабетологии Института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»;

Грозов Роман Викторович, канд. мед. наук, зав. отд-нием патоморфологии ЛРК-1 ФГБУ «НМИЦ им.В.А. Алмазова»;

Бабенко Алина Юрьевна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. НИЛ диабетологии Института Эндокринологи ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»;

Галагудза Михаил Михайлович, член-корр. РАН, доктор мед. наук, директор Института экспериментальной медицины, гл. науч. сотр. НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда, зав. каф. патологии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова».

Краткие сообщения

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.146.3:612.146:616.151.4-073.213:599.323.45

Плотников М.Б.¹, Алиев О.И.¹, Сидехменова А.В.¹, Шаманаев А.Ю.¹, Анищенко А.М.^{1,2}

Влияние дигидрохверцетина на артериальное давление и гемореологические параметры крыс SHR в периоды развития и стабильной артериальной гипертензии

¹Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634028, г. Томск, Россия, пр. Ленина, д. 3;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 634050, г. Томск, Россия, ул. Московский тракт, д. 2

Согласно современным представлениям, важную роль в прогрессировании артериальной гипертензии (АГ) играет изменение реологических свойств крови. К настоящему времени опубликованы работы, в которых показано улучшение гемореологических параметров за счет использования различных лекарственных средств при сердечно-сосудистых заболеваниях. **Цель работы** – исследование влияния дигидрохверцетина (ДГК) на артериальное давление (АД) и гемореологические параметры у крыс линии SHR в различные периоды развития АГ.

Методика. Эксперименты проведены на крысах со спонтанной гипертензией (spontaneously hypertensive rats, SHR) двух возрастных групп: период развития АГ (возраст крыс SHR на начало эксперимента 5 нед) и период стабильной АГ (возраст крыс SHR на начало эксперимента 11 нед). ДГК (50 мг/кг) вводили внутривенно в течение 6 нед. Крысы контрольных групп получали эквивалентное количество крахмальной слизи по той же схеме. АД у бодрствующих крыс регистрировали неинвазивным методом (NIBP200A, «Biorac Systems, Inc.», США). Вязкость цельной крови, стабилизированной ЭДТА (в диапазоне скоростей сдвига 15–450 с⁻¹), и плазмы (450 с⁻¹) измеряли на ротационном вискозиметре (LVDV-II+ Pro, CP40, «Brookfield Engineering Labs Inc.») при 36 °С. Гематокрит определяли методом центрифугирования. Агрегацию и деформируемость эритроцитов исследовали на анализаторе «RheoScan-AnD 300» («Rheo Meditech, Inc.»).

Результаты. У крыс SHR после 6-недельного введения ДГК в период развития АГ не наблюдалось значимых различий уровня систолического АД (САД), макро- и микрореологических показателей по сравнению с параметрами в контрольной группе. У крыс SHR со стабильной АГ введение ДГК приводило к снижению САД, ослаблению агрегации эритроцитов с увеличением их индекса элонгации и снижению вязкости крови по сравнению с контрольной группой.

Заключение. Нарушение гемореологических параметров крови выражено значительно меньше у крыс SHR в начальной стадии формирования АГ. Использование ДГК в период развития АГ не оказывало статистически значимого влияния на АД. В период стабильной АГ гипотензивное действие ДГК связано в том числе с его способностью снижать вязкость крови и улучшать такие микрореологические параметры, как агрегация и деформируемость.

Ключевые слова: артериальная гипертензия; артериальное давление; гемореологические показатели; дигидрохверцетин; крысы SHR.

Для цитирования: Плотников М.Б., Алиев О.И., Сидехменова А.В., Шаманаев А.Ю., Анищенко А.М. Влияние дигидрохверцетина на артериальное давление и гемореологические параметры крыс SHR в периоды развития и стабильной артериальной гипертензии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 126-130.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.126-130

Для корреспонденции: Плотников Марк Борисович, e-mail: mbp2001@mail.ru

Участие авторов: общее руководство, анализ полученных результатов, подготовка текста публикации – Плотников М.Б.; получение экспериментальных данных, анализ полученных результатов, подготовка текста публикации – Алиев О.И., Сидехменова А.В., Шаманаев А.Ю., Анищенко А.М.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.07.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Plotnikov M.B.¹, Aliev O.I.¹, Sidekhmenova A.V.¹, Shamanaev A.Y.¹, Anishchenko A.M.^{1,2}**Effects of dihydroquercetin on blood pressure and hemorheological parameters in SHR rat during early and stable arterial hypertension**¹E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science, Prospekt Lenina 3, Tomsk 634028, Russia;²Siberian State Medical University, Moskovsky Trakt Str. 2, Tomsk 634050, Russia

Arterial hypertension (AH) is the most common cardiovascular disease and a risk factor for other vascular diseases and organ damage. According to current concepts, changes in blood rheology play an important role in AH progression. Drugs improving hemorheological parameters have been shown to be beneficial in cardiovascular diseases.

Aim. To study the effect of dihydroquercetin (DHQ) on blood pressure (BP) and hemorheological parameters in spontaneously hypertensive rats (SHR) at different stages of AH.

Methods. Experiments were performed on SHR in the period of AH development (5-week-old SHR at the beginning of experiments) and in the period of stable AH (11-week-old SHR at the beginning of experiments). DHQ (50 mg/kg) was administered intragastrically for 6 weeks. Rats of the control groups received an equal volume of starch mucilage according to the same schedule.

BP was measured with a non-invasive NIBP200A (Biopac Systems, Inc., USA) instrument in conscious rats. Viscosity of K₂EDTA-stabilized whole blood (shear rate range, 15–450 s⁻¹) and plasma (450 s⁻¹) was measured with a rotational viscometer (LVDV-II + Pro, CP40, Brookfield Engineering Labs Inc.) at 36 °C. Hematocrit was determined by centrifugation. Aggregation and deformability of red blood cells was studied with a RheoScan-AnD 300 analyzer (RheoMeditech, Inc.).

Results. After 6 weeks of DHQ administration in the period of AH development, mean blood pressure (MBP) and macro- and microrheological parameters did not significantly differ from the respective values in the control group. In SHR with stable AH, the DHQ treatment resulted in decreased MBP, blood viscosity, and red blood cell aggregation and increased red blood cell elongation index compared to the control group.

Conclusion. Disorders of hemorheological parameters were significantly less pronounced in SHR with early AH. Perhaps for this reason, the DHQ treatment during the development of hypertension did not exert a significant effect on BP. In the period of stable hypertension, hyperviscosity syndrome progressed in SHR. The antihypertensive effect of DHQ in this period, among other things, was associated with a beneficial effect on micro-rheological parameters, including red blood cell aggregation and deformability, which was evident as decreased blood viscosity.

Keywords: arterial hypertension; blood pressure; hemorheological indicators; dihydroquercetin; SHR.

For citation: Plotnikov M.B., Aliev O.I., Sidekhmenova A.V., Shamanaev A.Y., Anishchenko A.M. Effects of dihydroquercetin on blood pressure and hemorheological parameters in SHR rat during early and stable arterial hypertension. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3) 126-130. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.126-130.

For correspondence: Plotnikov Mark Borisovich, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, e-mail: mbp2001@mail.ru

Contribution: general management, analysis of the results, preparation of the text of the publication -- Plotnikov M.B.; obtaining experimental data, analysis of the results, preparation of the text of the publication -- Aliev O.I., Sidekhmenova A.V., Shamanaev A.Y., Anishchenko A.M. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article -- all co-authors.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

Plotnikov M.B., <https://orcid.org/0000-0002-0548-6586>

Aliev O.I., <https://orcid.org/0000-0001-9788-1235>

Sidekhmenova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3171-667X>

Shamanaev A.Y., <https://orcid.org/0000-0003-2348-1444>

Anishchenko A.M., <https://orcid.org/0000-0002-8377-4129>

Received 10.07.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Артериальная гипертензия (АГ) является наиболее частым сердечно-сосудистым заболеванием и одним из факторов риска повреждения органов сосудистого генеза [1]. Согласно современным представлениям, важную роль в прогрессировании АГ играет повышенная вязкость крови. Вязкость крови является одним из определяющих факторов сосудистого сопротивления и может способствовать повышению артериального давления (АД) [2]. К настоящему времени опубликованы данные, в которых показано улучшение гемореологических параметров за счет использования различных лекарственных средств при сердечно-сосудистой патологии [3]. При этом данные об эффективности при АГ средств, обладающих гемореологической активностью, крайне ограничены [4]. Одним из фармакологических средств, обладающих гемореологической активностью, является дигидроквертицин (ДГК), который продемонстрировал высокую эффективность в качестве корректора синдрома повышенной вязкости крови на различных моделях сердечно-сосудистых заболеваний [5].

Цель работы – исследование влияния дигидрокверцетина на АД и гемореологические параметры у крыс линии SHR в различные периоды АГ.

Методика

Эксперименты выполнены на 40 крысах со спонтанной гипертензией (spontaneously hypertensive rats, SHR) категории SPF, полученных из вивария ИБХ РАН, г. Пущино. В виварии НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга животные содержались в неполной барьерной системе при следующих параметрах окружающей среды: температура 20–24 °С, относительная влажность воздуха 50±20%, воздухообмен 12–15 объемов помещения в час, световой режим 12:12 ч. Содержание животных и уход за ними осуществлялись в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Протокол исследования утвержден комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол № 72052014).

В 1-й серии опытов (период развития АГ) возраст крыс SHR на начало эксперимента составлял 5 нед. Во 2-й (период стабильной АГ) в эксперимент включали животных, достигших 17 нед. В первой возрастной категории крысы были разделены на группы Контроль 1 и Опыт 1, во второй – Контроль 2 и Опыт 2. Крысам опытных групп в течение 6 нед ежедневно внутривенно вводили ДГК в дозе 50 мг/кг в 1% крахмаль-

ной слизи. Крысы контрольных групп получали эквивалентное количество крахмальной слизи по той же схеме.

АД у крыс регистрировали с помощью системы неинвазивного измерения давления у ненаркотизированных (бодрствующих) мелких лабораторных животных NIBP200A («Biorac Systems, Inc.», США). Запись и обработка данных производились на компьютере с помощью программы «AcqKnowledge 4.2 for MP150».

Кровь для исследований забирали через катетер из общей сонной артерии у наркотизированных животных (тиопентал натрия, 80 мг/кг). Кровь стабилизировали 2% К₂ЭДТА в соотношении 20 мкл антикоагулянта на 1 мл крови. Вязкость цельной крови (в диапазоне скоростей сдвига 15–450 с⁻¹) и плазмы (450 с⁻¹) измеряли на ротационном вискозиметре (LVDV-II+ Pro, CP40, «Brookfield Engineering Labs Inc.») при 36 °С. Гематокрит определяли методом центрифугирования в стеклянных капиллярах при 1300 g в течение 20 мин (центрифуга PC-6) и выражали в процентах. Агрегацию и деформируемость эритроцитов исследовали на анализаторе «RheoScan-AnD 300» («Rheo Meditech, Inc.»). Эвтаназию осуществляли в CO₂ камере.

Анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ «Statistica 8.0». Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего значения. Для оценки статистической значимости различий применяли непараметрические критерии Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни.

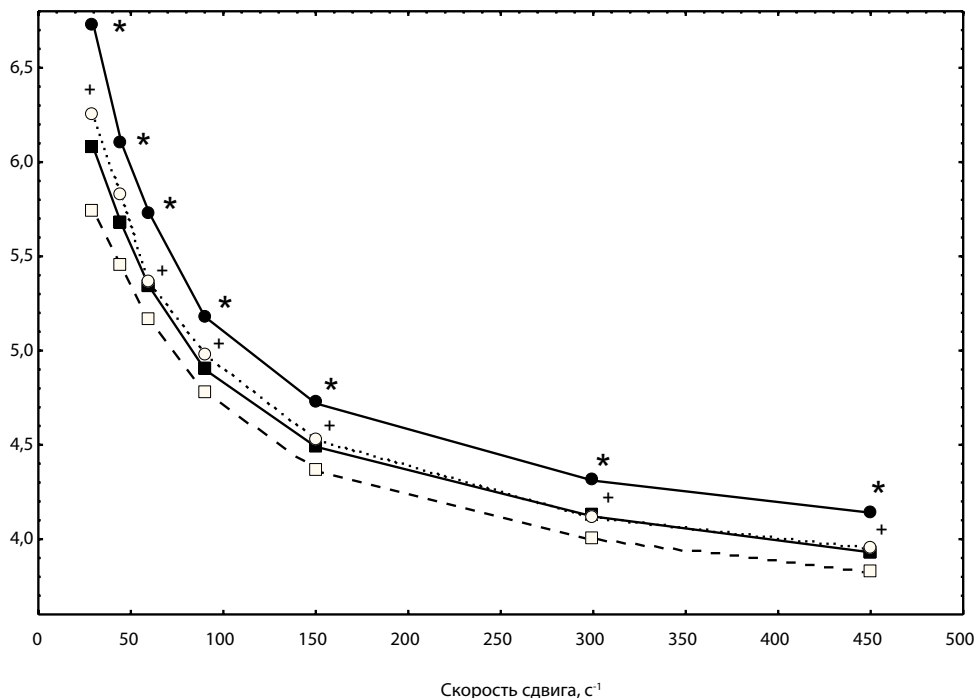
Результаты и обсуждение

Систолическое артериальное давление (САД) у крыс SHR на 11-й неделе жизни (Контроль 1) было статистически значимо ниже (на 16%) по сравнению с показателями САД у 23-недельных животных (Контроль 2, **таблица**). Также с возрастом имело место изменение гемореологических параметров. Так, у животных группы Контроль 2 наблюдались более высокие значения гематокрита (на 2 процентных пункта), вязкости плазмы (на 5%) и агрегации эритроцитов (в 2 раза), а также отмечалось снижение индекса элонгации эритроцитов (на 5% и 3% при напряжениях сдвига 1 и 3 Па соответственно). Ухудшение этих показателей у животных со стабильной АГ отразилось в закономерном повышении вязкости цельной крови на 7–10 % в области низких (30–60 с⁻¹) и на 5% в области высоких (150–450 с⁻¹) скоростей сдвига относительно группы Контроль 1 (**рисунок**). Это соответствует полученным ранее данным [6].

У крыс SHR после 6-недельного курса ДГК в период развития АГ не наблюдалось значимых различий уровня САД, макро- и микрореологических параметров

по сравнению с группой Контроль 1. Снижение вязкости цельной крови также не достигало необходимого уровня статистической значимости. У крыс SHR со стабильной АГ введение ДГК приводило к снижению САД на 18% относительно группы Контроль 2 (см. табл.). У этих животных также наблюдалось ослабление агрегации эритроцитов на 39% и увеличение их индекса элонгации на 5% и 3% при напряжениях сдвига 1 и 3 Па соответственно. Улучшение агрегации и деформируемости эритроцитов у крыс SHR в группе Опыт 2 отразилось в статистически значимом снижении вязкости цельной крови на 6–7% в области низких (30–60 с⁻¹) и на 4–5% в области высоких (150–450 с⁻¹) скоростей сдвига относительно группы Контроль 2 (см. рис.).

Анализ результатов исследования свидетельствует, что ДГК оказывает гипотензивное действие только в период стабильной АГ, значительно ослабляя при этом синдром гипервязкости крови. Ранее было показано, что у



Влияние курсового внутривенного введения дигидрохверцетина на вязкость цельной крови у крыс SHR в период развития АГ (■ – Контроль 1, □ – Опыт 1) и в период стабильной АГ (● – Контроль 2, ○ – Опыт 2). Ось абсцисс: скорость сдвига (с⁻¹); ось ординат: вязкость крови (мПа·с). * – статистически значимые различия по сравнению с группой Контроль 1 (p<0,05); + – значимые различия по сравнению с группой Контроль 2 (p<0,05).

Таблица

Влияние курсового внутривенного введения дигидрохверцетина на САД, макро- и микрореологические параметры у крыс SHR в период развития АГ (Контроль 1 и Опыт 1) и в период стабильной АГ (Контроль 2 и Опыт 2)

Показатель		Контроль 1, n=10	Опыт 1, n=10	Контроль 2, n=10	Опыт 2, n=10
САД		206±6	208±4	244±9	200±8
Гематокрит, %		49±1	50±1	51±1*	49±1
Вязкость плазмы, мПа·с		1,13±0,01	1,12±0,01	1,19±0,01*	1,18±0,01
Полупериод агрегации эритроцитов, с		10,93±0,90	12,05±1,28	5,74±0,19*	7,95±0,47+
Индекс элонгации при различных напряжениях сдвига, усл. ед.	1 Па	0,224±0,003	0,220±0,003	0,212±0,002*	0,223±0,004+
	3 Па	0,374±0,002	0,369±0,002	0,362±0,003*	0,372±0,002+
	7 Па	0,463±0,002	0,461±0,002	0,458±0,003	0,460±0,002

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с группой Контроль 1 (p<0,05); + – по сравнению с группой Контроль 2 (p<0,05).

крыс SHR в период возрастания АД формируется состояние гипервязкости крови за счет повышения гематокрита [7]. Явление эритроцитоза у крыс SHR подтверждается и в других исследованиях, причем увеличение количества эритроцитов происходит еще до возрастания АД [8]. Объектом воздействия ДГК является микрореологические параметры — агрегация и деформируемость эритроцитов, которые у крыс SHR в период развития АГ существенно не изменяются. Поэтому в период развития АГ ДГК не влиял на вязкость крови и АД.

Заключение

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что нарушение гемореологических параметров крови выражено значимо меньше у крыс SHR с только что сформировавшейся АГ. Возможно, вследствие этого использование ДГК в период развития АГ не оказывало статистически значимого влияния на АД. В период стабильной АГ у крыс SHR наблюдалось прогрессирование синдрома гипервязкости крови. Гипотензивное действие ДГК в данный период, помимо прочего, связано с его положительным влиянием на такие микрореологические параметры, как агрегация и деформируемость эритроцитов, что проявлялось в закономерном снижении вязкости крови.

Литература

(п.п. 1–4; 8 см. References)

- Плотников М.Б., Тюкавкина Н.А., Плотникова Т.М. *Лекарственные препараты на основе диквертина*. Томск: Изд. Томского ун-та; 2005.
- Плотников М.Б., Алиев О.И., Колтунов А.А., Маслов М.Ю. Синдром повышенной вязкости крови у крыс линии SHR: ана-

лиз адекватности модели. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1998; 8: 150–1.

- Алиев О.И., Анищенко А.М., Сидехменова А.В., Шаманаев А.Ю., Чернышева Г.А., Плотников М.Б. Гемореологические показатели у крыс SHR в периоды возрастания и стабильно высокого артериального давления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(1): 51–7.

References

- Wermelt J.A., Schunkert H. Management of arterial hypertension. *Herz*. 2017; 42(5): 515–26.
- Tripolino C., Gnasso A., Carallo C., Scavelli F.B., Irace C. Hemorheological profiles of subjects with prehypertension. *Hypertens Res*. 2016; 39(7): 519–23.
- Atochin D.N., Chernysheva G.A., Smolyakova V.I., Osipenko A.N., Logvinov S.V., Zhdankina A.A. et al. Neuroprotective effects of p-tyrosol after the global cerebral ischemia in rats. *Phytomedicine*. 2016; 23(7): 784–92.
- Baskurt O.K., Hardeman M.R., Rampling M., Meiselman H.J. eds. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. Amsterdam (The Netherlands): IOS; 2007.
- Plotnikov M.B., Tyukavkina N.A., Plotnikova T.M. *Medicinal preparations based on dicvertin. [Lekarstvennye preparaty na osnove dikvertina]*. Tomsk: Izd. Tomskogo universiteta; 2005. (in Russian)
- Plotnikov M.B., Aliev O.I., Koltunov A.A., Maslov M.Yu. Increased blood viscosity syndrome in SHR rats: analysis of the model adequacy. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1998; 8: 150–1. (in Russian)
- Aliev O.I., Anishchenko A.M., Sidekhmenova A.V., Shamanaev A.Yu., Chernysheva G.A., Plotnikov M.B. Hemorheological indices in SHR rats during periods of increasing and consistently high blood pressure. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(1): 51–7. (in Russian)
- Bruschi G., Minari M., Bruschi M. E., Tacinelli L., Milani B., Cavatorta A. et al. Similarities of essential and spontaneous hypertension. Volume and number of blood cells. *Hypertension*. 1986; 8(11): 983–9.

Сведения об авторах:

Плотников Марк Борисович, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, e-mail: mbp2001@mail.ru;

Алиев Олег Ибрагимович, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, e-mail: oal67@yandex.ru;

Сидехменова Анастасия Витальевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, e-mail: sidehmenova@yandex.ru;

Шаманаев Александр Юрьевич, канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаб. фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, e-mail: shamanaev7@mail.ru;

Анищенко Анна Марковна, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: nuska-80@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.9

Осиков М.В., Симомян Е.В., Бакеева А.Е., Огнева О.И.

Динамика показателей перекисного окисления липидов в толстом кишечнике при экспериментальной болезни Крона в условиях применения ректальных суппозиторий с экстрактом корневищ куркумы длинной

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 545092, г. Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64

Цель исследования – проведение сравнительного анализа влияния экстракта куркумы длинной и 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК) в составе ректальных суппозиторий на клиническую картину и содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в слизистой оболочке толстого кишечника при экспериментальной болезни Крона (БК).

Методика. Эксперимент выполнен на 70 белых крысах-самцах Wistar. БК моделировали ректальным введением тринитробензосульфоновой кислоты. Ректальные суппозитории (массой 0,3 г каждая) начинали применять через 12 ч. Содержание 5-АСК в суппозиториях составляло 50 мг, 10% экстракта куркумы длинной оригинального состава 0,000075 г. На 3-и, 5-е и 7-е сут после моделирования БК оценивали клинический статус по модифицированной шкале Disease activity index и содержание продуктов ПОЛ в слизистой оболочке толстого кишечника.

Результаты. В динамике БК в толстом кишечнике увеличивается содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах; тяжесть клинических признаков (снижение массы тела, диарея, кровь в каловых массах) нарастает по мере увеличения содержания продуктов ПОЛ. Применение при БК ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы снижает выраженность клинических симптомов, уменьшает содержание продуктов ПОЛ преимущественно в изопропанольной фазе липидного экстракта толстого кишечника; установлена корреляция индекса клинической активности БК с содержанием продуктов ПОЛ в толстом кишечнике.

Заключение. Эффективность локального применения экстракта куркумы в составе ректальных суппозиторий сопоставима по эффективности с применением ректальных суппозиторий с 5-АСК по показателям индекса клинической активности и по содержанию продуктов ПОЛ в слизистой толстого кишечника.

Ключевые слова: болезнь Крона; оксидативный стресс; продукты перекисного окисления липидов; экстракт куркумы.

Для цитирования: Осиков М.В., Симомян Е.В., Бакеева А.Е., Огнева О.И. Динамика показателей перекисного окисления липидов в толстом кишечнике при экспериментальной болезни Крона в условиях применения ректальных суппозиторий с экстрактом корневищ куркумы длинной. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 131-136.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.131-136

Для корреспонденции: Огнева Ольга Игоревна, e-mail: ognevaolga2@mail.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Осиков М.В., Симомян Е.В., Бакеева А.Е.; сбор и обработка материала – Бакеева А.Е., Огнева О.И.; статистическая обработка – Бакеева А.Е., Огнева О.И.; написание текста – Осиков М.В., Симомян Е.В., Бакеева А.Е., Огнева О.И. редактирование – Бакеева А.Е., Огнева О.И. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.03.2020

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E., Ogneva O.I.

Dynamics of lipid peroxidation in the large intestine during experimental Crohn's disease and the use of rectal suppositories with long turmeric extract

South Ural State Medical University,
Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk 45092, Russia

Aim. To compare effects of turmeric extract and 5-aminosalicylic acid (5-ASA) formulated into rectal suppositories on clinical symptoms and content of lipid peroxidation products (LPP) in the mucous membrane of the large intestine in experimental Crohn's disease (CD).

Methods: Experiments were performed on 70 Wistar male rats. CD was modeled by rectal administration of trinitrobenzenesulfonic acid; rectal suppositories (0.3 g each) were used every 12 h. The suppositories contained 5-ASA (50 mg) or 10% turmeric extract with an original composition (0.000075 g). On days 3, 5, and 7 of CD, the clinical status was evaluated with a modified Disease Activity Index scale, and LPP concentrations were measured in the large intestine mucosa.

Results. In the course of CD in the colon, concentrations of primary, secondary, and final LPP in the heptane and isopropanol phases increased; severity of clinical signs (weight loss, diarrhea, blood in fecal masses) increased with increasing LPP concentrations. The use of rectal suppositories with turmeric extract alleviated severity of clinical symptoms and reduced LPP content primarily in the isopropanol phase of colon lipid extract. The index of CD clinical activity of CD was correlated with the large intestinal LPP content.

Conclusion. Effectiveness of the local application of turmeric extract formulated into rectal suppositories was comparable with that of rectal suppositories with 5-ASA as determined by the Disease Activity Index and the LPP content in the large intestine.

Keywords: Crohn's disease; oxidative stress; lipid peroxidation products; turmeric extract.

For citation: Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E., Ogneva O.I. Dynamics of indicators of lipid peroxidation in thick intestine in experimental Crohn's disease in conditions of use of rectal suppositories with extract of curcumin. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2020; 64(3): 131-136. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.131-136

For correspondence: **Ogneva Olga I.**, PhD, Assistant Professor of Department of Pathophysiology, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation, E-mail: ognevaolga2@mail.ru

Contribution: research concept and design – Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E.; material collecting and processing – Bakeeva A.E., Ogneva O.I.; statistical processing of results – Bakeeva A.E., Ogneva O.I.; writing text – Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E.; text editing – Bakeeva A.E., Ogneva O.I. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgment. The study has no sponsorship.

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

Information about the authors:

Osikov M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6487-9083>

Simonyan E.V., <https://orcid.org/0000-0001-7703-6325>

Bakeeva A.E., <https://orcid.org/0000-0002-9264-4852>

Ogneva O.I., <https://orcid.org/0000-0002-9309-2076>

Received 20.03.2020

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Болезнь Крона (БК) является актуальной проблемой в современной гастроэнтерологии в связи с ростом распространенности заболевания, прогрессирующим течением, тяжестью осложнений и трудностями терапии [1-3].

В доступной литературе продемонстрирована роль оксидативного стресса в патогенезе БК. В условиях избыточной генерации активных форм кислорода и азота, активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и недостаточной активности компонентов антиокислительной защиты повреждается стенка ки-

шечника, нарушаются процессы внутриклеточной регуляции иммунокомпетентных клеток [4-6]. У больных БК выявлен дисбаланс в активности СОД-1, СОД-2, СОД-3, глутатионпероксидазы и каталазы, снижено содержание глутатиона и мелатонина [7].

Эскалация оксидативного стресса при БК приводит к повреждению эндотелиоцитов сосудов стенки кишечника и др. неблагоприятным последствиям [8]. В связи с этим продукты ПОЛ могут рассматриваться как патохимические маркеры БК, а их содержание в стенке кишечника позволяет судить о выраженности

воспалительного процесса и эффективности применяемой терапии.

Использование средств базисной терапии 5-аминосалицилатов (5-АСК), кортикостероидов, иммуносупрессоров и ряда биологических препаратов сопряжено с широким спектром побочных эффектов [9], что делает актуальным поиск безопасных лекарственных средств с повышенной терапевтической эффективностью. В последнее время внимание привлекает куркума длинная, обладающая противовоспалительными, антиоксидантными и цитопротекторными свойствами [10].

Цель исследования – сравнительный анализ эффективности влияния экстракта куркумы длинной и 5-АСК в составе ректальных суппозиториях на клиническую картину и содержание продуктов ПОЛ в слизистой оболочке толстого кишечника при экспериментальной БК.

Методика

Эксперименты выполнены в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986 г., Страсбург) и рекомендациями Европейской Комиссии 2007/526/ЕС от 18.06.07 Работа одобрена Этическим комитетом (протокол № 1 от 14.01.17) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

Эксперименты выполнены на 70 крысах Вистар. 1-я группа ($n=7$) – интактный контроль; 2-я ($n=21$) – животные с БК без лечения; 3-я и 4-я группы ($n=21$ в каждой группе) – животные с БК и применением ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы (БК+ККМ) или с 5-АСК (БК+5-АСК) соответственно. Суппозитории вводили каждые 12 ч. Для моделирования БК 30 мг тринитробензосульфоновой кислоты (ТНБС) («Sigma-aldrich», США) растворяли в 150 мл 50% этанола, затем 0,25 мл полученного раствора вводили per rectum с помощью полиуретанового катетера [11]. Для общей анестезии использовали «Золетил-100» (20 мг/кг). Развитие БК верифицировали по клинической картине и морфологии очага повреждения в толстом кишечнике. Суппозитории с 5-АСК готовили методом ручного формования путем расплавления препарата «Салофальк» (500 мг, «Doctor Falk Pharma GmbH», Германия). Содержание 5-АСК в 1 суппозитории составило 50 мг. Нами разработан состав и проведен комплекс фармакотехнологических исследований новой лекарственной формы суппозиториях, содержащих 0,000075 мг куркумина, полученного из 10% спиртового (растворитель спирт этиловый 80%) экстракта корневищ с корнями куркумы длинной (*Curcuma longa* L., «Diamart», Индия).

В качестве вспомогательных веществ для соответствия фармацевтико-технологическим и биофармацевтическим параметрам использовали полиэтиленгликоли различной молекулярной массы, эмульгатор Т-2, кремфор СО-40 и Kolliphor P188. Стандартизацию суппозиториях проводили согласно ОФС 1.4.1.0013.15 «Суппозитории». В группах животных III и IV размеры суппозиториях были адаптированы под анатомические особенности лабораторных животных, масса каждого образца исследуемой лекарственной формы составила 300 мг. Исследования проводили на 3-и, 5-е и 7-е сут после моделирования БК.

Во всех группах ежедневно оценивали потребление корма и воды животными, а также их клинический статус по модифицированной шкале Disease activity index (DAI), адаптированной для оценки БК у крыс и включающей 3 параметра: масса тела, консистенция стула и наличие крови в кале [12]. Каждый критерий оценивали по 4-балльной шкале от 0 до 4, затем баллы суммировали, минимальное значение индекса 0, максимальное – 12.

После выведения животных из эксперимента выделяли очаг повреждения в толстом кишечнике, готовили навеску слизистой оболочки массой 0,3 г, а затем доводили до 3 мл путем добавления фосфатного нейтрального буферного раствора. Содержание изопропанолрастворимых и гептанрастворимых продуктов ПОЛ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника определяли экстракционно-спектрофотометрическим методом [13]. Результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.): E_{232}/E_{220} (относительное содержание диеновых конъюгатов – первичные продукты), E_{278}/E_{220} (содержание кетодиенов и сопряженных триенов – вторичные продукты) и E_{400}/E_{220} (содержание оснований Шиффа – конечные продукты).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statisticav. 6.0». Характеристика выборок представлена в формате «Me [Q₂₅ – Q₇₅]», где Me – медиана, Q₂₅, Q₇₅ – значение нижнего и верхнего квартиля соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца). С целью выявления корреляционных взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При экспериментальной БК, начиная с 3-х сут, у животных фиксировалось увеличение частоты де-

фекаций, изменение консистенции кала, появление крови в каловых массах. На 5-е и 7-е сут наблюдения к указанным признакам добавлялось снижение массы тела и увеличение выраженности симптомов, что нашло отражение в статистически значимом увеличении индекса DAI на 3-и сут 7,00 [3,00-7,00] у.е.; в контроле 0 у.е. ($p<0,01$), на 5-е сут 8,00 [6,00-10,00] у.е., ($p<0,01$) и 7-е сут эксперимента 11,00 [11,00-11,00] у.е., ($p<0,01$).

В липидном экстракте слизистой оболочки толстого кишечника при БК на 3-и сут наблюдения увеличивалось в гептановой фракции количество первичных и вторичных продуктов, в изопропанольной – первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ (табл. 1). На 5-е сут – увеличивалось в гептановой фракции количество вторичных, в изопропанольной – первичных, вторичных продуктов ПОЛ, а на 7-е сут возрастало в гептановой фракции количество первичных и конечных продуктов, в изопропанольной – первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ. При БК зафиксировано накопление продуктов ПОЛ как в изопропанольной фазе липидного экстракта слизистой толстого кишечника, ко-

торая аккумулирует преимущественно фосфолипиды клеточных мембран, так и в гептановой фазе, то есть в триацилглицеридах.

Применение при экспериментальной БК ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы приводило к изменению клинической картины болезни: увеличивалась плотность стула, реже и в меньшей степени обнаруживалась кровь в каловых массах, что привело к уменьшению индекса активности болезни (на 3-и сут на уровне тенденции), а на 5-е и 7-е сут – статистически значимо: на 5-е сут 4,00 [4,00-5,00] у.е.; в контроле 8,00 [6,00-10,00] у.е., ($p<0,01$) и 7-е сут 4,00 [4,00-4,00] у.е.; в контроле 11,00 [11,00-11,00] у.е., ($p<0,01$).

Кроме этого, в гомогенате слизистой толстого кишечника снижалось содержание продуктов ПОЛ. Так, на 3-и и 5-е сутки наблюдения уменьшалось количество первичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе, а на 7-е сутки снижалось количество первичных продуктов в гептановой фазе, вторичных и конечных продуктов в изопропанольной фазе липидного экстракта (см. табл. 1). Анализ содержания продуктов ПОЛ в 1-й и 3-й группах позволяет констатировать на фоне применения экстракта куркумы их снижение

Таблица 1

Влияние локального применения экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиторий на содержание продуктов ПОЛ в слизистой оболочке толстого кишечника при экспериментальной БК (Ме [Q₂₅-Q₇₅])

Показатель, е.и.о.	Группа 1-я (n=7)	Группа 2-я 3-и сут (n=7)	Группа 2-я 5-е сут (n=7)	Группа 2-я 7-е сут (n=7)	Группа 3-я 3-и сут (n=7)	Группа 3-я 5-е сут (n=7)	Группа 3-я 7-е сут (n=7)	Группа 4-я 3-и сут (n=7)	Группа 4-я 5-е сут (n=7)	Группа 4-я 7-е сут (n=7)
ДК (г)	0,63 [0,55-0,60]	0,79 [0,79-0,81]*	0,66 [0,66-0,68]	0,75 [0,74-0,81]*	0,79 [0,77-0,82]*	0,61 [0,61-0,64]	0,72 [0,71-0,73]* #	0,63 [0,62-0,65]#&	0,63 [0,61-0,63]	0,74 [0,68-0,77]*
КДиСТ (г)	0,06 [0,05-0,06]	0,09 [0,06-0,09]*	0,17 [0,17-0,18]*	0,07 [0,06-0,09]	0,08 [0,06-0,08]	0,17 [0,16-0,17]*	0,06 [0,05-0,07]	0,09 [0,06-0,09]	0,15 [0,15-0,16]*	0,06 [0,06-0,06]
ШО (г)	0,01 [0,01-0,02]	0,01 [0,01-0,01]	0,02 [0,01-0,02]	0,03 [0,03-0,04]*	0,03 [0,03-0,03]	0,02 [0,01-0,02]	0,03 [0,02-0,03]*	0,02 [0,01-0,02]	0,01 [0,01-0,01]	0,02 [0,01-0,02]
ДК (и)	0,34 [0,32-0,36]	0,38 [0,38-0,45]*	0,53 [0,52-0,57]*	0,43 [0,41-0,45]*	0,35 [0,33-0,42]#	0,49 [0,47-0,52]*#	0,39 [0,38-0,41]*	0,32 [0,17-0,45]#	0,49 [0,48-0,51]*#	0,36 [0,36-0,38]#
КДиСТ (и)	0,31 [0,29-0,32]	0,61 [0,61-0,71]*	0,41 [0,38-0,41]*	0,51 [0,51-0,55]*	0,64 [0,56-0,71]*	0,34 [0,30-0,39]*	0,41 [0,41-0,44]* #	0,34 [0,29-0,36]#&	0,36 [0,34-0,37]*#	0,36 [0,33-0,39]*#&
ШО (и)	0,01 [0,01-0,02]	0,08 [0,08-0,11]*	0,01 [0,00-0,01]	0,14 [0,12-0,14]*	0,08 [0,06-0,09]*	0,01 [0,01-0,01]	0,09 [0,08-0,11]* #	0,06 [0,00-0,15]*	0,00 [0,00-0,01]	0,07 [0,06-0,07]* #

Примечание. * – значимые ($p<0,01$) различия с 1-й группой, # – со 2-й группой, & – с 3-й группой. Показатели отражают содержание продуктов ПОЛ в гептановой (г) и изопропанольной (и) фазах липидного экстракта гомогената слизистой оболочки толстого кишечника, е.и.о. – единицы индекса окисления, БК – болезнь Крона, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

и частичное восстановление: на 5-е сутки первичных продуктов в изопропанольной фазе, на 7-е сутки первичных продуктов в гептановой фазе, вторичных и конечных продуктов в изопропанольной фазе, а также полное восстановление уровня первичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе на 3-и сутки.

На следующем этапе было продемонстрировано, что применение 5-АСК приводило к снижению DAI на 5-е и 7-е сут эксперимента. Эффект 5-АСК сопоставим с эффектом экстракта куркумы, так как значимые отличия по показателю на 3-и, 5-е и 7-е сут отсутствуют ($p > 0,05$). При оценке содержания продуктов ПОЛ выявлено значимое снижение на 3-и сут первичных продуктов в гептановой изопропанольной фазе, вторичных продуктов в изопропанольной фазе, на 5-е сут - первичных и вторичных продуктов в изопропанольной фазе, на 7-е сутки — первичных, вторичных и конечных продуктов в изопропанольной фазе (табл. 1).

Итак, при экспериментальной БК наряду с утяжелением симптомов в виде снижения массы тела, увеличения частоты и изменения консистенции стула, наличия крови в каловых массах выявлено увеличение количества продуктов ПОЛ в слизистой, толстого кишечника. Полагаем, что эскалация оксидативного стресса, инициируемого продукцией АФК активированными нейтрофилами, моноцитами/макрофагами, эндотелиоцитами в очаге первичного повреждения в условиях дефицита активности и/или количества ферментов антиокислительной защиты приводит к дополнительному повреждению, дисфункции и гибели клеток толстого кишечника, расширению зоны вторичной альтерации и как следствие утяжелению симптомов в динамике БК. Установлено наличие корреляционных связей между показателем индекса активности болез-

ни и содержанием первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта слизистой оболочки толстого кишечника в динамике экспериментальной БК (табл. 2).

Обсуждение

Наиболее выраженный ПОЛ-ограничивающий эффект экстракта куркумы в толстом кишечнике зафиксирован в изопропанольной фазе липидного экстракта, что косвенно позволяет констатировать цитопротекторное действие в отношении фосфолипидов клеточных мембран. Особенности состава с наличием 2 фенольных гидроксильных групп делают куркумин уникальным классическим антиоксидантом [14]. Косвенный антиоксидантный эффект куркумина связан с его способностью ограничивать продукцию провоспалительных цитокинов, метаболитов арахидоновой кислоты, матриксных металлопротеиназ за счет ингибиции NF-каппаВ-зависимого пути, что приводит к снижению активности клеток-продуцентов АФК [15, 16].

Полагаем, что зафиксированный при БК ПОЛ-ограничивающий эффект экстракта куркумы в составе ректальных суппозиторий имеет значение в частичном сохранении структурной и функциональной активности толстого кишечника, препятствует прогрессированию болезни и тяжести ее симптомов. С использованием корреляционного анализа выявлено наличие связей между индексом активности болезни и показателями ПОЛ при экспериментальной БК в условиях локального применения экстракта куркумы (см. табл. 2).

Полученные результаты являются инициирующим фрагментом для изучения механизмов протекторного

Таблица 2

Корреляция между содержанием продуктов ПОЛ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника и индексом активности болезни при экспериментальной БК

Показатель, е.и.о.	Группа 2-я, 3-и сут (n=7)	Группа 2-я, 5-е сут (n=7)	Группа 2-я, 7-е сут (n=7)	Группа 3-я, 3-и сут (n=7)	Группа 3-я, 5-е сут (n=7)	Группа 3-я, 7-и сут (n=7)
ДК (г)	R=0,45	R=0,28	R=0,43	R=0,32	R=0,21	R=0,49
КДиСТ (г)	R=0,51	R=0,57	R=0,32	R=0,19	R=0,23	R=0,16
ШО (г)	R=0,23	R=0,19	R=0,43	R=0,23	R=0,14	R=0,14
ДК (и)	R=0,47	R=0,57	R=0,51	R=0,49	R=0,49	R=0,44
КДиСТ (и)	R=0,64	R=0,44	R=0,51	R=0,44	R=0,51	R=0,76
ШО (и)	R=0,32	R=0,28	R=0,67	R=0,32	R=0,21	R=0,55

Примечание. Значения коэффициента корреляции Спирмена (R) с индексом активности болезни (DAI, у.е.). Полу жирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) связи. Показатели отражают содержание продуктов ПОЛ в гептановой (г) и изопропанольной (и) фазах липидного экстракта гомогената слизистой оболочки толстого кишечника, е.и.о. - единицы индекса окисления.

действия экстракта куркумы при БК на доклиническом этапе и предпосылкой для внедрения новых лекарственных форм, содержащих экстракт куркумы, в клиническую практику.

Литература

(п.п. 1; 3; 5-9; 11; 12; 14-16 см. References)

2. *Болезнь Крона у взрослых: клинические рекомендации*. Государственное бюджетное учреждение «Курганская областная клиническая больница». 2016, Available at: <http://kokb45.ru/wp-content/uploads/2018/06/Bolezni-Krona-u-vzroslykh.pdf>
4. Пайзуллаева З.К., Александров В.Б. Нейроэндокринные изменения при воспалительных заболеваниях и раке толстой кишки. *Клиническая медицина*. 2010; 4: 56–60.
10. Гайдарова А.П., Корощенко Г.А., Айзман Р.И. Влияние куркумы и куркумина на углеводный обмен при аллоксан-индуцированном сахарном диабете у крыс. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; 5: 597.
13. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*. Челябинск: Изд-во ЧелГПУ, 2000.

References

1. Sales-Campos H., Basso P.J., Alves V.B.F., Fonseca M.T., Bonfá G., Nardini V. et al. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2014; 48(2): 96–107.
2. *Crohn's disease in adults: clinical recommendations. [Болезнь Крона у взрослых: клинические рекомендации]*. State budgetary institution "Kurgan regional clinical hospital. «Kurganskaya oblastnaya klinicheskaya bol'nitsa». 2016, Available at: <http://kokb45.ru/wp-content/uploads/2018/06/Bolezni-Krona-u-vzroslykh.pdf>. (in Russian)
3. Tian T., Wang Z., Zhang J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5506473/>; doi: 10.1155/2017/4535194 the-project
4. Payzullaeva Z.K., Aleksandrov V.B. *Neuroendocrine changes in inflammatory diseases and colon cancer. Klinicheskaya meditsina*. 2010; 4: 56–60. (in Russian)
5. Novak E.A., Mollen K.P. Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2015; 3: 62.
6. Te Velde A.A., Pronk I., de Kort F., Stokkers P.C. Glutathione peroxidase 2 and aquaporin 8 as new markers for colonic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases: an important role for H₂O₂? *European journal of gastroenterology and hepatology*. 2008; 20(6): 555–60.
7. Hiller F., Besselt K., Deubel S., Brigelius-Flohé R., Kipp A.P. GPx2 induction is mediated through STAT transcription factors during acute colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2015; 21(9): 2078–89.
8. Senhaji N., Kojok K., Darif Y., Fadainia C., Zaid Y. The contribution of CD40/CD40L axis in inflammatory bowel disease: an update. *Frontiers in immunology*. 2015; 6: 529.
9. Muthupalani S., Ge Z., Feng Y., Rickman B., Mobley M., McCabe A. et al. Systemic macrophage depletion inhibits Helicobacter bilis-induced proinflammatory cytokine-mediated typhlocolitis and impairs bacterial colonization dynamics in a BALB/c Rag2^{-/-} mouse model of inflammatory bowel disease. *Infection and immunity*. 2012; 80(12): 4388–97.
10. Gaydarova A.P., Koroschenko G.A., Ayzman R.I. Effect of turmeric and curcumin on carbohydrate metabolism in alloxan-induced diabetes in rats. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; 5: 597. (in Russian)
11. Morris G.P., Beck P.L., Herridge M.S., Depew W.T., Szewczuk M.R., Wallace J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989; 96: 795–803.
12. Cooper H.S., Murthy S.N., Shah R.S., Sedergran D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory investigation*. 1993; 69(2): 238–49.
13. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*. Челябинск: ЧЕЛГПУ, 2000. (in Russian)
14. Guo Y.L., Li X.Z., Kuang C.T. Antioxidant Pathways and Chemical Mechanism of Curcumin. *Advanced materials research*. 2011; 236-8: 2311–14.
15. Anthwal A., Thakur B.K., Rawat M.S., Rawat D.S., Tyagi A.K., Aggarwal B.B. Synthesis, characterization and in vitro anticancer activity of C-5 curcumin analogues with potential to inhibit TNF- α -induced NF- κ B activation. *BioMed research international*. 2014, Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4135142/>; doi: 10.1155/2014/524161, the-project.
16. Gupta, S.C., Tyagi A.K., Deshmukh-Taskar P., Hinojosa M., Prasad S., Aggarwal B.B. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014; 559: 91–9.

Сведения об авторах:

Осиков М.В., доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: prof.osikov@gmail.com;

Симонян Е.В., канд. фарм. наук, доцент, зав. каф. химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: elenasimonian@yandex.ru;

Бакеева А.Е., лаборант каф. химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: a.kurenkova01@yandex.ru;

Огнева О.И., канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: ognevaolga2@mail.ru

Обзоры

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Степанов И.А., Белобородов В.А., Шамеева М.А.

Молекулярные и клеточные механизмы резистентности глиобластомы к ингибиторам фактора роста эндотелия сосудов

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

Представлен обзор современных источников литературы, посвященных изучению молекулярных и клеточных механизмов резистентности глиобластомы к антиангиогенным лекарственным средствам. Ангиогенез представляет собой важнейший патофизиологический механизм роста и прогрессирования глиобластомы за счет активного развития микрососудистой сети. Ускоренное развитие микрососудистой сети в глиобластоме происходит благодаря синтезу опухолевыми клетками большого количества фактора роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Среди основных молекулярных и клеточных механизмов лекарственной устойчивости глиобластомы к анти-VEGF агентам принято относить VEGF-независимые пути ангиогенеза, активность клеток костного мозга и перicyтов, а также сосудистую кооперацию, периваскулярную инвазию и феномен аутофагии. Изложены современные данные о рациональном и наиболее эффективном использовании анти-VEGF-лекарственных средств у пациентов с глиомами высокой степени злокачественности. Обозначены актуальные, остающиеся нерешенными вопросы, что обуславливает необходимость проведения дальнейших экспериментальных и клинических исследований, посвященных изучению механизмов лекарственной устойчивости глиобластомы к анти-VEGF-препаратам.

Ключевые слова: глиобластома; ангиогенез; ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов; резистентность; VEGF-независимый ангиогенез; клетки костного мозга; перicyты; сосудистая кооперация; периваскулярная инвазия; аутофагия.

Для цитирования: Степанов И.А., Белобородов В.А., Шамеева М.А. Молекулярные и клеточные механизмы резистентности глиобластомы к ингибиторам фактора роста эндотелия сосудов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 137-145.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.137-145

Для корреспонденции: Степанов Иван Андреевич, e-mail: stepasnovivanneuro@gmail.com

Участие авторов: концепция и дизайн обзора – Степанов И.А., В.А. Белобородов; сбор источников в базах данных – Степанов И.А., Шамеева М.А.; обработка и структурирование материала – Шамеева М.А.; написание текста и редактирование – Степанов И.А., Белобородов В.А., Шамеева М.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Фонда содействия инновациям (проект № 14419ГУ/2019).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила 14.04.2020

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Stepanov I.A., Beloborodov V.A., Shameeva M.A.

Molecular and cellular mechanisms of glioblastoma resistance to vascular endothelial growth factor inhibitors

Irkutsk State Medical University,
Krasnogo Vosstaniya Str. 1, Irkutsk 664003, Russian Federation

This state-of-the-art review focuses on molecular and cellular factors associated with glioblastoma resistance to antiangiogenic drugs. Angiogenesis is an important pathophysiological mechanism for the growth and progression of glioblastoma facilitated by active development of microvasculature. The accelerated development of the microvascular network in glioblastoma occurs due to the synthesis of a large number of vascular endothelial growth factor (VEGF) by tumor cells. Among the major molecular and cellular factors, glioblastoma drug resistance to anti-VEGF agents is commonly attributed to VEGF-independent pathways of

angiogenesis, bone marrow cell and pericyte activity as well as to vascular co-option, perivascular invasion, and the phenomenon of autophagy. The authors provided current data on the rational and most effective use of anti-VEGF drugs for patients with high-grade gliomas. Relevant unsolved problems associated with drug resistance of glioblastoma to anti-VEGF drugs were highlighted.

Keywords: glioblastoma; angiogenesis; vascular endothelial growth factor inhibitors; resistance; VEGF-independent angiogenesis; bone marrow cells; pericytes; vascular co-option; perivascular invasion; autophagy.

For citation: Stepanov I.A., Beloborodov V.A., Shameeva M.A. Molecular and cellular mechanisms of glioblastoma resistance to vascular endothelial growth factor inhibitors. *Patologicheskaya Fiziologiya I Experimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal)*. 2020; 64(3): 137-145. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.137-145

For correspondence: **Stepanov Ivan Andreevich**, Assistant of the Department of General Surgery and Anesthesiology of Irkutsk State Medical University (Russia). E-mail: stepanovivanneuro@gmail.com.

Contribution: research concept and design – Stepanov I.A., Beloborodov V.A.; collecting sources in databases – Stepanov I.A., Shameeva V.A.; processing and material structuring – Shameeva V.A.; text writing and editing – Stepanov I.A., Beloborodov V.A., Shameeva M.A. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgments. The study was supported by a grant from the Foundation. promote innovation (project No. 14419GU / 2019).

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

Received 14.04.2020

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Глиобластома является наиболее агрессивной первичной опухолью центральной нервной системы и, как правило, характеризуется неблагоприятным прогнозом [1, 2]. Так, медиана выживаемости пациентов с глиобластомой после выполнения микронейрохирургической резекции и проведения стандартной химио- и лучевой терапии составляет не более 14–16 мес, при этом значение 2-летней выживаемости указанной группы пациентов варьирует от 26 до 33 % [3]. Ангиогенез представляет собой важнейший патофизиологический механизм роста и прогрессирования глиобластомы за счет активного развития микрососудистой сети [4]. Ускоренное развитие микрососудистой сети в глиобластоме происходит благодаря синтезу опухолевыми клетками большого количества фактора роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) [5]. Необходимо отметить, что микрососудистая сеть глиобластомы характеризуется высокой степенью извитости, повышенной проницаемостью, а также увеличенным диаметром просвета сосудов и утолщенной базальной мембраной [6, 7]. Принято считать, что указанные особенности гистоархитектоники и строения микрососудистой сети глиобластомы усиливают гипоксию опухолевой ткани, тем самым снижая эффективность применения цитотоксических лекарственных средств [8]. Именно по этой причине разработка и использование анти-VEGF-лекарственных препаратов представляется одним из наиболее перспективных способов молекулярного таргетного лечения пациентов с глиобластомой, т. к. ингибиро-

вание васкулогенеза снижает поступление питательных веществ в клетки опухолевой ткани.

Эффективность использования анти-VEGF-лекарственных средств в терапии глиобластомы наглядно продемонстрирована в ряде рандомизированных контролируемых клинических исследований, а также подтверждена в систематических обзорах и метаанализах [9–11]. Однако широкое применение анти-VEGF препаратов в нейроонкологической практике привело к развитию резистентности глиобластомы к лекарственным препаратам данной группы [12]. Формирование лекарственной устойчивости глиобластомы к анти-VEGF агентам связано с молекулярными и клеточными особенностями поведения опухолевых клеток [13–16]. Поиск источников литературы в научных базах данных Pubmed, Medline, EMBASE, Cochrane Library и eLibrary продемонстрировал наличие единичных исследований, посвященных изучению молекулярных и клеточных механизмов резистентности глиобластомы к анти-VEGF-агентам.

Цель исследования – анализ современных источников литературы, посвященных изучению молекулярных и клеточных механизмов резистентности глиобластомы к анти-VEGF-лекарственным средствам.

VEGF-независимые пути ангиогенеза. Доказано, что одним из основных механизмов развития лекарственной устойчивости глиобластомы к анти-VEGF-агентам является активация VEGF-независимых путей ангиогенеза. В исследовании G. Bergers и соавт. [17] наглядно показано, что блокирование рецепторов VEGF-A на поверхности опухолевых клеток в моделях глиом приводит

к активации альтернативных VEGF-A-независимых путей васкулогенеза. По мнению O. Casanovas и соавт. [18] основными факторами, стимулирующими альтернативные механизмы развития микроваскулярной сети в глиобластоме, выступают VEGF-C, VEGF-D, плацентарный фактор роста (Placental Growth Factor, PLGF), а также фактор роста тромбоцитов (Platelet-derived Growth Factor, PDGF) и фактор роста фибробластов (Fibroblast Growth Factor, FGF) (рис.). В наблюдении T. Batchelor и соавт. [19] отмечено, что у пациентов, принимающих цедраниб (ингибитор тирозинкиназ рецептора VEGF2, рецепторов α и β тромбоцитарного фактора роста (PDGF), рецепторов фактора роста стволовых клеток (SCF)) по поводу рецидива глиобластомы, часто наблюдается резистентность к данному средству за счет активации FGF-зависимого пути ангиогенеза. У исследуемой группы пациентов кратковременный эффект ответа опухоли сменялся фазой роста и прогрессирования глиобластомы. Более того, авторами исследования наглядно продемонстрировано, что в периферической крови пациентов в фазу ответа уровень проангиогенного белка FGF был существенно ниже в сравнении с уровнем данного фактора в фазу роста и прогрессирования глиобластомы. Необходимо отметить, что сунитиниб (низкомолекулярный поливалентный ингибитор тирозинкиназ), действующий на целый ряд путей ангиогенеза, не продемонстрировал своей эффективности в лечении глиобластомы на этапах доклинических и клинических испытаний [20, 21].

Роль клеток костного мозга в ангиогенезе. Использование анти-VEGF-лекарственных средств приводит к развитию гипоксии опухолевой ткани, что является индуцирующим фактором привлечения клеток костного мозга в опухоль [17]. Наиболее часто встречаются клетки-предшественники эндотелиоцитов (Endothelial Progenitor Cells, EPC), перицитов (Pericyte Progenitor Cells, PPC) и сосудистые клетки-модуляторы CD45+ (рис.) [17]. Нарастание гипоксии опухолевой ткани стимулирует синтез опухолевыми клетками большого количества гипоксией индуцируемого фактора 1- α (Hypoxia-inducible Factor 1- α , HIF 1- α), что в свою очередь приводит к усиленной экспрессии проангиогенных факторов: стромального клеточного фактора 1- α и белка VEGF [22]. Кроме того, HIF 1- α способствует формированию микроваскулярной сети в гипоксических очагах за счет синтеза опухолевыми и нормальными клетками других стимуляторов ангиогенеза, таких как VEGF-A, VEGFR1, PDGF-B, FGF-2 и ангиопоэтинов [22]. Таким образом, привлечение клеток костного мозга в ткань опухоли представляет собой еще один механизм активации ангиогенеза и лекарственной устойчивости глиобластомы к анти-VEGF-агентам. Приме-

нение ингибиторов активности макрофагов/моноцитов в сочетании с антиангиогенными лекарственными средствами рассматривается в качестве перспективного способа преодоления резистентности глиобластомы к действию данной группы препаратов [14]. В исследовании J. Liang и соавт. [23] отмечено, что использование комбинации анти-VEGF-лекарственных средств и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора 1 (Colony Stimulating Factor 1 (Granulocyte-Macrophage), GM-CSF 1) не позволяет эффективно снизить интенсивность процессов ангиогенеза в модели глиомы высокой степени злокачественности. Вероятной причиной низкой эффективности комбинированного использования анти-VEGF-агентов и GM-CSF 1 выступает нейтрофильная инфильтрация опухолевой ткани, что значительно повышает ее устойчивость к действию антиангиогенных препаратов [23].

Роль перицитов в ангиогенезе. Перициты представляют собой соединительнотканые отростчатые клетки, окруженные базальной мембраной и охватывающие эндотелиальную трубку. Они впервые были описаны в 1868 г. отечественными гистологами А.Е. Голубевым и А.В. Ивановым, а позднее (в 1873 г.) Руже (клетки Руже) [24]. Вместе с базальной мембраной перициты выполняют опорную функцию, подобно адвентициальной оболочке стенки сосудов. Перициты принимают участие в продукции основных компонентов базальной мембраны, в регуляции сосудистого тонуса, о чем свидетельствуют не только наличие сократительных белков в цитоплазме, но и нейроперицитарные синапсы [25]. Перициты участвуют в передаче информации об изменении химического состава интерстиция. Морфологическим субстратом такого контроля могут служить эндотелиоперицитарные контакты, а также наличие пиноцитозных пузырьков на интерстициальной стороне перицита [26].

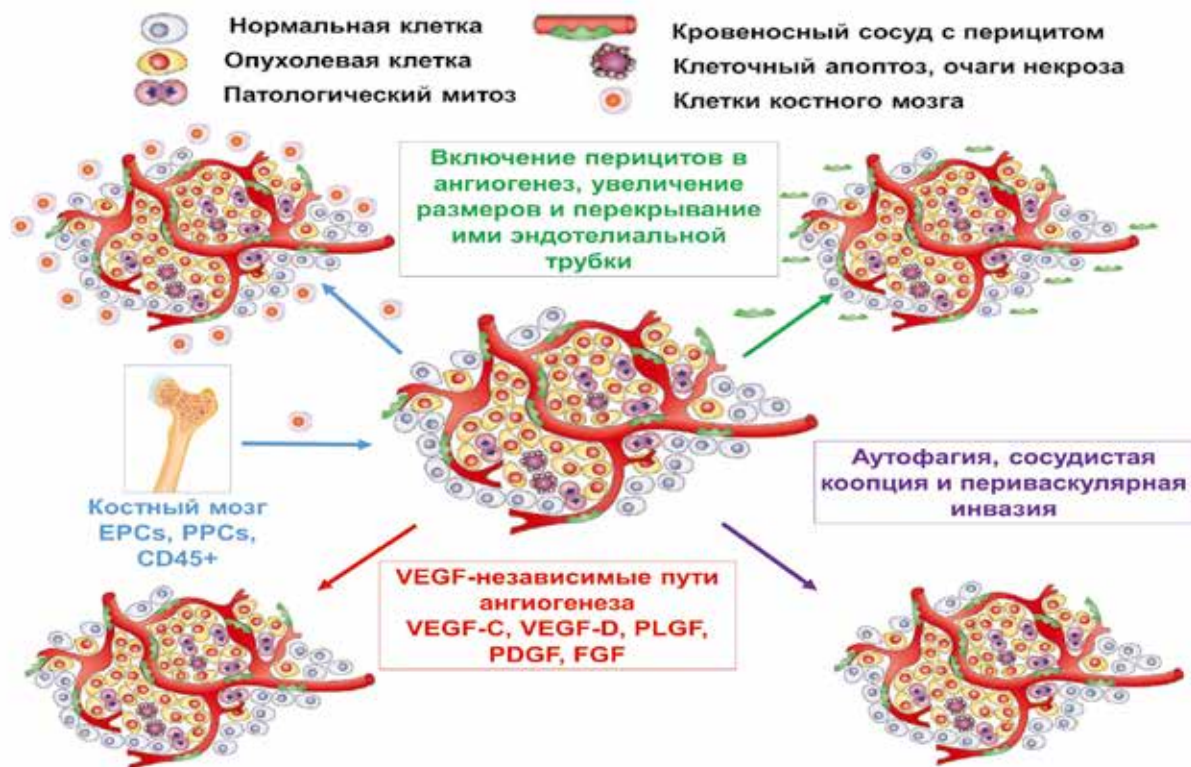
Принято считать, что перициты принимают активное участие в васкулогенезе (рис.). Так, в исследованиях P. Valuk и соавт. [27] и K. Barlow и соавт. [28] наглядно показано, что сосудистая стенка опухолей, устойчивая к действию антиангиогенных лекарственных средств, богата перицитами. Предполагается два возможных механизма участия перицитов в ангиогенезе: 1) перициты непосредственно стимулируют рост и деление эндотелиальных клеток без активации VEGF-зависимого пути и 2) собственно перициты продуцируют белок VEGF, тем самым активируя VEGF-зависимый путь васкулогенеза [27, 28]. Несмотря на тот факт, что некоторые анти-VEGF лекарственные средства блокируют VEGFR эндотелиоцитов, данная группа препаратов не влияет на работу перицитарных

VEGFR [28]. Стоит предположить, что активация VEGFR перicyтов и отсутствие влияния анти-VEGF-агентов на последние являются одними из основных механизмов лекарственной устойчивости глиобластомы к действию данной группы лекарственных средств.

Увеличение размеров перicyтов и перекрытие ими эндотелиальной трубки выступают еще одними важнейшими механизмами формирования резистентности опухолей, в том числе и глиобластомы [29]. Увеличение размеров перicyтов связано с действием белка PDGF [30]. Кроме того, PDGF участвует в привлечении в опухолевую ткань EPC из костного мозга, которые также способны перекрывать эндотелий и тем самым препятствовать действию анти-VEGF-лекарственных средств [30]. Предполагается, что комбинированное применение анти-PDGF- и анти-VEGF-агентов позволит эффективно снизить интенсивность процессов ангиогенеза в опухолевой ткани [31].

Сосудистая коопция и периваскулярная инвазия. Как известно, некоторые злокачественные опухоли способны активно расти и прогрессировать без процесса ангиогенеза, используя ранее сформированные нор-

мальные сосуды ткани или органа [32]. Такой способ развития опухолевой ткани принято называть сосудистой коопцией. Другими словами, сосудистая коопция — это универсальный процесс туморогенеза, при котором не происходит формирование новой микроваскулярной сети, а опухолевая ткань «поглощает» уже имеющиеся нормальные сосуды, используя их в дальнейшем для собственного развития (**рис.**). Тем не менее, сосудистая коопция не способна обеспечивать полноценный метаболизм опухолевых клеток, что связано с быстрым увеличением массы и объема опухоли [33]. По мнению Н. Kindler и соавт. [34], некоторые гистологические типы опухолей активно проявляют свойства сосудистой коопции и поэтому имеют изначальную резистентность к действию антиангиогенных лекарственных средств. Если опухолевые клетки расположены в непосредственной близости от нормальной микрососудистой сети и их метаболизм поддерживается диффузией питательных веществ, то необходимости в ангиогенезе нет. Данная особенность питания опухолей продемонстрирована в работе J. Rubenstein и соавт. [35], где у мышей, получавших моноклональные



Молекулярные и клеточные механизмы резистентности глиобластомы к анти-VEGF-лекарственным средствам: объяснение в тексте.

антитела к VEGF, отмечено формирование неоплазий в области уже сформированной нормальной микрососудистой сети. Аналогичные результаты получены в исследовании J. Holash и соавт. [36]. Современные теории канцерогенеза предполагают, что белок с-Met и/или интегринны ответственны за инвазивный агрессивный рост VEGF-резистентной глиобластомы [37].

Феномен аутофагии. Аутофагия – это процесс утилизации клеточных органелл и переработки клеточных структурных элементов, который может привести к гибели клетки [38]. Однако процесс аутофагии для клетки служит не только механизмом гибели, но и способом избавления от долгоживущих белков и поврежденных органелл, а также является важнейшим участником процессов метаморфоза, дифференцировки и трансформации клеток [38]. Принято различать 3 типа аутофагии: микро-, макро- и шаперонзависимая аутофагии [39].

Необходимо отметить, что аутофагия представляет собой основной защитный клеточный механизм при развитии гипоксических состояний, который не требует ремоделирования ткани и внеклеточного матрикса [40]. Как уже отмечалось ранее, применение анти-VEGF-агентов приводит к развитию гипоксии опухолевой ткани по причине нарушения процесса ангиогенеза, необходимого для роста и прогрессирования неоплазии. Тем не менее некоторые гистологические типы опухолей имеют лекарственную устойчивость к антиангиогенным препаратам и способны непрерывно поддерживать образование микроваскулярной сети. Одним из основных механизмов резистентности опухолей к анти-VEGF-лекарственным средствам выступает аутофагия (рис.). В работе Y.-L. Hu и соавт. [41] отмечено, что опухолевые клетки при действии антиангиогенных агентов активно проявляют свойства как неселективной, так и селективной аутофагии. Неселективная аутофагия включает в себя HIF-зависимый и HIF-независимый пути. Неселективная HIF-зависимая аутофагия (уровень содержания кислорода варьирует от 0,1 до 3 %) индуцируется гипоксическими состояниями и опосредуется через ряд генов и протеинов, таких как BNIP 3, NIX, секвестосома/p62, DJ-1, а также семейство белков PDGFR [42]. Неселективная HIF-независимая аутофагия (уровень содержания кислорода составляет менее 0,1 %) ассоциирована с работой AMPK-mTOR-внутриклеточных сигнальных путей и наблюдается при тяжелом кислородном голодании клетки [43]. Селективная аутофагия представляет собой деградацию убиквитиновых белковых комплексов, которые связаны с протеином p62, являющимся «меткой» для данного процесса [44]. Принято считать, что процесс аутофагии в опухолевых клетках направлен на разрушение белков и сигнальных молекул,

образующихся при гипоксических состояниях, что приводит к сохранению внутриклеточных структур и нивелированию вторичных эффектов антиангиогенных лекарственных средств [44].

Предполагается, что в глиобластоме лекарственная устойчивость к бевацизумабу связана с неселективной HIF-зависимой аутофагией, опосредованной через активность белков BNIP 3 и HIF 1- α [45]. Более того, в образцах глиобластомы пациентов, имеющих резистентность к бевацизумабу, выявлена статистически значимо более высокая концентрация белка BNIP 3, в отличие от образцов опухолевой ткани пациентов, находящихся на старте антиангиогенной молекулярной таргетной терапии. Авторы данного исследования также пришли к заключению, что фармакологическое и генетическое ингибирование процесса аутофагии *in vitro* значительно повышало чувствительность глиобластомы к действию бевацизумаба [45].

Повышенная экспрессия гена BNIP 3 приводит к активации работы AMPK-сигнального пути через взаимодействие с комплексом Beclin 1/Bcl-2, ответственным за процесс аутофагии [45]. M. Paez-Ribes и соавт. [46] считают, что активность AMPK- и HIF 1- α внутриклеточных сигнальных путей ответственна за изменение метаболизма опухолевых клеток в условиях гипоксии, их резистентности к действию антиангиогенных препаратов, а также роста и прогрессирования неоплазии. С другой стороны, в исследовании H. Huang и соавт. [47] показано, что аутофагия способствует лекарственной устойчивости опухолей к бевацизумабу за счет снижения активности mTOR-сигнального пути. Подобно глиобластоме, работа AMPK- и mTOR-внутриклеточных сигнальных путей в клетках гепатоцеллюлярной карциномы приводит к развитию их устойчивости к действию анти-VEGF-агентов [47]. Важно подчеркнуть, что лечение колоректального рака с помощью бевацизумаба лишь стимулирует неселективную HIF-зависимую аутофагию клеток неоплазии, а потому обладает низкой клинической эффективностью [48]. Бесспорно, разработка и использование ингибиторов аутофагии может способствовать повышению чувствительности различных опухолей, в том числе и глиобластомы, к действию анти-VEGF лекарственных средств. К настоящему моменту в доклинических испытаниях исследуется эффективность нескольких ранних и поздних ингибиторов аутофагии. Основные фармакодинамические характеристики исследуемых ингибиторов аутофагии представлены в **таблице**.

Будущее антиангиогенной лекарственной терапии. Безусловно, первоочередной задачей эффективного

использования антиангиогенных лекарственных средств является расчет их оптимальной биологической дозы с целью максимального подавления процесса ангиогенеза в опухолевой ткани. Использование анти-VEGF лекарственных средств в комбинации с агентами, влияющими на микроокружение опухоли, не улучшает противоопухолевую активность последних [49]. Стоит отметить, что подбор оптимальной дозы антиангиогенных препаратов на начальных этапах молекулярной таргетной терапии неоплазий должен нормализовать и/или усилить внутриопухолевую микроциркуляцию. Это позволит эффективно доставлять в опухолевую ткань цитотоксические агенты и усилить ее ответ на проводимую лучевую терапию [50]. Идеаль-

но сбалансированная доза анти-VEGF-лекарственных средств будет постепенно снижать интенсивность процессов ангиогенеза в ткани опухоли, не позволяя достигать быстрой редукции микрососудистого русла, что наблюдается при назначении высоких терапевтических доз [51]. В работе K. Field и соавт. [52] доказано, что применение оптимальных сбалансированных доз антиангиогенных препаратов позволяет существенно увеличить эффективность проводимой иммунотерапии на стадии доклинических исследований. По этой причине тщательный расчет и подбор оптимальной дозы анти-VEGF-лекарственных средств представляется важнейшим этапом проводимой молекулярной таргетной терапии, химио- и радиотерапии в достиже-

Таблица

Ранние и поздние ингибиторы аутофагии, исследуемые на доклинических стадиях [48]

Класс ингибиторов	Наименование	Ингибируемая стадия аутофагии	Ингибируемая сигнальная молекула
Ранние	3-метиадин	Индукция	PI3K
	GSK-2126458		
	LY294002		
	PT210		
	Вортманнин		
	N-метил-N-[(4-метилфенокси)-морфолин-4-ульфосфорил]метанамин	Индукция	ULK
	MRT68921		
	SBI-0206965		
	PIK-III	Нуклеация фагосомы/ формирование аутофагосомы	Vps-34
	SAR405		
	Вертепрофин		
	VPS34-IN1		
	NSC185058		
6-[(2R)-4-(4-бензил-7-хлоро-1-фталазинил)-2-метил-1-пиперазинил]никотинитрил			
6-флуоро-N-(4-флуоробензил)-4-квинозолинамин	Ацидификация аутофагосомы	V-АТФазы	
Бафломицин А1			
Поздние	E64d	Расщепление эндоцитозного содержимого	Протеазы
	Лейпептин		
	Пепстатин А		
	ARN5187		
	Хлорохин		
	Кломипрамин		Лизосомы
	Гидрохлорохин		
	Люкантон		
	Lys05		
	ROC325		
	{{1-[3-(диметиламино)пропил]-4(1H)-пиридинилидин} метил(оксо)аммоний хлорид гидрохлорид		

Примечание. PI3K – фосфоинозитид-3-киназа, ULK – unc-51-подобная киназа 1, Atg4 – аутофаго-регулирующая протеаза 4, Vps-34 – специфическая киназа Vps-34, регулирующая процесс аутофагии.

нии максимального ответа опухоли на действие последних.

Одним из современных методов определения оптимальных терапевтических доз анти-VEGF-агентов является МРТ-визуализация опухолевой ткани с биомаркерами при назначении минимальных и максимальных доз препаратов. МРТ-исследование с применением K^{trans} , в режимах T1-взвешенных изображений и динамической визуализации с высокой точностью определяет временной период восстановления микрососудистой сети опухолевой ткани в зависимости от назначаемой терапевтической дозы антиангиогенных лекарственных средств [53]. Пожалуй, основным ограничением данного метода определения оптимальных терапевтических доз анти-VEGF-агентов являются длительный временной период и назначение различных схем дозирования препаратов.

Другой не менее важной задачей проводимой молекулярной антиангиогенной таргетной терапии глиобластомы является комбинирование различных лекарственных средств с доказанной клинической эффективностью. В настоящее время в клинической нейроонкологии отсутствуют убедительные доказательства в пользу клинической эффективности комбинированного применения различных анти-VEGF-агентов. В обзоре I. Arrillaga-Romany и соавт. [54] отмечено, что комбинации различных анти-VEGF-лекарственных средств уступают в антиангиогенной активности монотерапии бевацизумабом. По мнению I.K. Mellinshoff и соавт. [55], эффективность применения цитотоксических препаратов может быть значительно повышена при их комбинации с ингибиторами ключевых внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за рост и прогрессирование глиом высокой степени злокачественности. Некоторые исследователи считают, что применение антиангиогенных препаратов в виде пульс-терапии может обладать более высокой противоопухолевой активностью в сравнении со стандартными терапевтическими дозами при обязательном контроле развивающихся нежелательных лекарственных реакций [56].

В современной клинической онкологии все большую популярность набирает персонифицированная терапия с применением определенных групп противоопухолевых лекарственных средств и их комбинаций, эффективность которых изучена с помощью специфических маркеров до использования данных препаратов. Без сомнения, применение биомаркерного анализа у определенной группы пациентов, предварительно имеющих высокую вероятность ответа на использование анти-VEGF агентов по поводу злокачественных опу-

холей различной локализации, позволит повысить их противоопухолевую активность и избежать широкого необоснованного применения данной группы лекарственных средств. При этом у той группы пациентов, которые заведомо имеют низкую вероятность ответа на применение антиангиогенных препаратов, необходимо рассматривать альтернативные методы лекарственной терапии [57]. В исследовании D. Lambrechts и соавт. [58] показано, что наличие в периферической крови пациентов коротких изоформ VEGF ассоциировано с увеличением выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости. Стоит отметить, что эффективность антиангиогенных лекарственных средств может быть повышена путем определения специфических молекулярных биомаркеров опухолевого микроокружения, которое также активно участвует в процессе ангиогенеза [58].

По мнению некоторых исследователей, использование анти-VEGF-лекарственных средств может приводить к переходу глиобластомы в более агрессивный фенотип [59, 60]. Так, в работе С. Brennan и соавт. [60] отмечено, что использование антиангиогенных препаратов *in vitro* способствует мезенхимальной трансформации глиобластомы, имеющей более быстрый и агрессивный рост. Однако результаты последних крупных рандомизированных контролируемых клинических исследований, систематических обзоров и мета-анализов наглядно продемонстрировали отсутствие различий в общей выживаемости пациентов, принимающих стандартную химиолучевую терапию и комбинацию последней с бевацизумабом [9-11, 61]. Учитывая результаты данных исследований, можно утверждать, что применение анти-VEGF-агентов не приводит к трансформации глиобластомы в более агрессивный фенотип. Вероятнее всего, данная группа лекарственных средств не позволяет достигнуть необходимого терапевтического эффекта.

Заключение

Несмотря на тот факт что антиангиогенные лекарственные средства не продемонстрировали высокую клиническую эффективность в терапии глиобластомы, данная группа препаратов по-прежнему играет немаловажную роль во вспомогательной терапии пациентов с глиомами высокой степени злокачественности. Дальнейшие научные поиски современной фундаментальной онкологии должны быть направлены на подробное изучение молекулярных и клеточных механизмов ангиогенеза, фармакодинамики анти-VEGF-агентов, подбор оптимальных терапевтических доз данной группы лекарственных средств, а также опре-

деление специфических биомаркеров эффективности использования ингибиторов VEGF и внедрение персонализированного использования последних в клиническую практику. Факт резистентности глиобластомы к действию анти-VEGF-препаратов лишь подчеркивает необходимость изучения данной проблемы с целью наиболее оптимального использования молекулярной антиангиогенной таргетной терапии в комбинации со стандартными методами лечения указанной группы пациентов.

Литература

(п.п. 1-3; 5-10; 12-23; 25-31; 33-37; 39-61

см. References)

4. Бывальцев В.А., Степанов И.А., Белых Е.Г., Яруллина АИ. Молекулярные аспекты ангиогенеза в глиобластомах головного мозга. *Вопросы онкологии*. 2017;1:19–27.
11. Бывальцев В.А., Степанов И.А., Шамеева М.А., Тетюшкин Н.А. Эффективность применения ингибиторов фактора роста эндотелия сосудов в лечении глиобластомы: систематический обзор и метаанализ. *Вопросы онкологии*. 2019;65(4):546–55.
24. Черток В.М., Черток А.Г., Зенкина В.Г. Эндотелиозависимая регуляция ангиогенеза. *Цитология*. 2017;59(4):243–58.
32. Варламов А.В., Пальцева Е.М., Секачева М.И. и др. Влияние предоперационной лекарственной терапии на экспрессию маркеров ангиогенеза в метастазах колоректального рака в печени. *Архив патологии*. 2017;1:36–42.
38. Ковалева О.В., Шитова М.С., Зборовская И.Б. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? *Клиническая онкогематология*. 2014;7(2):103–13.
8. Ebos J.M., Kerbel R.S. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8: 210–21.
9. Cloughesy T., Finocchiaro G., Belda-Iniesta C., Recht L., Brandes A.A., Pineda E. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase II study of onartuzumab plus bevacizumab versus placebo plus bevacizumab in patients with recurrent glioblastoma: efficacy, safety, and hepatocyte growth factor and O 6-methylguanine–DNA met. *J Clin Oncol*. 2017;35:343–51.
10. Xiao Q., Yang S., Ding G., Luo M. Anti-vascular endothelial growth factor in glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci*. 2018;39(12):2021–31.
11. Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Shameeva M.A., Tetyushkin N.A. Effectiveness of vascular endothelial growth factor inhibitors in the treatment of glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Voprosy onkologii*. 2019;65(4):546–55. (in Russian)
12. Soda Y., Myskiw C., Rommel A., Verma I. Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme. *J Mol Med. (Berl)*. 2013;91:439–48.
13. Jahangiri A., De Lay M., Miller L. et al. Gene expression profile identifies tyrosine kinase c-Met as a targetable mediator of antiangiogenic therapy resistance. *Clin Cancer Res*. 2013;19:1773–83.
14. Rapisarda A., Melillo G. Role of the hypoxic tumor microenvironment in the resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resist Updat*. 2009;12:74–80.
15. Piao Y., Liang J., Holmes L. et al. Acquired resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma is associated with a mesenchymal transition. *Clin Cancer Res*. 2013;19:4392–403.
16. Rigamonti N., Kadioglu E., Keklikoglou I. et al. Role of Angiopoietin-2 in Adaptive Tumor Resistance to VEGF Signaling Blockade. *Cell Report*. 2014;8(3):696–706.
17. Bergers G., Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:592–603.
18. Casanovas O., Hicklin D.J., Bergers G., Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell*. 2005;8:299–309.
19. Batchelor T.T., Sorensen A.G., di Tomaso E. et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cel*. 2007;11:83–95.
20. Piao Y., Liang J., Holmes L. et al. Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy is associated with myeloid cell infiltration, stem cell accumulation, and a mesenchymal phenotype. *Neuro Oncol*. 2012;14:1379–92.
21. Hutterer M., Nowosielski M., Haybaeck J. et al. A single-arm phase II Austrian/German multicenter trial on continuous daily sunitinib in primary glioblastoma at first recurrence (SURGE 01-07). *Neuro Oncol*. 2014;16:92–102.
22. Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E.. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359:843–5.
23. Liang J., Piao Y., Holmes L. et al. Neutrophils promote the malignant glioma phenotype through S100A4. *Clin Cancer Res*. 2014;20:187–98.
24. Chertok V.M., Chertok A.G., Zenkina V.G. Endothelial-dependent of the regulation of angiogenesis. *Tsitologiya*. 2017;59(4):243–58. (in Russian)
25. Wang S., Cao C., Chen Z. et al. Pericytes regulate vascular basement membrane remodeling and govern neutrophil extravasation during inflammation. *PLoS One*. 2012;7(9):e45499.

References

1. Ostrom Q.T., Gittleman H., Fulop J., Liu M., Blanda R., Kromer C. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro-Oncology*. 2015; 17 Suppl 4:iv1–iv62.
2. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131:803–20.
3. Touat M., Idbaih A., Sanson M., Ligon K.L. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol*. 2017;28(7):1457–72.
4. Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Belykh E.G., Yarullina A.I. Molecular aspects of angiogenesis in brain glioblastomas. *Voprosy onkologii*. 2017;1:19–27. (in Russian)
5. Chen M., Ba H., Lu C., Dai J., Sun J. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Promotes Angiogenesis through the Demethylation of the Fibromodulin (FMOD) Promoter in Glioblastoma. *Med Sci Monit*. 2018;24:6137–43.
6. Bougnaud S., Golebiewska A., Oudin A. et al. Molecular crosstalk between tumour and brain parenchyma instructs histopathological features in glioblastoma. *Oncotarget* 2016;7(22):31955–71.
7. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285:1182–6.

26. Hosaka K., Yang Y., Seki T. et al. Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(38):E5618–E5627.
27. Baluk P., Hashizume H., McDonald D.M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2005;15(1):102–11.
28. Barlow K.D., Sanders A.M., Soker S. et al. Pericytes on the Tumor Vasculature: Jekyll or Hyde? *Cancer Microenvironment*. 2012;31;6 (1):1–17.
29. Erber R., Thurner A., Katsen A.D. et al. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *The FASEB Journal*. 2004;18(2):338–40.
30. Jain R.K. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science*. 2005;307(5706):58–62.
31. Bergers G., Song S., Meyer-Morse N. et al. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(9):1287–95.
32. Varlamov A.V., Paltseva E.M., Sekacheva M.I., Skipenko O.G., Fedorov D.N. Impact of preoperative drug therapy on the expression of angiogenesis markers in colorectal liver metastases. *Arkhiv patologii*. 2017;1:36–42. DOI: 10.17116/ptol201779136-42. (in Russian)
33. Frentzas S., Simoneau E., Bridgeman V.L. et al. Vessel co-option mediates resistance to anti-angiogenic therapy in liver metastases. *Nat Med*. 20016;22(11):1294–302.
34. Kindler H.L., Bylow K. Pancreatic cancer: An update. *Current Oncology Reports*. 2007;26;9(3):170–6.
35. Rubenstein J.L., Kim J., Ozawa T. et al. Anti-VEGF Antibody Treatment of Glioblastoma Prolongs Survival But Results in Increased Vascular Cooption. *Neoplasia*. 2000;2(4):306–14.
36. Holash J. Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF. *Science*. 1999;284(5422):1994–8.
37. Kuczynski E.A., Vermeulen P.B., Pezzella F. et al. Vessel co-option in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(8):469–93.
38. Kovaleva O.V., Shitova M.S., Zborovskaya I.B. Autophagy: cell death or survival strategy? *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2014;7(2):103–13. (in Russian)
39. Galluzzi L., Pietrocola F., Bravo-San Pedro J.M. et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J*. 2015;34(7):856–80.
40. Goldsmith J., Levine B., Debnath J. Autophagy and cancer metabolism. *Methods Enzymol*. 2014;542:25–57.
41. Hu Y-L., Jahangiri A., DeLay M., Aghi M.K. Tumor Cell Autophagy as an Adaptive Response Mediating Resistance to Treatments Such as Antiangiogenic Therapy. *Cancer Research*. 2012;22;72(17):4294–9.
42. Mathew R., Karp C.M., Beaudoin B. et al. Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. *Cell*. 2009;137(6):1062–75.
43. Mazure N.M., Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Current Opinion in Cell Biology*. 2010;22(2):177–80.
44. Kirkin V., McEwan D.G., Novak I., Dikic I. A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Molecular Cell*. 2009;34(3):259–69.
45. Hu Y-L., DeLay M., Jahangiri A. et al. Hypoxia-Induced Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Adaptation to Antiangiogenic Treatment in Glioblastoma. *Cancer Research*. 2012;72(7):1773–83.
46. Pàez-Ribes M., Allen E., Hudock J. et al. Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. *Cancer Cell*. 2009;15(3):220–31.
47. Huang H., Song J., Liu Z. et al. Autophagy activation promotes bevacizumab resistance in glioblastoma by suppressing Akt/mTOR signaling pathway. *Oncology Letters*. 2017;15(2): 1487–94. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7446>
48. Zhao Z., Xia G., Li N. et al. Autophagy Inhibition Promotes Bevacizumab-induced Apoptosis and Proliferation Inhibition in Colorectal Cancer Cells. *Journal of Cancer*. 2018;9(18):3407–16.
49. De Groot J.F. High-dose antiangiogenic therapy for glioblastoma: less may be more? *Clin Cancer Res*. 2011;17:6109–11.
50. Huang Y., Goel S., Duda D.G., et al. Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2013;73:2943–8.
51. Maycotte P., Aryal S., Cummings C.T. et al. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy*. 2012;8(2):200–12.
52. Field K.M., Simes J., Nowak A.K., Cher L., Wheeler H., Hovey E.J. et al. Randomized phase 2 study of carboplatin and bevacizumab in recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2015;17:1504–13.
53. El-Kenawi A.E., El-Remessy A.B. Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. *Br J Pharmacol*. 2013;170(4):712–29.
54. Arrillaga-Romany I., Reardon D.A., Wen P.Y. Current status of antiangiogenic therapies for glioblastomas. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014;23:199–210.
55. Mellingshoff I.K., Lassman A.B., Wen P.Y. Signal transduction inhibitors and antiangiogenic therapies for malignant glioma. *GLIA*. 2011;59:1205–12.
56. Rao N., Lee Y.F., Ge R. Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36(10):1177–90.
57. Clavreul A., Pourbaghi-Masouleh M., Roger E., Menei P. Nanocarriers and nonviral methods for delivering antiangiogenic factors for glioblastoma therapy: the story so far. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:2497–513.
58. Lambrechts D., Lenz H., de Haas S. Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *J Clin Oncol*. 2013;31:1219–30.
59. Eikesdal H.P., Kalluri R. Drug resistance associated with antiangiogenesis therapy. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(5):310–7.
60. Brennan C.W., Verhaak R.G., McKenna A. et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155:462–77.
61. Wang Y., Xing D., Zhao M. et al. The Role of a Single Angiogenesis Inhibitor in the Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis and Systematic Review. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152170.

Сведения об авторах:

Степанов Иван Андреевич, ассистент каф. общей хирургии и анестезиологии Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: stepanovivanneuro@gmail.com;

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, студент 6 курса Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: marishameeva@mail.ru

©Коллектив авторов, 2020

УДК 611.018:616.831.38-008.811.1

Гаврилов Г.В., Станишевский А.В., Гайдар Б.В., Свистов Д.В.

Идиопатическая нормотензивная гидроцефалия. Ретроспектива гипотез патогенеза и современные теории

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО России,
194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

Идиопатическая нормотензивная гидроцефалия – хроническое прогрессирующее дегенеративное заболевание головного мозга, характеризующееся изменением конфигурации боковых желудочков и других ликворосодержащих пространств головного мозга на фоне нормального давления ликвора, проявляющееся клинически триадой симптомов: нарушением походки, развитием деменции и нарушением мочеиспускания. Патопатология и патоморфогенез этого заболевания до конца не ясны. С появлением термина и описания клинической картины нормотензивной гидроцефалии в 1964 г. S. Hakim выполнено множество экспериментальных, морфологических и клинических исследований, направленных на выяснение ключевых звеньев патогенеза заболевания. В представленной работе приведена ретроспектива взглядов на закономерности патогенеза идиопатической нормотензивной гидроцефалии, анализируются современные исследования, посвященные данной проблеме, а также обобщены и сформулированы основные теории, касающиеся ключевых звеньев патологического процесса.

Ключевые слова: нормотензивная гидроцефалия; патоморфогенез; патофизиология; ликвородинамика; нейродегенеративные заболевания; деменция.

Для цитирования: Гаврилов Г.В., Станишевский А.В., Гайдар Б.В., Свистов Д.В. Идиопатическая нормотензивная гидроцефалия. Ретроспектива гипотез патогенеза и современные теории. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(3): 146-155.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.146-155

Для корреспонденции: Станишевский Артём Вадимович, e-mail: a-stan@mail.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гаврилов Г.В.;

сбор и обработка материала – Гаврилов Г.В., Станишевский А.В., Гайдар Б.В., Свистов Д.В.; подбор и подготовка иллюстративного материала – Станишевский А.В., Свистов Д.В.; написание текста – Гаврилов Г.В., Станишевский А.В.; редактирование – Гайдар Б.В., Свистов Д.В. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.11.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Gavrilov G.V., Stanishevskiy A.V., Gaydar B.V., Svistov D.V.

Idiopathic normal pressure hydrocephalus. Retrospective review of pathogenesis and modern theories

Military Medical Academy named after S.M. Kirov "Ministry of Defense of the Russian Federation,
St. Petersburg.

Idiopathic normal pressure hydrocephalus is a chronic, progressive degenerative brain disease characterized by ventricular enlargement disproportionate to other cerebrospinal fluid (CSF) spaces with normal CSF pressure. This disease presents with gait disturbance, cognitive impairment, and incontinence. The pathophysiology and morphogenesis of this condition are not well studied. Since the first description by S. Hakim in 1964, a number of experimental and morphological studies have focused on investigation of the disease mechanisms. This review retrospectively analyzed and summarized principal ideas about the pathogenesis of idiopathic normal pressure hydrocephalus.

Keywords: normal pressure hydrocephalus; pathogenesis; pathophysiology; CSF circulation; neurodegenerative disease.

For citation: Gavrilov G.V., Stanishevskiy A.V., Gaydar B.V., Svistov D.V. Idiopathic normal pressure hydrocephalus. Retrospective review of pathogenesis and modern theories. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2020; 64(3): 146-155 (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.146-155

For correspondence: Stanishevskiy Artem, resident of clinic of neurosurgery, Military Medical Academy named after S. M. Kirov "Ministry of Defense of the Russian Federation (St. Petersburg, Russia), E-mail: a-stan@mail.ru

Contribution: concept and design of the study — Gavrilov G.V.; collection and processing of material — Gavrilov G.V., Stanishevskiy A.V., Gaydar B.V., Svistov D.V.; selection and preparation of illustrative material — Stanishevskiy A.V., Svistov D.V.; writing of the text — Gavrilov G.V., Stanishevskiy A.V.; editing — Gaydar B.V., Svistov D.V. Approval of the final version of the article – all authors.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Information about authors:

Gavrilov G.V., <https://orcid.org/0000-0002-8594-1533>.

Stanishevskiy A.V., ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2615-269X>

Svistov D.V., <https://orcid.org/0000-0002-3922-9887>

Received 03.11.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Идиопатическая нормотензивная гидроцефалия (иНТГ) — хроническое прогрессирующее дегенеративное заболевание головного мозга, проявляющееся изменением конфигурации боковых желудочков и других ликворосодержащих пространств головного мозга на фоне нормального давления ликвора. Заболевание характеризуется триадой симптомов: нарушением походки, развитием деменции и нарушением мочеиспускания. Идиопатическая нормотензивная гидроцефалия развивается, как правило, у людей старше 65 лет. Частота встречаемости данной патологии в популяции составляет, по разным данным, от 0,3 до 3% и увеличивается с возрастом [1]. Клинические проявления иНТГ значительно снижают качество жизни пациентов и в ряде случаев несут инвалидизирующий характер. В отличие от большинства других нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция, лобно-височная деменция, болезнь Бинсвангера, дисциркуляторная энцефалопатия и др., симптомы иНТГ потенциально обратимы. Так, по данным ряда авторов, своевременное выполнение вентрикулоперитонеального шунтирования позволяет добиться регресса когнитивных нарушений у 60–80% пациентов [2]. Согласно данным современных исследований, выполнение шунтирующей операции значительно улучшает качество жизни даже у пациентов с исходно тяжёлым неврологическим дефицитом, в связи с чем целесообразно у лежачих больных [3].

Несмотря на значительное количество данных, полученных при изучении идиопатической нормотензивной гидроцефалии, единого взгляда на патогенез заболевания до настоящего момента не выработано [4, 5]. В представленной работе приведена ретроспектива взглядов на закономерности патогенеза идиопатической нормотензивной гидроцефалии, анализируются современные исследования, посвящённые данной проблеме, сформулированы и обобщены ключевые механизмы патологического процесса.

Методика

В поисковых системах PubMed и Google Scholar проведён поиск публикаций по ключевым словам: нормотензивная гидроцефалия, патогенез, патоморфология,

патофизиология, ликвородинамика. Обнаружено 739 источников, из которых отобраны и проанализированы 23 работы, отражающие эволюцию взглядов на патогенез идиопатической нормотензивной гидроцефалии (табл.).

Теория объёмного потока. Формирование концепций патогенеза идиопатической нормотензивной гидроцефалии неразрывно связано с экспериментальными работами, направленными на выяснение механизмов ликвородинамики. Так, несмотря на то что само заболевание впервые было описано S. Hakim и R. Adams в 1965 г., опыты на животных, послужившие основой для первой теории его патогенеза, были проведены еще в начале XX века.

В 1914 г. W. Dandy и K. Blackfan [6], вызывая окклюзию водопровода мозга у собак введением в его просвет «сгустка» хлопка, добивались развития гидроцефалии. В 1919 г. W. Dandy повторил опыты с окклюзией ликворопроводящих пространств на уровне отверстия Монро с одной стороны с одновременным пересечением сосудов, питающих ворсинчатое сплетение. При этом отмечено отсутствие расширения ипсилатерального бокового желудочка. В результате этих экспериментов предложена модель ликвороциркуляции, согласно которой выработка цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) осуществляется в ворсинчатых сплетениях желудочков, далее ликвор через срединную и боковые апертуры IV желудочка поступает в субарахноидальные пространства (САП) головного и спинного мозга и абсорбируется пахионовыми грануляциями на конвексимальной поверхности полушарий.

В 1960 г. было установлено [8], что пахионовы грануляции могут работать подобно клапану, а также было показано [9], что через 24 ч после эндолумбального введения радиофармпрепарата максимум его накопления определяется в проекции верхнего сагиттального синуса.

Исходя из рассмотренной модели ликвородинамики, после описания клинической картины иНТГ, была предложена теория патогенеза, получившая название “теория объёмного потока” (“the bulk flow theory”) [7]. Согласно этой теории, расширение желудочков головного мозга развивается вследствие нарушения ба-

Сравнительная характеристика существующих теорий патогенеза ИНТГ

Гипотеза патогенеза	Источник	Краткое описание теории
Теория объёмного потока	Dandy W.E., Blackfan K.D., 1914 [6].	Ключевым звеном патогенеза ИНТГ считается дисбаланс между продукцией ликвора и его абсорбцией ворсинками пахионовых грануляций. <i>Противоречия:</i> - отсутствие пахионовых грануляций у детей не приводит к развитию гидроцефалии; - меченный изотопом альбумин, введённый интратекально, поступает в системный кровоток задолго до достижения конвексимальных субарохноидальных пространств (САП). - концепция не объясняет диспропорционального изменения конфигурации желудочков и субарохноидальных пространств, что характерно для ИНТГ.
	Hakim S., Adams R., 1965 [7].	
	Welch K., Friedman V., 1960 [8].	
	Di Chiro G., 1966 [9].	
Теория пульсационного стресса	O'Connel J.E.A., 1943 [10].	Согласно теории, ремоделирование желудочковой системы при ИНТГ происходит из-за «пульсационного стресса» - воздействия волнообразных повышенных внутричерепного давления, вызванных гиперпульсацией ворсинчатых сплетений и сосудов микроциркуляторного русла паренхимы головного мозга. Ключевое звено патогенеза – снижение податливости (комплаенса) вещества головного мозга. <i>Недостаток:</i> отсутствуют сведения о механизмах снижения комплаенса паренхимы мозга.
	Bering E.A., 1962 [11].	
	Wilson C.B., Bertan V.B., 1967 [12].	
	Di Rocco C., Di Trapani G., Pettorossi V.E., Caldarelli M., 1979 [13].	
	Vanneste J.A.L., 1994 [14].	
	Dan Greitz, 2004 [15].	
	Zmajevic M., Klarica M., Varda R., 2002 [16].	
Selda Yildiz, Suraj Thyagaraj, Ning Jin., 2016 [17].		
Общее снижение мозгового кровотока и ишемические изменения перивентрикулярного белого вещества	Mathew N.T., 1975 [18].	Общее снижение мозгового кровотока и формирование очагов ишемии в перивентрикулярном белом веществе создают предпосылки к вентрикуломегалии и, независимо от нарушений ликвороциркуляции приводят к развитию неврологической симптоматики. <i>Недостаток:</i> приблизительно у 16% пациентов с ИНТГ отмечен нормальный мозговой кровоток. Наличие сниженного мозгового кровотока при ИНТГ не влияет на эффект ликворощунтирующей операции.
	Bradley W.G., 2002 [19].	
	Owler B.K., 2004 [20].	
Нарушение венозного оттока	Bateman G.A., 2008 [21].	Увеличение давления в верхнем сагиттальном синусе (ВСС) на 3 – 4 мм Нг ведёт к выравниванию градиента давления между ВСС и САП, и абсорбция ЦСЖ пахионовыми грануляциями прекращается. Создаются предпосылки к трансэндимарному току ликвора и его дренированию в систему глубоких вен. Одновременно рост давления в корковых венах ограничивает пульсацию стенок артерий в САП, что ведёт к передаче пульсовых волн сосудам микроциркуляторного русла без затухания, вызывая гиперпульсацию паренхимы, которая, в свою очередь, ведёт к прямому повреждению глиальной ткани в перивентрикулярной области, снижению эластического сопротивления и расширению желудочков.
	Czosnyka Z., 2017 [22].	
	Mase M., 2007 [23].	
Влияние генетических факторов	Nacmias B., 1997 [24].	Наличие мутации в e4-аллеле гена ApoE 19 хромосомы ведёт к значимому увеличению риска развития нормотензивной гидроцефалии.
	Cusimano M.D., 2011 [25].	
	McGirr A., 2016 [26].	
Нарушения в работе глиолимфатической системы	Jeffrey J. Iliff, Minghuan Wang, Yonghong Liao, 2012 [27].	Согласно теории, клиренс продуктов обмена в ткани головного мозга осуществляется ликвором, движущимся по межклеточным каналам, формирующимся из-за уменьшения объёма клеток астроцитарной глии. Движение ликвора однонаправленное – от периартериальных пространств к перивенозным. Движущей силой в этом случае является пульсация артерий и артериол. Снижение эластичности стенок сосудов ведёт к нарушению механизма и накоплению в мозге шлаков и токсинов с развитием симптокомплекса. <i>Недостаток:</i> теория не объясняет механизма ремоделирования желудочков.
	Geir Ringstad, Svein Are, Sirirud Vatnehol, Per Kristian Eide, 2018 [28].	

ланса между продукцией ликвора ворсинчатыми сплетениями и его абсорбцией в пахионовых грануляциях.

Следует отметить, что как концепция ликвородинамики, предложенная W. Dandy, так и “теория объёмного потока” S. Hakim и R. Adams [6, 7] имеют ряд внутренних противоречий. К примеру, у детей до закрытия родничков пахионовы грануляции в норме отсутствуют, при этом не происходит развитие гидроцефалии. Несмотря на прогресс анатомических и гистологических методов исследования, в пахионовых грануляциях не описано структур, выполняющих роль клапана. Меченный радиоизотопом альбумин появляется в циркулирующей крови в течение первых минут после интратекального введения, задолго до того, как содержащий его ликвор достигнет конвексимальной поверхности полушарий [15].

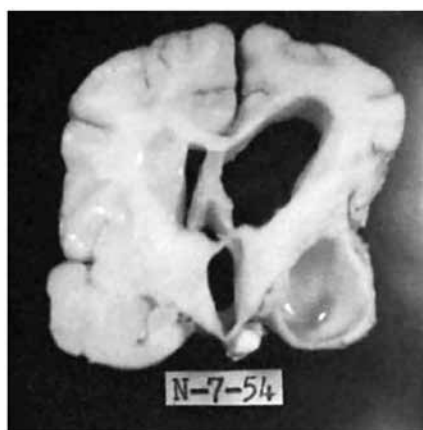
Отмечено, что при иНТГ расширению боковых желудочков соответствует сужение конвексимальных субарахноидальных пространств. Это обстоятельство трудно объяснить в рамках теории объёмного потока. Кроме того, изменение баланса между продукцией и резорбцией ликвора должно закономерно приводить к его избыточному накоплению, что, согласно гипотезе Monro-Kellie, неминуемо вызывает повышение внутричерепного давления.

Теория пульсационного стресса. Объяснить расширение боковых желудочков с одновременным сужением конвексимальных субарахноидальных пространств можно в том случае, если принять во внимание существование градиента давления ликвора между полостью желудочков и верхнего сагиттального синуса.

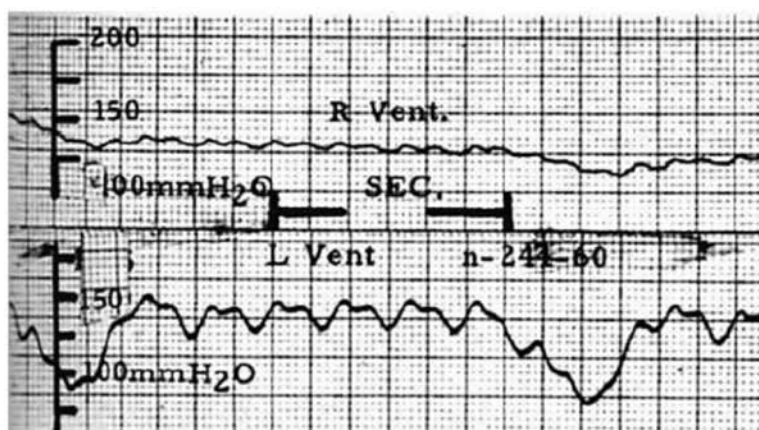
Впервые существование такого градиента установили L. Weed и W. Hughson [29], его величина составила 2 – 14 см вод. ст. установлено, что в норме отношение давления в субарахноидальном пространстве и верхнем сагиттальном синусе соответствует 1,7: 1 [30]. Если считать, что сообщающаяся гидроцефалия развивается вследствие нарушения резорбции ликвора в пахионовых грануляциях, логично предположить, что указанное отношение должно углубляться. Однако в экспериментах K. Shulman и соавт. [31] и W. Olivero и соавт. [32], напротив, показано выравнивание градиента при гидроцефалии. Кроме того, установлено, что нарушение венозного оттока (при тромбозе синусов или дренирующих вен), сопровождаясь выраженным отёком паренхимы головного мозга, не приводит к развитию гидроцефалии.

Осознание обсуждаемых противоречий способствовало проведению исследований, направленных на создание новых концепций ликвородинамики и патогенеза иНТГ.

Так, в 1962 г. E. Bering в экспериментах на собаках, индуцировал развитие сообщающейся гидроцефалии введением каолина в большую цистерну с последующим пересечением сосудов ворсинчатого сплетения одного из боковых желудочков [11]. В результате происходило расширение только того желудочка, в котором ворсинчатое сплетение было сохранено (**рис. 1**). Регистрация ликворного давления в полости обоих желудочков показало значительные отличия в частоте и амплитуде пульсовых волн.



а



б

Рис.1. а – препарат головного мозга, ворсинчатое сплетение правого бокового желудочка удалено. После введения каолина в субарахноидальное пространство развилась сообщающаяся гидроцефалия. Размеры правого бокового желудочка не изменены; б – диаграмма волн пульсового давления в правом и левом боковых желудочках после введения каолина в субарахноидальное пространство.

(Рисунок адаптирован из источника: Bering E.A. Circulation of the cerebrospinal fluid: Demonstration of the choroid plexus as the generator of the force for flow of fluid and ventricular enlargement. J. Neurosurg. 1962. Vol. 19. P. 405 – 13).

С. Wilson и V. Bertan [12] продолжили работу E. Bering. Они вызывали развитие сообщающейся гидроцефалии у лабораторного животного введением в субарахноидальное пространство сажи с одновременной окклюзией одной из передних ворсинчатых артерий (ПВА) (рис. 2). Амплитуда пульсовых волн ликворного давления в желудочке с окклюзированной ПВА была ниже, чем в противоположном. Расширение желудочков было асимметричным, как и в эксперименте E. Bering.

В 1978 V. Pettorossi и С. Di Rocco с соавторами [13] провели серию экспериментов с введением в боковой желудочек овцы микробаллона, который раздувался синхронно с сердцебиением и создавал пульсирующие волны повышения ликворного давления. В результате эксперимента выявлено расширение желудочков, как и в других моделях сообщающейся гидроцефалии. Интересно, что конфигурация желудочков отличалась в острую фазу их расширения и спустя длительное время работы баллона (рис. 3 а, б, в).

Микроскопическая картина также была неотличима от картины сообщающейся гидроцефалии (рис. 4).

В 1943 г. J. O'Connell первым предположил, что увеличение пульсового давления выработки ликвора без повышения общего внутричерепного давления (ВЧД) может приводить к развитию нормотензивной гидроцефалии [10].

Наличие пульсационного стресса было подтверждено транскраниальной доплерографией [34–36]. Существование пульсационного стресса подтверждено прямым измерением градиента давления между полостью боковых желудочков и субарахноидальным пространством в экспериментах J. Guinane с соавторами [37].

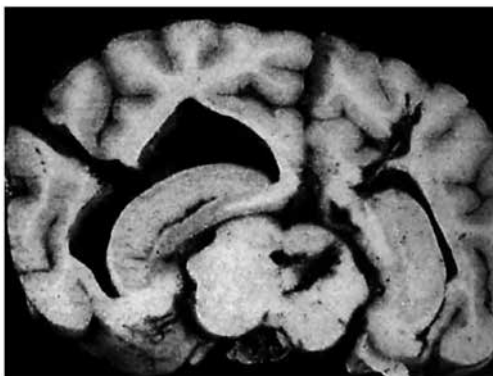


Рис. 2. Макропрепарат головного мозга. Эмболизирована левая передняя ворсинчатая артерия. После введения сажи в субарахноидальное пространство развилась сообщающаяся гидроцефалия. Размеры левого бокового желудочка не изменены. (Рисунок адаптирован из источника: Wilson С.В., Bertan V.В. Interruption of the anterior choroidal artery in experimental hydrocephalus. Arch. Neurol. 1967. Vol. 17. P. 614 – 19).

В 2002 г. М. Engor и соавт. [38] предложили электрическую модель сообщающейся гидроцефалии. Экстраполировав результаты эксперимента на биологическую модель, авторы пришли к выводу, что развитие сообщающейся гидроцефалии является следствием перераспределения пульсовых волн между отдельными компартментами в полости черепа. Ключевую роль в этом процессе играет снижение способности сосудов головного мозга к погашению пульсовых волн артериального давления. В результате возникают патологическая резонирующая пульсация капилляров микроциркуляторного русла паренхимы головного мозга, патологическая пульсация сосудов в субарахноидальном пространстве и диссонирующая патологическая пульсация венозного компартмента. Увеличение давления в венозном секторе снижает потенциал абсорбции ЦСЖ, усугубляя нарушения ликвородинамики.

D. Graitz в 2004 г. развил концепцию пульсационного стресса. В своей работе [15], основанной на

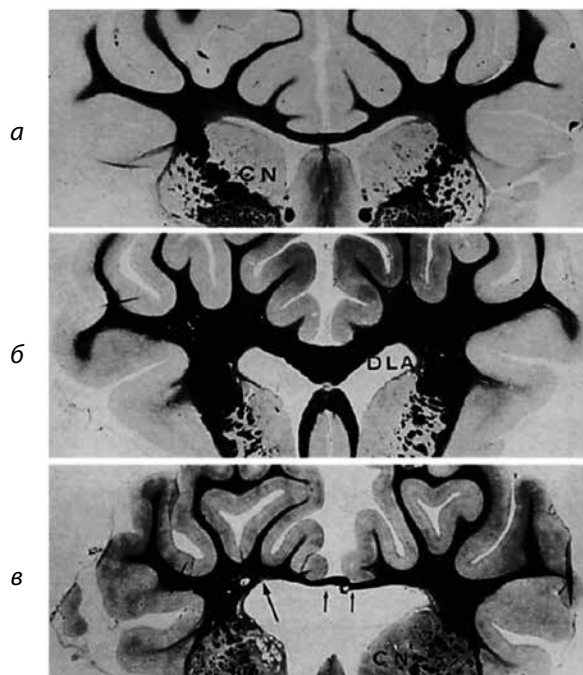


Рис. 3. Изменение конфигурации боковых желудочков на фоне пульсации установленного в них баллона.

а – норма; б – «острая» фаза эксперимента; в – картина при длительной работе баллона,

CN – хвостатое ядро; DLA – дорсолатеральный угол лобного рога бокового желудочка. Стрелками указано изменение конфигурации желудочков при длительной работе баллона. (Рисунок адаптирован из источника: Di Rocco С., Di Trapani G., Pettorossi V.Е., Caldarelli M. On the pathology of experimental hydrocephalus induced by artificial increase in endoventricular CSF pulse pressure. Childs Brain. 1979. Vol. 5. P. 81 – 95).

изучении данных, полученных при помощи кардиосинхронизированной потокчувствительной МРТ, D. Graitz и соавт. детально описали объёмные и скоростные характеристики движения артериальной и венозной крови и ликвора в краниовертебральной системе в разные фазы сердечного цикла. В представленной работе было установлено, что наличие нормального комплаенса (податливости) паренхимы головного мозга является критически важным для реализации эффекта Виндкесселя — преобразования дискретной пульсации артериол головного мозга в постоянный поток крови по капиллярам микроциркуляторного русла. С точки зрения авторов, клиническое улучшение состояния пациентов с иНТГ после выполнения теста с выведением ликвора или ликворшунтирующей операции происходит вследствие увеличения комплаенса головного мозга. Так, по их мнению, повышение оттока ликвора, согласно гипотезе Монго-Келли, ведёт к расширению сдавленных мозговых вен и увеличению скорости мозгового кровотока, что положительно сказывается на обменных процессах в нейронах ЦНС.

Роль нарушений венозного оттока в патогенезе иНТГ. М. Czornyka и соавт. установили, что с возрастом происходит значительное снижение «резервного объёма», в котором может распределяться ЦСЖ [22]. Это связано прежде всего со снижением венозного оттока и увеличением давления в венах. По данным G. Vateman и соавт., нарушения венозного оттока могут являться одним из ключевых факторов в развитии иНТГ [21]. Увеличение давления в корковых венах снижает податливость головного мозга. Увеличение давления в верхнем сагиттальном синусе (ВСС) на 3–4 мм рт. ст. ведёт к выравниванию градиента давления между ВСС и субарахноидальным пространством, при этом абсорбция ЦСЖ пахионовыми грануляциями прекращается. Исследования показывают, что у взрослых увеличение давления в системе поверхностных вен не соответствует росту давления в системе глубоких вен. Соответственно, создаются предпосылки к трансэндимарному току ликвора и его дренированию в систему глубоких вен. При этом давление ликвора не увеличивается, так как движущей силой является градиент давления между полостью боковых желудочков и системой глубоких вен головного мозга. Одновременно рост давления в корковых венах ограничивает пульсацию стенок артерий в САП, что ведёт к передаче пульсовых волн сосудам микроциркуляторного русла без затухания, вызывая гиперпульсацию паренхимы, которая в свою очередь ведёт к прямому повреждению глиальной ткани в перивентрикулярной

области, снижению эластического сопротивления и расширению желудочков [21].

Снижение мозгового кровотока и формирование очагов подкорковой ишемии при иНТГ. Снижение мозгового кровотока при иНТГ выявлено в ряде исследований [19, 20]. N. Mathew и соавт. предполагали, что расширение боковых желудочков при иНТГ ведёт к натяжению передних мозговых артерий, которое сказывается на снижении общего мозгового кровотока [18]. Другие исследователи указывали на непосредственное сдавление микроциркуляторного русла как следствие вентрикуломегалии [19]. Альтернативная теория говорит о том, что формирование очагов ишемии в перивентрикулярном белом веществе создаёт предпосылки к расширению боковых желудочков. В исследовании В. Owler и соавт. [20] проводилось сопоставление МР-данных и результатов позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с оценкой мозгового кровотока у пациентов с иНТГ и здоровых добровольцев. В результате установлено, что не менее чем у 16% пациентов с иНТГ величина мозгового кровотока находится в пре-



Рис. 4. Микропрепарат: эпендима бокового желудочка на фоне развития сообщающейся гидроцефалии.

Стрелками указаны микроразрывы слоя эпендимальных клеток. Гистологическая картина неотличима от таковой при естественном развитии сообщающейся гидроцефалии. (Рисунок адаптирован из источника: Di Rocco C., Pettorossi V.E., Caldarelli M., Mancinelli R., Velardi F. Communicating hydrocephalus induced by mechanically increased amplitude of the intraventricular cerebrospinal fluid pressure: Experimental studies. *Exp. Neurol.* 1978. Vol. 59. P. 40–52).

делах нормальных значений. Кроме того, в исследовании G. Vateman и соавт. установлено, что снижение мозгового кровотока не является предиктором положительного исхода ликворшунтирующей операции [21]. Таким образом, снижение мозгового кровотока может являться следствием иНТГ, а не одним из ключевых звеньев патогенеза. Некоторые исследователи связывают снижение мозгового кровотока в перивентрикулярной области при иНТГ с деафферентацией и общим снижением функциональной активности расположенных здесь нервных структур.

Данные о влиянии генетических факторов. Есть данные о наличии генетической предрасположенности к развитию иНТГ. В исследовании M.D. Cusimano и соавт. [25] приведены результаты лечения близнецов с иНТГ, гомозиготных по $\epsilon 3$ -аллелю гена ApoE 19 хромосомы. ApoE — один из важнейших аполипопротеинов плазмы крови, регулирующий обмен холестерина в головном мозге. Регресс неврологической симптоматики у пациенток после вентрикулоперитонеального шунтирования подтвердил наличие иНТГ. Обе пациентки вели сходный образ жизни, что позволяет предположить незначительный вклад факторов среды и вредных привычек в развитие заболевания, а также имели сходную клиническую и нейрорадиологическую картину заболевания. В. Nacmias и соавт. установили, что наличие мутации в $\epsilon 4$ -аллеле гена ApoE 19 хромосомы ведёт к значимому увеличению риска развития нормотензивной гидроцефалии по сравнению с контрольной группой (23% против 6,9%, $p=0,017$) [24]. Отмечены некоторые закономерности развития нормотензивной гидроцефалии у родственников первой линии родства. По данным исследователей, риск развития иНТГ у родственников пациентов первой линии родства составляет 7,1% в сравнении с показателем в 0,7% в контрольной группе, что также указывает на возможность генетической предрасположенности к развитию нормотензивной гидроцефалии [25]. В исследовании J. Nuovinen и соавт. 375 пациентов, оперированных по поводу иНТГ с 1993 по 2014 гг., были опрошены на предмет наличия симптомов иНТГ у родственников первой линии родства. У 60 (16%) пациентов, по-видимому, имело место развитие наследственной (семейной) иНТГ. 18 пациентов из 12 семей имели по крайней мере одного родственника, которому выполнялась ликворшунтирующая операция. Отмечено, что у пациентов с семейной иНТГ классическая триада Хакима развивалась чаще, чем в среднем в популяции. Следует отметить, что статистически значимых отличий в уровне ApoE у пациентов с «семейной» иНТГ и спорадическими случаями иНТГ выявлено не было [39].

Гипотеза о роли глиолимфатической системы. Данные о том, что конечным этапом ликворциркуляции является поступление ЦСЖ в венозный кровоток были приведены L. Weed еще в 1925 г. [40].

В 2005 г. L. Koh, A. Zakharov и M. Johnston вновь обратили внимание на взаимосвязь субарахноидального пространства с лимфатической системой [41].

Решающую роль в формировании современных представлений о патогенезе идиопатической нормотензивной гидроцефалии сыграли исследования, которые легли в основу альтернативной теории ликворциркуляции. Одним из основных этапов в развитии этой теории стало описание в 2012 г. глиолимфатической (глимфатической) системы головного мозга [27] (рис. 5).

Основной вклад в понимание работы глимфатической системы внесли эксперименты J. Jeffrey и соавт. [27] с интравентрикулярным введением флуоресцентных красителей и прижизненной микроскопией головного мозга крыс. Авторами установлено, что основной объём водорастворимых красителей, вводимых интратекально, распространяется с током ликвора в субарахноидальное пространство, из которых под действием пульсационных волн, генерируемых стенками крупных мозговых артерий, проникает в периваскулярные пространства Робина–Вирхова. Далее, через систему белковых каналов, главным из которых является аквапорин-4, ЦСЖ проникает в межклеточное пространство, образованное телами и отростками нейронов и глиальных клеток. Протекающий в межклеточном пространстве ликвор saniрует микроокружение нейронов, удаляя продукты их жизнедеятельности, и направляется в перивенозное субарахноидальное пространство, через которое (а также в составе оболочек черепно-мозговых нервов) поступает в лимфатические сплетения полости носа, лимфатические узлы шеи и далее в соответствующие лимфатические и венозные коллекторы. Важно отметить, что движущей силой, заставляющей ликвор перемещаться из субарахноидального пространства в периартериальное, межклеточное и перивенозное, является пульсация интракраниальных экстра- и интрацеребральных артерий.

Помимо данных о механизме клиренса продуктов обмена нейронов, в приведённом исследовании сделано несколько интересных наблюдений. Получены данные о непроницаемости эпендимы для ликвора и соответственно об отсутствии проникновения вентрикулярного ликвора в паренхиму мозга в норме: после интравентрикулярного введения флуоресцентного контраста отмечено лишь минимальное его проникнове-

ние в перивентрикулярную область. Ликвор, циркулирующий в субарахноидальных пространствах, легко проникает в межклеточный компартмент. Уже через 30 мин после введения контраста в большую цистерну отмечено его накопление в паренхиме мозга на значительном удалении. Контраст с большой (2000 кДа) молекулярной массой концентрировался в периваскулярном пространстве, в то время как контраст с низкой (3 кДа) молекулярной массой проникает и относительно свободно распространяется в межклеточном секторе.

В экспериментах на головном мозге мышей *ex vivo* и *in vivo* показаны распространение введённого в большую цистерну контраста по параартериальным пространствам и его клиренс в систему внутренней вены мозга и вен полости носа. Этими же путями осуществляется клиренс контраста, вводимого непосредственно в вещество головного мозга в области базальных ганглиев и внутренней капсулы.

Проводились эксперименты на головном мозге мышей с мутацией гена, кодирующего белок аквапорин-4 – основной структурный элемент аквапориновых каналов. Последние локализованы в отростках

астроцитов, которые формируют наружную стенку периваскулярных пространств. В этих экспериментах была установлена роль аквапориновых каналов в формировании однонаправленного тока жидкости из периартериальных пространств в межклеточные и из последних в перивенозные. Функционально этот феномен, вероятно, связан с очищением межклеточного пространства от продуктов обмена. Так, у мышей с мутацией гена *Aqp-4* клиренс меченого маннитола, введённого непосредственно в паренхиму мозга, был существенно (на 70%) снижен по сравнению с мышами контрольной группы. Для бета-амилоида, введённого в базальные ганглии, клиренс снизился на 55%. Этот факт подчёркивает значимость параваскулярного транспорта ликвора в обмене бета-амилоида наравне с его возможным переносом через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) посредством специфического переносчика.

G. Ringstad и соавт. экстраполировали гипотезу о глиолимфатической системе и предложенную модель ликвороциркуляции на патогенез нормотензивной гидроцефалии и провели эксперименты с интратекаль-

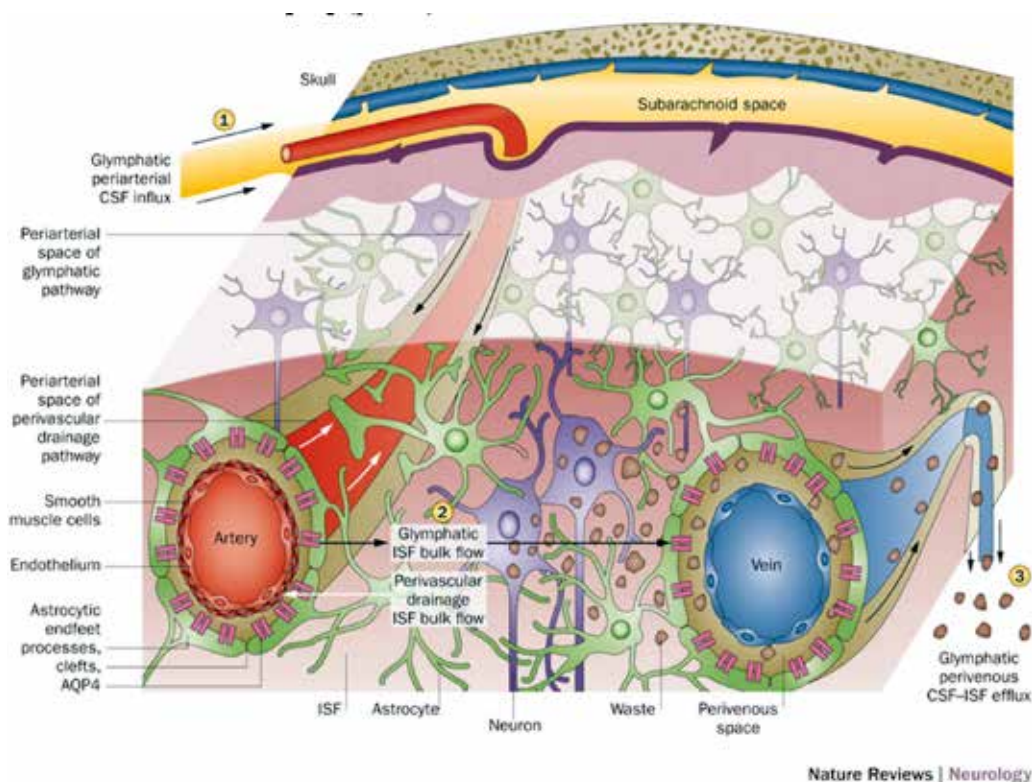


Рис. 5. Строение глиолимфатической системы головного мозга. Рисунок адаптирован из источника: Iliff J.J., Wang M., Liao Y. et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci. Transl. Med.* 2012 Vol. 4. P. 147. doi: 10.1126/scitranslmed.3003748.

ным введением МР-контрастного вещества (гадобу-трола) пациентам с иНТГ и другими заболеваниями ЦНС [28]. В ходе исследования отмечено, что клиренс контрастного препарата у пациентов с иНТГ значительно замедлен по сравнению с контрольной группой. Практически полное отсутствие контрастирования конвексимальных ликворных пространств заставляет сомневаться в верности гипотезы о ведущей роли пахионовых грануляций в процессе абсорбции ликвора. Вместе с тем показано, что распространение препарата в паренхиме мозга тесно связано с его продвижением по периартериальным пространствам, которое также значительно замедлено у пациентов с иНТГ. Отмечено, что у пациентов с иНТГ после интратекального введения контрастного вещества отмечается его накопление в перивентрикулярной области, что свидетельствует о трансэндимальном проникновении ликвора.

Заключение

Несмотря на актуальность проблемы поиска патогенетически обоснованного метода лечения идиопатической нормотензивной гидроцефалии, а также предпринимаемые попытки раскрытия ключевых этапов развития заболевания, механизм формирования патологических изменений в ткани головного мозга остается недостаточно изученным. Возможно, понимание ключевых концепций физиологии цереброспинальной системы и ликвороциркуляции в сочетании с изучением морфологических и ультраструктурных изменений в ткани головного мозга позволит сформулировать представления о закономерностях патогенеза идиопатической нормотензивной гидроцефалии.

Литература/References

- Jaraj D., Rabiei K., Marlow T., Jensen C., Skoog I., Wikkelso C. Prevalence of idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Neurology*. 2014; 82: 1449-54. doi: 10.1212/WNL.0000000000000342. Epub 2014 Mar 28.
- Mori E., Ishikawa M., Kato T., Kazui H., Miyake H., Miyajima M. et al. Guidelines for management of idiopathic normal pressure hydrocephalus: second edition. *Neurol. Med. Chir.* (Tokyo). 2012; 52: 775 - 809.
- Kehler U. Normal pressure hydrocephalus: is it worthwhile to treat bedridden patients? *Fluids and Barriers of the CNS*. 2017; 14: 17–22.
- Khani M., Sass L.R., Xing T., Sharp K.M., Balédent O., Martin B.A. Anthropomorphic Model of Intrathecal Cerebrospinal Fluid Dynamics Within the Spinal Subarachnoid Space: Spinal Cord Nerve Roots Increase Steady-Streaming. *J. Biomech. Eng.* 2018; 140: 39 – 44. doi: 10.1115/1.4040401.
- Asgari S., Vespa P.M., Bergsneider M., Hu X. Latency relationships between cerebral blood flow velocity and intracranial pressure. *Acta Neurochir.* 2012; 114: 5-9. doi: 10.1007/978-3-7091-0956-4_2.
- Dandy W.E., Blackfan K.D. Internal hydrocephalus. An experimental, clinical and pathological study. *Am. J. Dis. Child.* 1914; 8: 406–81.
- Adams R.D., Fisher C.M., Hakim S., Ojemann R.G., Sweet W.H. Symptomatic occult hydrocephalus with “normal” cerebrospinal fluid pressure: a treatable syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1965; 273: 117–26.
- Welch K., Friedman V. The cerebrospinal fluid valves. *Brain*. 1960; 83: 454-69. PMID: 13784191
- Di Chiro G., Grove A.S. Jr. Evaluation of surgical and spontaneous cerebrospinal fluid shunts by isotope scanning. *J. Neurosurg.* 1966; 24: 743-8.
- O’Connel J.E.A. The vascular factor in intracranial pressure and the maintenance of the CSF circulation. *Brain*. 1943; 66: 204–28.
- Bering E.A. Circulation of the cerebrospinal fluid: Demonstration of the choroid plexus as the generator of the force for flow of fluid and ventricular enlargement. *J. Neurosurg.* 1962; 19: 405–13.
- Wilson C.B., Bertan V.B. Interruption of the anterior choroidal artery in experimental hydrocephalus. *Arch. Neurol.* 1967; 17: 614–9.
- Di Rocco C., Di Trapani G., Pettorossi V.E., Caldarelli M. On the pathology of experimental hydrocephalus induced by artificial increase in endoventricular CSF pulse pressure. *Childs Brain*. 1979; 5: 81–95.
- Vanneste J.A. Three decades of normal pressure hydrocephalus: are we wiser now? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1994; 57: 1021-5.
- Greitz D. Radiological assessment of hydrocephalus: new theories and implications for therapy. *Neurosurg. Rev.* 2004; 27: 145-65. Epub 2004 May 26.
- Zmajević M., Klarica M., Varda R., Kudelić N., Bulat M. Elimination of phenolsulfonphthalein from the cerebrospinal fluid via capillaries in central nervous system in cats by active transport. *Neurosci. Lett.* 2002; 15: 123-5.
- Yildiz S., Thyagaraj S., Jin N., Zhong X., Pahlavian S., Martin B.A. et al. Quantifying the influence of respiration and cardiac pulsations on cerebrospinal fluid dynamics using real-time phase-contrast MRI. *J. Magn. Reson. Imaging*. 2017; 46: 431-9. doi: 10.1002/jmri.25591. Epub 2017 Feb 2.
- Mathew N.T., Meyer J.S., Hartmann A., Ott E.O. Abnormal cerebrospinal fluid-blood flow dynamics. Implications in diagnosis, treatment, and prognosis in normal pressure hydrocephalus. *Arch. Neurol.* 1975; 32: 657-64.
- Bradley W.G. Cerebrospinal fluid dynamics and shunt responsiveness in patients with normal-pressure hydrocephalus. *Mayo Clin. Proc.* 2002; 77: 507-8.
- Owler B.K., Pena A., Momjian S., Czosnyka Z., Czosnyka M., Harris N.G. et al. Changes in cerebral blood flow during cerebrospinal fluid pressure manipulation in patients with normal pressure hydrocephalus: a methodological study. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 2004; 24: 579-87.
- Bateman G.A., Levi C.R., Schofield P., Wang Y., Lovett E.C. The venous manifestations of pulse wave encephalopathy: windkessel dysfunction in normal aging and senile dementia. *Neuroradiology*. 2008; 50: 491-7. doi: 10.1007/s00234-008-0374-x. Epub 2008 Apr 1.
- Czosnyka Z., Czosnyka M. Long-term monitoring of intracranial pressure in normal pressure hydrocephalus and other CSF disorders. *Acta Neurochir.* (Wien). 2017; 159: 1979-80. doi: 10.1007/s00701-017-3282-1. Epub 2017 Jul 29.
- Miyati T., Mase M., Kasai H., Hara M., Yamada K., Shibamoto Y., Soellinger M., Baltés C., Luechinger R. Noninvasive MRI assess-

- ment of intracranial compliance in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *J. Magn. Reson. Imaging*. 2007; 26: 274-8.
24. Nacmias B., Tedde A., Guarnieri B.M., Petrucci C., Ortenzi L., Serio A. et al. Analysis of apolipoprotein E, alpha1-antichymotrypsin and presenilin-1 genes polymorphisms in dementia caused by normal pressure hydrocephalus in man. *Neurosci. Lett.* 1997; 229: 177-80.
 25. Cusimano M.D., Rewilak D., Stuss D.T., Barrera-Martinez J.C., Salehi F., Freedman M. Normal-pressure hydrocephalus: is there a genetic predisposition? *Can. J. Neurol. Sci.* 2011; 38: 274-81.
 26. McGirr A., Cusimano M.D. Does idiopathic normal pressure hydrocephalus (iNPH) run in families? *J. Neurol. Sci.* 2016; 368: 128-129. doi: 10.1016/j.jns.2016.06.054. Epub 2016 Jun 25.
 27. Iliff J.J., Wang M., Liao Y., Plogg B.A., Peng W., Gundersen G.A. et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci. Transl. Med.* 2012; 147: 147-51. doi: 10.1126/scitranslmed.3003748.
 28. Ringstad G., Valnes L.M., Dale A.M., Pripp A.H., Vatnehol S.S., Emblem K.E. et al. Brain-wide glymphatic enhancement and clearance in humans assessed with MRI. *JCI Insight*. 2018; 13. doi: 10.1172/jci.insight.121537. [Epub ahead of print]
 29. Weed L.H., Hughson W. Intracranial venous pressure and cerebrospinal fluid pressure as affected by the intravenous injection of solutions of various concentrations. *Am. J. Physiol.* 1921; 58: 101-30.
 30. Portnoy H.D., Croissant P.D. Pre- and postoperative cerebrospinal fluid absorption studies in patients with myelomeningocele shunted for hydrocephalus. *Childs Brain*. 1978; 4: 47-64.
 31. Shulman K., Ransohoff J. Sagittal sinus venous pressure in hydrocephalus. *J. Neurosurg.* 1965; 23: 169-73.
 32. Olivero W.C., Rekaté H.L., Chizeck H.J., Ko W., Mc Cormick J.M. Relationship between intracranial pressure and sagittal sinus pressure in normal and hydrocephalic dogs. *Pediatr. Neurosci.* 1988; 14: 196-201.
 33. Di Rocco C., Pettorossi V.E., Caldarelli M., Mancinelli R., Velardi F. Communicating hydrocephalus induced by mechanically increased amplitude of the intraventricular cerebrospinal fluid pressure: Experimental studies. *Exp. Neurol.* 1978; 59: 40-52.
 34. Seibert J.J., Mc Cowan T.C., Chaddock T.C., Adametz J.R., Glasier C.M., Willianmon S.L. et al. Duplex pulsed Doppler US versus intracranial pressure in the neonate: Clinical and experimental studies. *Radiology*. 1989; 171: 153-9.
 35. Goh D., Minns R.A., Hendry G.M.A., Thambyayah M., Steers A.J.W. Cerebrovascular resistive index assessed by duplex Doppler sonography and its relationship to intracranial pressure in infantile hydrocephalus. *Periatr. Radiol.* 1992; 22: 246-50.
 36. Van Bel F., Van de Bor M., Baan J., Stijnen T., Ruys J.H. Blood flow velocity pattern of the anterior cerebral arteries. Before and after drainage of posthemorrhagic hydrocephalus in the newborn. *J. Ultrasound Med.* 1988; 7: 553-9.
 37. Guinane J.E. Why does hydrocephalus progress? *J. Neurol. Sci.* 1977; 32: 1-8.
 38. Egnor M., Zheng L., Rosiello A., Gutman F., Davis R. A model of pulsations in communicating hydrocephalus. *Pediatr. Neurosurg.* 2002; 36: 281-303.
 39. Huovinen J., Kastinen S., Komulainen S., Oinas M., Avellan C., Frantzen J. et al. Familial idiopathic normal pressure hydrocephalus. *J. Neurol. Sci.* 2016; 368: 11-8. doi: 10.1016/j.jns.2016.06.052.
 40. Weed L. H. The absorption of cerebrospinal fluid into the venous system. *Am. J. Anat.* 1923; 31: 191-221.
 41. Koh L., Zakharov A., Johnston M. *Integration of the subarachnoid space and lymphatics: Is it time to embrace a new concept of cerebrospinal fluid absorption?* Cerebrospinal Fluid Res. 2005.

Сведения об авторах:

Гаврилов Гаспар Владимирович, докторант каф. нейрохирургии;

Станишевский Артём Вадимович, клинический ординатор клиники нейрохирургии;

Гайдар Борис Всеволодович, акад. РАМН, доктор мед. наук, проф. каф. нейрохирургии;

Свистов Дмитрий Владимирович, канд. мед. наук, доцент, начальник каф. нейрохирургии, гл. нейрохирург МО России.

Методика

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612-15

Гришачёва Т.Г.¹, Михайлова И.А.¹, Петрищев Н.Н.¹, Кривченко А.И.², Струй А.В.¹

Мониторинг скорости кровотока в венах брыжейки крыс

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Л. Толстого, д. 6-8;

²ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова» Российской академии наук, 194223, г. Санкт-Петербург, Россия, пр. Тореза, д. 44

Разработка систем для регистрации и автоматической обработки информации о непосредственной реакции микрососудов на различные факторы является важной задачей для доклинического испытания новых препаратов, воздействующих на систему микроциркуляции. Цель исследования – модификация метода on-line-регистрации и обработки интравитальных изображений микрососудов для изучения динамики скорости кровотока при возмущающих воздействиях.

Методика. Представлена усовершенствованная методика регистрации скоростей линейного кровотока в микрососудах и обработки интравитальных изображений. Для визуальной фиксации изменения скорости кровотока использовали макроскоп (Wild M420, Швейцария), объектив (Макрозум 6.3-32x), быстродействующую цифровую камеру (Basler acA2000-165uc USB3.0, Германия) с матрицей CMOSIS CMV2000. Камера позволяет получать полнокадровые изображения 2000×1000 пикселей с частотой 165 кадров/с, а линейные изображения с частотой 8000 кадров/с, что позволяет фиксировать достаточно широкий диапазон линейных скоростей кровотока. Масштаб полученного с помощью системы «микроскоп – камера изображения» составляет 0,7 микрона на пиксел, что дает возможность измерения скоростей от 0,1 до 150 мм/с. В работе был использован метод оцифровки и анализа изображений на основе пакета программ «МультиМедиа Каталог» версии 2.3 («ММCatalog», Россия). Анализ скорости кровотока основан на непосредственном измерении скорости движения потока клеток крови. При измерении скорости определяется смещение потока клеток крови между двумя измерениями через заданный промежуток времени. Для этого на изображение кровотока в выбранном участке микрососуда наносится линейный маркер, ориентированный вдоль русла сосуда. После запуска процесса измерений камера каждую секунду переводится в режим линейной съемки вдоль маркера. Производится съемка серии из 5–6 измерений линейных изображений с заданным интервалом времени, по ним строятся оптические срезы и измеряется относительное смещение кривой. Смещение кривой определяется методом оценки суммы разностей одного массива яркостей графика от другого при сканировании от –20 до +20% от текущей позиции. Позиция, соответствующая минимальной сумме разностей, считается величиной смещения графиков. Эта процедура проводится для всех 5–6 пар измерений. Из полученных значений смещения графиков выбирается медиана, которая и используется как результат измерения скорости. Затем камера опять переводится в режим съемки полнокадровых изображений, что позволяет контролировать положение маркера в реальном времени. Во время эксперимента могут происходить перемещения объекта из-за движения или дыхания животного. Для корректировки положения маркера на изображении сосуда есть возможность изменения его позиции во время измерений. Программа фиксирует полученные значения смещения графиков и, как следствие, скорость кровотока. В зависимости от скорости кровотока программа позволяет регулировать число измерений в единицу времени, что дает возможность поддерживать стабильность измерения скорости. Для снижения влияния высокочастотного шума проводится сглаживание графиков с помощью скользящего усреднения. Интенсивность усреднения регулируется в процессе измерений. Регистрация скорости кровотока в выбранном участке проводится непрерывно в течение всего эксперимента.

Схема проведения эксперимента:

- запись исходного кровотока в течение 180 с;
- регистрация кровотока во время лазерного облучения — 300 с;
- регистрация кровотока после воздействия – 300 с.

Результаты. Данный способ регистрации скорости кровотока позволяет фиксировать повышение скорости кровотока в венах как во время воздействия лазерным излучением (662 нм), так и после завершения облучения.

Заключение. Предложенная методика обработки интравитальных изображений кровотока дает возможность регистрации в режиме реального времени быстрых изменений скорости кровотока в микрососудах при возмущающих воздействиях.

Ключевые слова: микроциркуляция; скорость линейного кровотока; вены; лазерное облучение.

Для цитирования: Гришачёва Т.Г., Михайлова И.А., Петрищев Н.Н., Кривченко А.И., Струй А.В. Мониторинг скорости кровотока в венах брыжейки крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64 (3): 156-162.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.156-162

Для корреспонденции: Гришачёва Татьяна Георгиевна, e-mail: laser82@mail.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Петрищев Н.Н., Кривченко А.И.; проведение экспериментов, работа с животными, сбор и обработка материала – Гришачёва Т.Г., Струй А.В., Михайлова И.А.; статистическая обработка – Гришачёва Т.Г.; написание текста – Михайлова И.А.; редактирование – Петрищев Н.Н., Кривченко А.И. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.09.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Grishacheva T.G.¹, Mikhailova I.A.¹, Petrishchev N.N.¹, Krivchenko A.I.², Strui A.V.¹

Monitoring blood flow velocity in rat mesenteric venules

¹Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University,
L'va Tolstogo Str. 6-8, St. Petersburg 197022, Russia;

²I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Prospekt Toreza 44, St. Petersburg, 194223, Russia

Development of systems for recording and automatic processing of information about direct microvascular responses is an important task for a preclinical study of drugs influencing the microcirculation.

The aim was to modify the method for on-line recording and processing of intravital images of microvessels to study changes in the blood flow velocity under disturbing impacts.

Method. This article presents an improved technique for recording linear blood flow velocity in microvessels and for processing intravital images.

Macroscope (Wild M420, Switzerland), lens (Makrozoom 6.3-32x), and high-speed digital camera (Basler acA2000-165uc USB3.0, Germany) with a CMOSIS CMV2000 matrix were used for visual tracking of changes in blood flow velocity. The camera allows obtaining full-frame, 2000x1000 pixel images with a frequency of 165 fps, and linear images with a frequency of 8000 fps to capture a wide range of linear blood flow velocities. The scale of an image obtained with the microscope-camera system is 0.7 microns per pixel, which makes it possible to measure velocities of 0.1 to 150 mm/s.

Digitizing and analyzing images were performed with a MultiMedia Catalog software, Version 2.3 (MMCatalog, Russia). The analysis of blood flow velocity is based on direct measurement of the blood cell flow velocity. The velocity is measured by estimation of the shift of blood cell flow for a predetermined time period between two measurements. To this purpose, a linear marker oriented along the vessel is applied to the blood flow image in a selected section of the microvessel. Following the measurement onset, the camera switches to a linear mode along the marker every second. A series of 5–6 measurements of linear images is taken at definite time intervals. Then measurements are used for construction of optical slices and measurement of the relative shift of the curve. The curve shift is determined by estimating the sum of differences between two arrays of curve brightness in scanning from –20 to +20% of the current position. The position corresponding to the minimum sum of differences is considered the value of curve shift. This procedure is performed for all 5–6 pairs of measurements. From the obtained values of curve shifts a median is selected, which is used as a result of measuring the velocity. Then the camera is again switched to the full-frame shooting mode, which allows you to control the position of the marker in real time. During the experiment, the object may move due to movements or breathing of the animal. To adjust the marker position on the image, it is possible to change its position during the measurements.

The program captures the obtained values of curve shifts and, thereby, the blood flow velocity. Based on the blood flow velocity, the program allows adjusting the number of measurements per unit time, which makes it possible to maintain stability of velocity measurements. To reduce the effect of high-frequency noise the curves are smoothed using moving averages. The averaging intensity can be adjusted in the process of measurement.

Recording of blood flow velocity in a selected area is performed continuously during the entire experiment.

Experimental protocol:

- recording of the initial blood flow for 180 s;
- recording of blood flow during laser irradiation for 300 s;
- recording of blood flow after the exposure for 300 s.

Results. This method of recording blood flow velocity allows recording increases in venular blood flow velocity both during and after an exposure to laser irradiation (662 nm).

Conclusion. The proposed technique for processing intravital images of blood flow makes it possible to record fast changes in blood flow velocity in microvessels under disturbing impacts in real time.

Keywords: microcirculation; linear blood flow velocity; venules; laser irradiation.

For citation: Grishacheva T.G., Mikhailova I.A., Petrishchev N.N., Krivchenko A.I., Strui A.V. Monitoring blood flow velocity in rat mesenteric venules. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 156-162 (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.156-162

For correspondence: *Grishacheva Tatyana Georgievna*, Junior Researcher, Center for Laser Medicine, Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, e-mail: laser82@mail.ru

Contribution: the concept and design of the research – Petrishchev N.N., Krivchenko A.I.; conducting experiments, working with animals, collecting and processing material – Grishacheva T.G., Strui A.V., Mikhailova I.A.; statistical processing – Grishacheva T.G.; writing a text – Mikhailova I.A.; editing – Petrishchev N.N., Krivchenko A.I.

Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgment. The study had no sponsorship

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

Information about the authors:

Grishacheva T.G., <https://orcid.org/0000-0002-9515-914X>

Mikhailova I.A., <https://orcid.org/0000-0003-4292-9654>

Petrishchev N.N., <https://orcid.org/0000-0003-4760-2394>

Krivchenko A.I., <https://orcid.org/0000-0001-5807-2021>

Strui A.V., <https://orcid.org/0000-0002-4874-0564>

Received 11.09.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

В настоящее время прижизненная микроскопия дает возможность проводить исследования сосудов микроциркуляторного русла с большой разрешающей способностью [1]. В случае использования конфокальной микроскопии перспективен метод совмещения оптического изображения микрососуда с изображением, получаемым при доплеровской оптической корреляционной томографии, что особенно важно для сильно рассеивающих тканей [2]. Для слабо рассеивающих сред, например, брыжейки тонкой кишки крыс, более информативны методы оцифровки и анализа оптических изображений, дающие возможность исследовать изменения скорости кровотока в отдельно выбранном участке сосудистого русла под воздействием различных факторов в режиме реального времени [3]. Развиваемые в последние годы методы обработки данных по скорости кровотока в отдельных участках системы микроциркуляции с помощью вживленных цифровых камер особенно эффективны при длительном наблюдении за животными [4]. Однако такие камеры обладают небольшой разрешающей способностью, что ограничивает спектр их применения для изучения микроциркуляции. Ультразвуковые методы измерения гидродинамических параметров малоэффективны для микрососудов малых диаметров (<100 мкм) [5]. Поэтому разработка систем для регистрации и автоматической обработки информации о непосредственной реакции микрососудов на различные факторы является важной задачей, способствующей, прежде всего, доклинической проверке новых препаратов, воздействующих на систему микроциркуляции.

Цель исследования – модификация метода on-line-регистрации и обработки интравитальных изображе-

ний микрососудов для изучения динамики скорости кровотока при возмущающих воздействиях, в частности, при лазерном облучении (662 нм).

Методика

Животные. Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 240–280 г, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово». Животные имели ветеринарный сертификат. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, и согласованы с Этическим комитетом ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Животные содержались на неограниченном потреблении корма (К-120 «Информ-корм», Россия) и воды при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 ч (свет:темнота). Температура поддерживалась в пределах 18–20 °С, относительная влажность — 50–70 %. Длительность акклиматизационного периода для всех животных 14 дней.

Экспериментальный протокол. Объектом исследования были вены брыжейки тонкой кишки крыс диаметром 20–40 мкм. Перед исследованием кровотока животных наркотизировали: смесь (2:1) золетил-50 (*Virbac Sante Animale*, Франция) и ксила (ксилазин гидрохлорид 20 мг/мл, *Interchemiewerken «DeAdelaar» B.V.*, Нидерланды) вводили внутримышечно в дозе 0,75 мл/кг. Через нижнесрединный доступ извлекали петлю тонкой кишки, примыкающую к мезоаппендиксу. Животное в течение всего эксперимента находилось на термостатируемом столике (KEL-2000, Великобритания), имеющем окно для проходящего света, выполненное из кварцевого стекла, над которым размещали петлю

брыжейки тонкой кишки. Исследуемый участок брыжейки постоянно орошали с помощью шприцевого автоматизированного дозатора (SK-500I, КНР) стерильным физиологическим раствором (0,9 % NaCl), температура раствора 37,5 °С.

Исследование гемомикроциркуляции. Для визуальной фиксации изменения скорости кровотока использовали микроскоп (Wild M420, Швейцария), объектив (Макроzoom 6.3-32'), быстродействующую цифровую камеру (Basler acA2000-165uc USB3.0, Германия) с матрицей CMOSIS CMV2000. Камера позволяет получать полнокадровые изображения 2000×1000 пикселей с частотой 165 кадров/с, а линейные изображения с частотой 8000 кадров/с, что позволяет фиксировать достаточно широкий диапазон линейных скоростей кровотока. Масштаб полученного с помощью системы «микроскоп – камера изображения» составляет 0,7 мк на пиксел, что дает возможность измерения скоростей от 0,1 до 150 мм/с.

В работе использован метод оцифровки и анализа изображений на основе пакета программ «МультиМедиа Каталог» версии 2.3 («ММCatalog», Россия). Анализ скорости кровотока основан на непосредственном измерении скорости движения потока клеток крови. При измерении скорости определяется смещение потока клеток крови между двумя измерениями через заданный промежуток времени. Для этого на изображении кровотока в выбранном участке микрососуда наносится линейный маркер (рис. 1, а), ориентированный вдоль русла сосуда. После запуска процесса измерений камера каждую секунду переводится в режим линейной съемки вдоль маркера. Производится съемка серии из 5–6 измерений линейных изображений с заданным интервалом времени, по ним строятся оптические срезы и измеряется относительное смещение кривой (рис. 1, б).

Смещение кривой определяется методом оценки суммы разностей одного массива яркостей графика от другого при сканировании от –20 до +20% от текущей позиции. Позиция, соответствующая минимальной сумме разностей, считается величиной смещения графиков. Эта процедура проводится для всех 5–6 пар измерений.

Из полученных значений смещения графиков выбирается медиана, которая и используется как результат измерения скорости (рис. 1, в). Затем камера опять переводится в режим съемки полнокадровых изображений, что позволяет контролировать положение маркера в реальном времени. Во время эксперимента могут происходить перемещения объекта из-за движения или дыхания животного. Для корректировки положе-

ния маркера на изображении сосуда есть возможность изменения его позиции во время измерений. Программа фиксирует полученные значения смещения графиков и как следствие скорость кровотока. В зависимости от скорости кровотока программа позволяет регулировать число измерений в единицу времени, что дает возможность поддерживать стабильность измерения скорости. Для снижения влияния высокочастотного шума проводится сглаживание графиков с помощью скользящего усреднения. Интенсивность усреднения регулируется в процессе измерений.

Дизайн исследования. Регистрация скорости кровотока в выбранном участке проводится непрерывно в течение всего эксперимента.

Схема проведения эксперимента:

- запись исходного кровотока в течение 180 с;
- регистрация кровотока во время лазерного облучения — 300 с;
- регистрация кровотока после воздействия — 300 с.

Животных разделили на 2 группы: 1-я группа — интактные крысы ($n=15$); 2-я группа — лазерное облучение сосудов ($n=15$). Для облучения венул брыжейки использовали полупроводниковый лазерный аппарат (Алод-01, Россия) с непрерывной генерацией ($\lambda=662$ нм). Лазерное излучение вводили в оптическую систему микроскопа с помощью световода («Полиорник», Россия) и фокусировали на одну венулу в зоне наблюдения: диаметр пятна 200 мкм. Мощность облучения в плоскости объекта (35 мВт) контролировали с помощью измерителя мощности (Advantest Q8230) перед каждым экспериментом. Плотность мощности в плоскости объекта составила 0,11 Вт/см²; суммарная плотность энергии облучения— 33 Дж/см². Используемая плотность мощности лазерного облучения была ниже пороговой, вызывающей тепловые эффекты для выбранной длины волны.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения SAS 9.4.0. Проводили дисперсионный анализ на рангах с последующим сравнением групп по критерию Данна. Данные представлены как медиана (нижний/верхний квартиль) и в виде процентов по отношению к исходному значению. Отличия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты исследования

В результате регистрации скорости кровотока формировался ряд значений с неравномерным временным шагом. Чтобы упорядочить значения по временной шкале была использована аналитическая программа «Deductor Studio» [6], с помощью которой все

данные по времени усредняли с шагом 10 с. Данные по скорости в этом промежутке времени получали путем расчета среднего арифметического значения без учета случайных выбросов, связанных с чувствительностью камеры. Данные опытов каждой серии характеризовались существенным различием исходных значений скорости кровотока вследствие использования разных кровеносных сосудов у крыс. Исходная скорость кровотока во всех экспериментах колебалась в интервале от 2500 до 8000 мкм/с. Гистограмма скоростей в венулах ($d = 20\text{--}40$ мкм) микроциркуляторного русла брыжейки крыс в отсутствие внешних воз-

действий (контроль) показана на **рис. 2**. Полученные значения согласуется с данными литературы [7, 8]. При этом в группе интактных крыс скорость кровотока в венуле не была постоянной, имели место колебания скорости кровотока в пределах 20 % в течение всего периода наблюдения (13 мин), что также отмечается в работе [8].

Известно, что при лазерном облучении сосудов в красной области спектра отмечается некоторое увеличение скорости кровотока [9]. В группе с лазерным воздействием (662 нм) медиана исходной скорости кровотока в венулах составила 5976 (5887–7020) мкм/с.

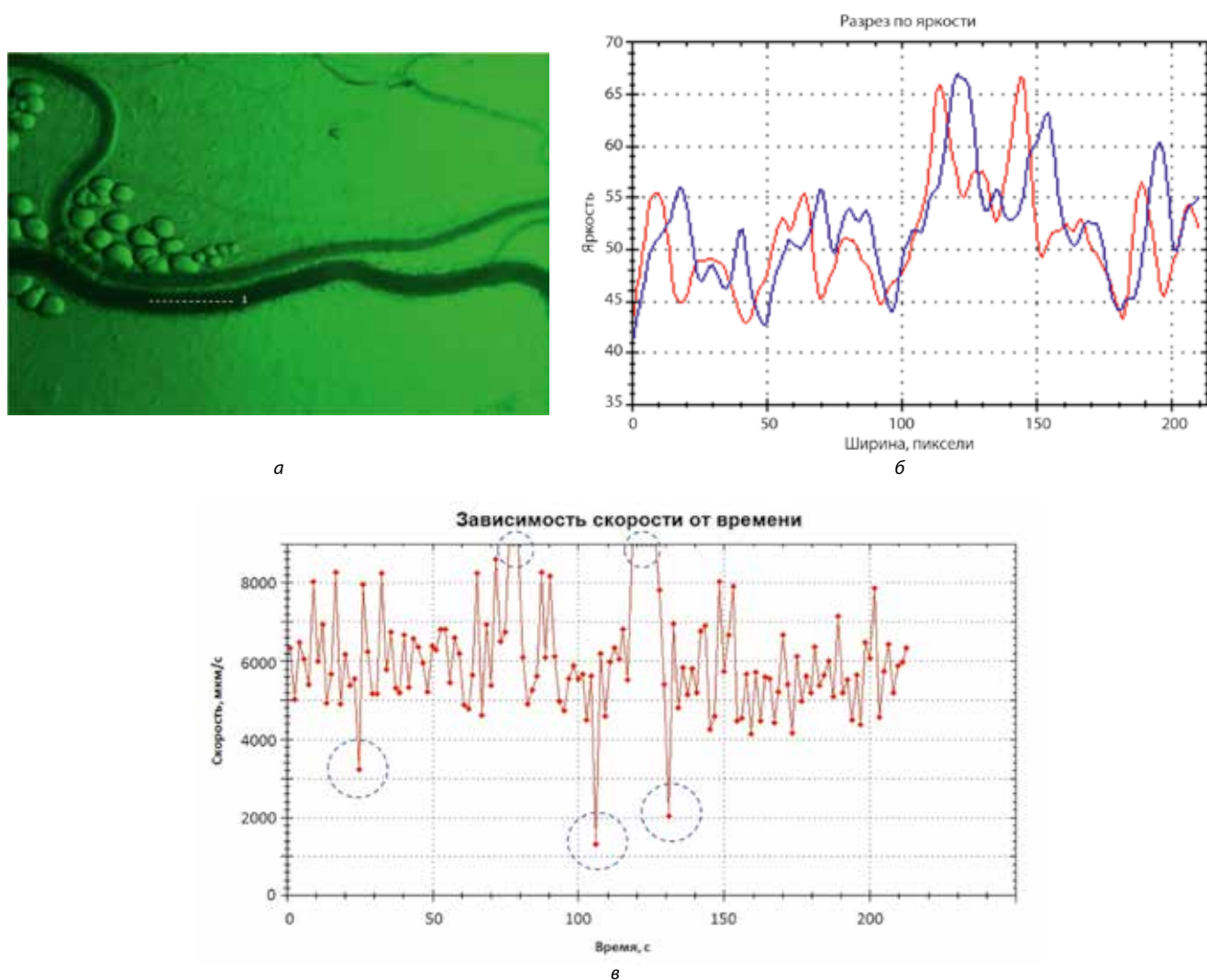


Рис. 1. Метод анализа изображений с помощью программы «МультиМедиа Каталог».

a — нанесение линейного маркера (1) на выбранный участок венулы; *б* — график двух оптических срезов, иллюстрирующий смещение кровотока за выбранный интервал времени (синий график – оптический срез первого кадра; красный – оптический срез следующего за ним кадра); *в* — регистрация скорости кровотока с учетом случайных выбросов (отмечено пунктиром).

Как видно на **рис. 3**, значимые изменения скорости кровотока регистрируются через 3 мин после начала облучения (что соответствует плотности энергии 18 Дж/см²), т. е. имеет место латентный период. Увеличение скорости составляло 12,5 % ($p < 0,05$). К концу периода облучения (5 мин, 33 Дж/см²) скорость кровотока увеличилась на 22,1 % по сравнению с исходной и продолжала увеличиваться после лазерного воздействия. К концу наблюдения за кровотоком увеличение скорости составило 28,5 % по сравнению с ис-

ходной ($p < 0,01$). Значения медианы скоростей кровотока в ходе эксперимента приведены в **таблице**.

Заключение

Предложенная методика обработки интравитальных изображений кровотока дает возможность регистрировать в режиме реального времени быстрые изменения скорости кровотока в микрососудах при возмущающих воздействиях, в частности облучении микрососудов лазерным излучением. Данный способ регистрации скоро-

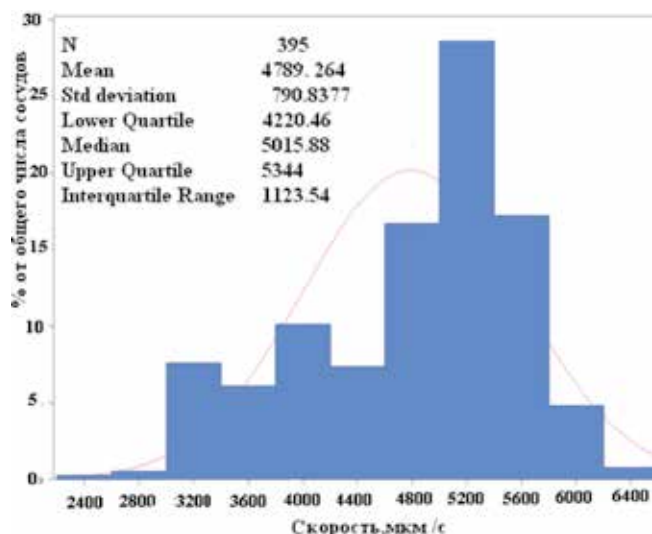


Рис. 2. Распределение скоростей в венах микроциркуляторного русла брыжейки крыс (d = 20–30 мкм).

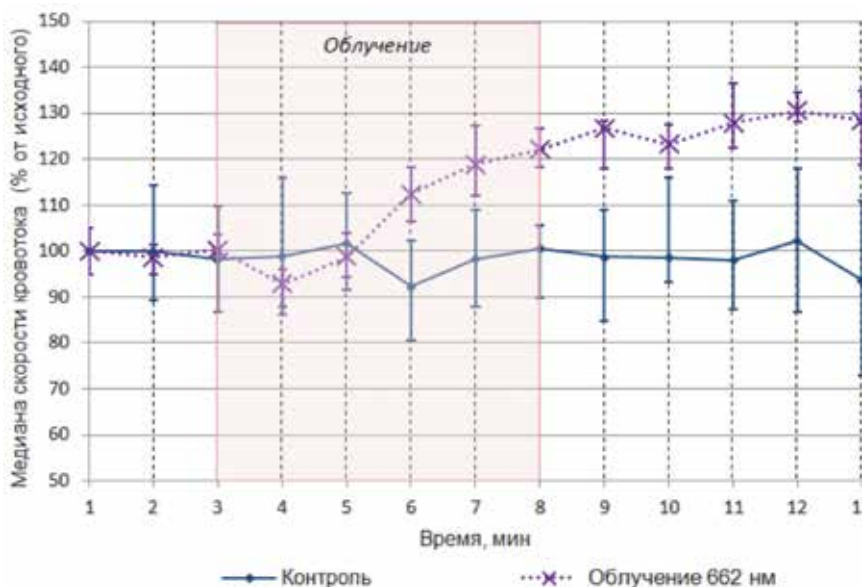


Рис. 3. Изменение медианы распределения линейной скорости кровотока в венах брыжейки тонкой кишки крыс при лазерном облучении (662 нм), % от исходной.

Значения медианы скоростей кровотока в ходе эксперимента, мкм/с

Время эксперимента, мин	Контроль (n=15)			Облучение 662 нм (n=15)		
	медиана	нижний квартиль	верхний квартиль	медиана	нижний квартиль	верхний квартиль
1-я	5083	4795	5185	5976	5887	7020
2-я	5079	5007	5224	5899	5147	6297
3-я (начало облучения)	4988	4880	5253	5997	5102	6299
4-я	5026	3979	5127	5547	4927	6247
5-я	5165	4844	5182	5901	5583	6301
6-я	4689	4216	5099	6723	6516	6938
7-я	4996	4830	5170	7100	6972	7485
8-я (конец облучения)	5105	4544	5357	7295	6515	7991
9-я	5018	4311	5395	7572	7051	7626
10-я	5005	3960	5272	7365	6957	7681
11-я	4981	4174	5228	7640	7570	7746
12-я	5199	4038	5466	7802	7709	7905
13-я	4759	4440	5215	7679	7443	7907

Примечание. Наблюдаемые изменения можно рассматривать как результат фотобиостимулирующего влияния лазерного излучения (662 нм) на сосуды микроциркуляторного русла.

сти кровотока позволил зафиксировать повышение скорости кровотока в венулах как во время воздействия лазерным излучением (662 нм), так и после его окончания.

Литература

(п.п. 1-4; 7; 8 см. References)

- Мацеевский Д.Д. Измерения кровотока в исследованиях макро- и микроциркуляции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004; 138(12): 612–16.
- Белик А.Г., Цыганенко В.Н. *Информационные технологии анализа данных*. Омск: Изд-во ОмГТУ, 2015.
- Дворецкий Д.П., Тимошенко Т.Е., Белобокова Н.К. Влияние низкоинтенсивного излучения гелий-неонового лазера на микроциркуляцию в брыжейке крыс. *Российский физиолог. журн. им. И.М. Сеченова*. 2004; 90(11): 1356–62.

References

- Eriksson S., Nilsson J., Stureson C. Non-invasive imaging of microcirculation: a technology review. *Medical Devices: Evidence and Research*. 2014; 7: 445–52.
- Khurana M., Moriyama E.H., Mariampillai A., Wilson B.C. Intravital high-resolution optical imaging of individual vessel response to photodynamic treatment. *JBO Letters*. 2008; 13(4): 040502-1–3.

Сведения об авторах:

Гришачёва Татьяна Георгиевна, мл. науч. сотр. Центра лазерной медицины Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, e-mail: laser82@mail.ru;

Михайлова Ирина Анатольевна, доктор биол. наук, проф. каф. физики, математики и информатики Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, e-mail: fisika45@mail.ru;

Петричев Николай Николаевич, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, e-mail: lasmed@ya.ru;

Кривченко Александр Иванович, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. сравнительной физиологии дыхания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург, e-mail: allkriv@ya.ru;

Струй Андрей Владимирович, мл. науч. сотр. Центра лазерной медицины Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, e-mail: as@mmcatalog.com