

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 18.02.2021
Подписано к печати 26.02.2021
Опубликовано 10.03.2021

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

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и экспер. тер.
2021. Том 65. № 1. 1–140

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, 2021.

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 65 № 1 · 2021

Январь–Март

Главный редактор:

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

Заместители главного редактора:

И.С. Гушин, *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. Кубагитов, *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.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 НИИЦ РАН, Томск*
Д.А. Еникеев, *д.м.н., проф., БГМУ, Уфа*
В.П. Куликов, *д.м.н., проф., АМИПДО, Барнаул*
В.П. Михайлов, *д.м.н., проф., ЯГМУ, Ярославль*
В.Г. Овсянников, *д.м.н., проф., РостГМУ, Ростов-на-Дону*
С.Н. Орлов, *д.б.н., проф., МГУ, Москва*
Н.Н. Петрищев, *д.м.н., проф., ПСПбГМУ, Санкт-Петербург*
Л.А. Северьянова, *д.м.н., проф., КГМУ, Курск*
В. Шварц, *д.м.н., проф., Саарский Университет, Холбург/Саар, Германия*

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 18.02.2020
Signed for publication on 26.02.2020
Published on 10.03.2020

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

ISSN 0031-2991

Pat Fiziol Eksp Ter
2021. Volume 65. No 1. 1-140

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, 2021.

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. 65 № 1 · 2021
January–March

Editor in chief:

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

Assistant editors in chief:

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

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.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*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Галкин С.А., Рощина О.В., Кисель Н.И., Иванова С.А., Бохан Н.А.** Параметры когерентности биоэлектрической активности мозга и уровень фосфорилированных нейрофиламентов в сыворотке крови при коморбидном течении алкогольной зависимости и аффективных расстройств ... 5
- Капица И.Г., Алымов А.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б.** Влияние афобазола на изменения в раннем постнатальном периоде у мышей линии BALB/c с фетальным вальпроатным синдромом 12
- Степанов С.С., Кошман И.П., Шоронова А.Ю., Калинин А.Г., Акулинин В.А., Степанов А.С., Авдеев Д.Б., Маркелова М.В.** Структурные основы изменения межнейронной коммуникации нейронов поля CA₃ гиппокампа белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы. 22
- Муровец В.О., Ленцман М.В.** Бензиловый эфир креатина эффективен для профилактики и лечения неврологических и когнитивных нарушений при фокальной ишемии головного мозга у крыс. 35
- Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Косинова А.А.** Хемилюминесцентная активность и агрегация тромбоцитов при хронической коронарной болезни сердца на фоне терапии ацетилсалициловой кислотой до и после коронарного шунтирования 42
- Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Шубина Т.А., Андреева Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е.** Сравнительное действие пептида Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro, варфарина и ацетилсалициловой кислоты при интрагастральном введении на параметры гемостаза и уровень глюкозы крови на фоне развития метаболического синдрома у крыс 52
- Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М., Попов С.В., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С.** Аллогенный биоматериал – индуктор регенерации ишемически поврежденного миокарда в эксперименте. 60
- Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Мухамадияров Р.А., Великанова Е.А.** Детекция окислительного стресса в артериальных эндотелиальных клетках человека при воздействии кальций-фосфатных бионов. 70
- Абрамов К.С., Давыдова Е.В., Осиков М.В., Огнева О.И., Сеницкий А.И.** Динамика изменений показателей свободно-радикального окисления при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии ... 79
- Ефремов А.В., Храмых Т.П., Говорова Н.В., Ермолаев П.А.** Динамика хемилюминесценции в тонкой кишке на фоне анестетического прекондиционирования при геморрагической гипотензии 86
- Осиков М.В., [Симонян Е.В.], Агеева А.А., Сеницкий А.И., Агеев Ю.И.** Локальный ПОЛ-ограничивающий и ускоряющий заживление эффект мелатонина в составе оригинальной дермальной пленки при экспериментальной термической травме 94

ОБЗОРЫ

- Хохлова А.В., Бойченко П.К., Пархомчук Д.С., Востриков А.А.** Течение COVID-19 у лиц с сахарным диабетом и ожирением в кластере метаболического синдрома 102

ORIGINAL ARTICLES

- Galkin S.A., Roshchina O.V., Kisel N.I., Ivanova S.A., Bokhan N.A.** Coherence parameters of cerebral bioelectric activity and blood serum levels of phosphorylated neurofilaments in comorbid alcohol dependence and affective disorders
- Kapitsa I.G., Alymov A.A., Voronina T.A., Seredenin S.B.** Effect of afobazole on early postnatal changes in BALB/c mice with fetal valproate syndrome
- Stepanov S.S., Koshman I.P., Shoronova A.Yu., Kalinichev A.G., Akulinin V.A., Stepanov A.S., Avdeev D.B., Markelova M.V.** The structural base for changes in the interneuronal communication of CA₃ neurons in the hippocampus of white rats after severe traumatic brain injury
- Murovets V.O., Lentsman M.V.** Creatine benzyl ester is effective for prevention and treatment of neurological and cognitive disorders caused by focal cerebral ischemia in rats
- Goncharov M.D., Grinshtein Yu.I., Savchenko A.A., Kosinova A.A.** Chemiluminescent activity and platelet aggregation in chronic coronary heart disease during the acetylsalicylic acid therapy before and after coronary bypass surgery
- Lyapina L.A., Myasoedov N.F., Shubina T.A., Andreeva L.A., Obergan T.Yu., Grigorieva M.E.** Comparative effects of intragastric Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro peptides, warfarin, and acetylsalicylic acid on hemostasis indexes and blood glucose in development of metabolic syndrome in rats
- Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Popov S.V., Afanasiev S.A., Kondratieva D.S.** Allogeneic biomaterial as an inductor of regeneration in the myocardium injured by experimental ischemia
- Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Mukhamadiyarov R.A., Velikanova E.A.** Detection of oxidative stress induced by calcium phosphate bions in human arterial endothelial cells
- Abramov K.S., Davydova E.V., Osikov M.V., Oгнева O.I., Sinickij A.I.** Changes in free-radical oxidation in isolated femoral fracture during the systemic ozone therapy
- Efremov A.V., Khramykh T.P., Govorova N.V., Ermolaev P.A.** Dynamics of chemiluminescence in the small intestine during anesthetic preconditioning in hemorrhagic hypotension
- Osikov M.V., [Simonyan E.V.], Ageeva A.A., Sinickij A.I., Ageev Yu.I.** Local effect of melatonin in an original dermal film limiting lipid peroxidation and accelerating healing in experimental thermal trauma

REVIEWS

- Khokhlova A.V., Boichenko P.K., Parkhomchuk D.S., Vostrikov A.A.** COVID-19 in persons with diabetes mellitus and obesity in a cluster of metabolic syndrome

СОДЕРЖАНИЕ

Быков Ю.Н., Тетюшкин Н.А., Чипизубов В.А., Калягин А.Н., Лаврик С.Ю. Роль ренин-ангиотензиновой системы в патогенезе болезни Паркинсона.....	107
Пальцын А.А. Ресвератрол	116
Лосев О.Э., Бородулин В.Б., Русецкая Н.Ю., Бобылева Е.В., Бородулин Я.В. Молекулярные механизмы развития рака легкого	124

МЕТОДИКА

Верлов Н.А., Ланда С.Б., Егоров В.В., Эмануэль Ю.В., Эмануэль В.Л. Уромодулин: связь олигомерных форм и функции	133
--	-----

CONTENTS

Bykov Yu.N., Tetyushkin N.A., Chipizubov V.A., Kalyagin A.N., Lavrick S.Yu. The role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of Parkinson's disease	107
Paltsyn A.A. Resveratrol	116
Losev O.E., Borodulin V.B., Rusetskaya N.Y., Bobyleva E.V., Borodulin Y.V. Molecular mechanisms of lung cancer	124

METHODS

Verlov N.A., Landa S.B., Egorov V.V., Emanuel Yu.V., Emanuel V.L. Uromodulin: Relationship of protein oligomeric forms and functions	133
---	-----

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092

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

Параметры когерентности биоэлектрической активности мозга и уровень фосфорилированных нейрофиламентов в сыворотке крови при коморбидном течении алкогольной зависимости и аффективных расстройств

¹ Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
634014, Томск, Россия, ул. Алеутская, д. 4;

² Сибирский государственный медицинский университет,
634050, Томск, Россия, Московский тракт, д. 2

Введение. Наряду со многими психическими расстройствами алкогольная зависимость и аффективные расстройства являются результатом взаимодействия генетических, социальных и экологических факторов, что сопровождается морфофункциональными изменениями в центральной нервной системе. Тем не менее, основные причины и механизмы развития коморбидности алкоголизма и аффективных расстройств остаются не до конца ясны.

Цель исследования – определение функциональной связности и уровня фосфорилированных нейрофиламентов у пациентов с алкогольной зависимостью и коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства.

Методика. Обследовано 60 пациентов после детоксикации: 30 пациентов с алкогольной зависимостью и 30 пациентов с коморбидным течением алкогольной зависимости и аффективного расстройства. Контрольную группу составили 20 психически и соматически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту. Исследование биоэлектрической активности головного мозга проводилось при помощи 16-канального энцефалографа. Анализировались общие усредненные значения внутри – и межполушарной когерентности. В сыворотках крови определяли содержание фосфорилированных нейрофиламентов методом твердофазного иммуноферментного анализа на полистироловых планшетах, предварительно покрытых куриными поликлональными антителами.

Результаты. При межгрупповом анализе были выявлены статистически значимо более низкие значения когерентности в правой гемисфере у пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства по сравнению с пациентами, страдающими только алкогольной зависимостью. Были обнаружены также статистически значимо более высокие значения концентрации нейрофиламентов в группе пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства по сравнению со здоровой группой контроля. При сравнении групп пациентов между собой были обнаружены более высокие значения концентрации нейрофиламентов у пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства на уровне тенденции.

Заключение. Наличие коморбидности алкоголизма и аффективных расстройств приводят к нейрофизиологическим изменениям в виде снижения функциональной связности коры головного мозга, особенно в правой гемисфере, а также увеличению степени нейронального повреждения.

Ключевые слова: коморбидность; алкоголизм; аффективные расстройства; когерентность; нейрофиламенты

Для цитирования: Галкин С.А., Рощина О.В., Кисель Н.И., Иванова С.А., Бохан Н.А. Параметры когерентности биоэлектрической активности мозга и уровень фосфорилированных нейрофиламентов в сыворотке крови при коморбидном течении алкогольной зависимости и аффективных расстройств. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 5-11.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.5-11

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, подготовка иллюстративного материала, статистический анализ, написание текста – Галкин С.А.; сбор и обработка материала – Галкин С.А., Рощина О.В., Кисель Н.И., редактирование – Иванова С.А., Бохан Н.А.

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

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

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Поступила 14.04.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Galkin S.A.¹, Roshchina O.V.¹, Kisel N.I.¹, Ivanova S.A.^{1,2}, Bokhan N.A.^{1,2}

Coherence parameters of cerebral bioelectric activity and blood serum levels of phosphorylated neurofilaments in comorbid alcohol dependence and affective disorders

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

Background. Similar to many mental disorders, alcohol dependence and affective disorders result from interaction of genetic, social, and environmental factors associated with morpho-functional alterations in the central nervous system. However, major causes and mechanisms of the development of comorbid alcoholism and affective disorders are not fully clear.

The aim of this study was to determine the functional connectivity and levels of phosphorylated neurofilaments in patients with alcohol dependence and comorbid alcohol dependence and affective disorder.

Methods. 60 patients were evaluated after detoxification, including 30 patients with alcohol dependence and 30 patients with comorbid alcohol dependence and affective disorder. The control group consisted of 20 sex- and age-matched, mentally and somatically healthy individuals. Brain bioelectric activity was recorded with a 16-channel encephalograph. Overall average values of intra- and inter-hemispheric coherence were analyzed. Blood serum concentration of phosphorylated neurofilaments was measured by solid-phase enzyme immunoassay on polystyrene plates pre-coated with chicken polyclonal antibodies.

Results. The intergroup analysis showed that coherence values for the right hemisphere were significantly lower in patients with comorbid alcohol dependence and affective disorder compared to patients with alcohol dependence alone ($p=0.018$). Also, concentrations of neurofilaments were significantly higher in the patient group with comorbid alcohol dependence and affective disorder compared to the healthy control group ($p=0.042$). Comparison of patient groups showed that neurofilament concentrations had a tendency toward higher values in patients with comorbid alcohol dependence and affective disorder ($p=0.092$).

Conclusion. The presence of comorbid alcoholism and affective disorders leads to neurophysiological alterations evident as reduced functional connectivity of the cerebral cortex, particularly in the right hemisphere, as well as to the increased degree of neuronal damage.

Keywords: comorbidity; alcoholism; affective disorders; coherence; neurofilaments

For citation: Galkin S.A., Roshchina O.V., Kisel N.I., Ivanova S.A., Bokhan N.A. Coherence parameters of cerebral bioelectric activity and blood serum levels of phosphorylated neurofilaments in comorbid alcohol dependence and affective disorders. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 5-11. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.5-11

Contribution: study concept and design, preparation of illustrations, statistical analysis, writing –Galkin S.A.; material collection and processing –Galkin S.A., Roshchina O.V., Kisel N.I.; editing –Ivanova S.A., Bokhan N.A.

For correspondence: **Stanislav A. Galkin**, postgraduate student of Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, e-mail: s01091994@yandex.ru

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

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Information about the authors:

Galkin S.A., <https://orcid.org/0000-0002-7709-3917>

Roshchina O.V., <https://orcid.org/0000-0002-2246-7045>

Ivanova S.A., <https://orcid.org/0000-0001-7078-323X>

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

Received 14.04.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

По данным ряда исследований частота аффективных расстройств при алкогольной зависимости составляет от 12 до 79% [1, 2]. Наличие сочетанной (коморбидной) патологии — алкогольной зависимости и аффективных расстройств значительно повышает риск суицидального поведения, возникают трудности в диагностике основного заболевания из-за полиморфизма симптоматики, повышается резистентность к традиционным методам терапии, возрастает вероятность рецидива и т.д. [2, 3]. Наряду со многими психическими расстройствами алкогольная зависимость и аффективные расстройства являются результатом взаимодействия генетических, социальных и экологических факторов, что сопровождается морфофункциональными изменениями в центральной нервной системе (ЦНС) [4]. Тем не менее, основные причины и механизмы развития коморбидности алкоголизма и аффективных расстройств до конца не ясны.

Одним из основных и наиболее доступных методов исследования функциональной активности ЦНС является компьютерная электроэнцефалография (кЭЭГ). В настоящее время все больше исследователей обращают внимание на функциональную связность (когерентность) биоэлектрической активности головного мозга, являющуюся количественным показателем синхронности вовлечения различных корковых зон при их функциональном взаимодействии, обеспечивающем интегративную деятельность мозговых структур [5]. При этом по результатам исследований нейровизуализации уровень когерентности зависит от плотности белого вещества (проводящая система) в головном мозге [6-8]. Согласно данным литературы при многих психических расстройствах происходит снижение функциональной связности биоэлектрической активности головного мозга, в том числе у пациентов с алкогольной зависимостью [9, 10] и аффективными расстройствами [11, 12], что указывает на функциональные и морфологические изменения в ЦНС. Также все больше исследователей склоняются к гипотезе о нейродегенеративном механизме развития аддиктивных и аффективных расстройств [13, 14]. Одним из маркеров деструкции нейронов (нейродегенерации) являются фосфорилированные нейрофиламенты (pNF), которые высвобождаются из поврежденных аксонов (проводящая система) и могут быть выявлены в периферической крови [15]. Ряд исследователей обнаружили повышение концентрации pNF при аддиктивных и депрессивных расстройствах в ликворе [16, 17]. Однако, данных о содержании pNF в сыворотке крови

у больных с алкогольной зависимостью, аффективными расстройствами и в случае их коморбидности нами обнаружено не было.

Цель исследования — определение функциональной связности и уровня фосфорилированных нейрофиламентов у пациентов с алкогольной зависимостью и коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства.

Методика

Выборка

Исследование проводилось на базе 4-го отделения клиники НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (отделение аддиктивных состояний), согласно протоколу, утвержденному локальным этическим комитетом при НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН (протокол №114).

Обследовано 60 пациентов после детоксикации: 30 пациентов с алкогольной зависимостью (F10.2 по МКБ — 10) и 30 пациентов с коморбидным течением алкогольной зависимости и аффективного расстройства легкой и средней степени тяжести. Структура группы с коморбидной патологией включала пациентов с депрессивными эпизодами (F32.0–1) — 4 пациента (13%), с биполярными аффективными расстройствами с текущим депрессивным эпизодом (F31.30) — 10 пациентов (33%), с рекуррентными депрессивными расстройствами (F33.0–1) — 4 пациента (13%) или дистимии (F34.1) — 12 пациентов (41%). Длительность детоксикации пациентов составляла от 1 до 3 сут. Исходя из данных литературы о различных профилях электрофизиологических показателей у правшей и левшей, в группу участников исследования отбирались правши по опроснику латеральных признаков. Диагностическая оценка и клиническая квалификация расстройств осуществлена с применением диагностических критериев МКБ–10. Критериями включения в исследование были: установленный диагноз алкогольной зависимости по МКБ–10, возраст 30–50 лет, добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие выраженных органических нарушений головного мозга, умственная отсталость, эпилепсия, беременность, черепно–мозговые травмы любой степени тяжести. Контрольную группу составили 20 психически и соматически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту. Сведения о давности алкогольной зависимости и аффективного расстройства были взяты из историй болезни пациентов. Половозрастная и клиническая характеристика исследуемых групп пациентов и контроля представлена в **табл. 1**.

Функциональная связность (когерентность). Исследование биоэлектрической активности головного мозга проводилось при помощи 16-ти канального энцефалографа «Неврополиграф» по международной системе «10–20». Сопротивление электродов не превышало 10 кОм. Частоты среза фильтров верхних и нижних частот составляли 1,5 и 40 Гц, частота квантования 250 Гц. Проводилась фоновая проба с закрытыми глазами в течение не менее 2 мин в состоянии спокойного бодрствования. На полученных ЭЭГ записях удалялись артефактные фрагменты. Анализировались общие усредненные значения внутри – и межполушарной когерентности. Значения коэффициентов когерентности варьируются от 0 до 1: чем выше значение когерентности, тем согласованнее активность данной области с областью, выбранной для измерения. Длительность анализируемых участков равнялась продолжительности всей пробы после удаления артефактов.

Фосфорилированный нейрофиламент – Н, рNF-H (ng/ml, BioVendor R & D Products). Для исследования уровня фосфорилированных нейрофиламентов в сыворотке крови использовался коммерческий иммуноферментный набор BioVendor R & D Products. Кровь для исследования у пациентов и лиц группы контроля брали однократно в утренние часы с 8 до 10 ч натощак. В этот же день из полученной цельной крови методом центрифугирования выделялась сыворотка, которая хранилась в морозильной камере при -80°C . В сыворотках крови определяли содержание рNF-H. Концентрацию рNF-H определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на полистироловых планшетах, предварительно покрытых куриными поликлональными анти-рNF-H антителами. После 60 мин инкубации и промывания, вносили кроличьи поликлональные анти-рNF-H антитела. После 2-й инкубации и промывания добавляли HRP (horseradish peroxidase), что приводило к образованию HRP конъюгата. Затем вновь после инкубации и промывания добавляли субстрат ТМВ (tetra-

methylbenzidine). Реакцию останавливали добавлением кислого раствора и поглощение полученного продукта измеряли спектрофотометрически. Содержание рNF-H оценивали по оптической плотности сыворотки при $\lambda=450$ нм, которая была пропорциональна концентрации рNF-H. Стандартную кривую получали путем построения значения абсорбции против концентраций стандартов. Концентрации неизвестных образцов определяли с помощью этой стандартной кривой.

Статистический анализ. Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программы Statistica 10. Данные представлены в виде Median [Q1; Q3]. Проверка согласия с законом нормального распределения проводилась с помощью критерия Шапиро–Уилка. Полученные данные не подчинялись закону нормального распределения. Использовался U – критерий Манна–Уитни для оценки различий между двумя независимыми выборками. Анализ корреляций значений когерентности и уровня рNF-H осуществлялся с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p<0,05$.

Результаты

Исследуемые группы пациентов статистически значимо не различались по возрасту ($p=0,101$) и давности алкогольной зависимости ($p=0,595$). Давность аффективного расстройства у пациентов с коморбидностью составила 5 лет [2, 7]. Согласно данным историй болезни у всех пациентов с коморбидностью аффективное расстройство сформировалось на фоне алкогольной зависимости. Группа здоровых лиц также статистически значимо не различалась по возрасту при сравнении с пациентами обеих групп ($p>0,05$).

Когерентность ЭЭГ. На рисунке представлены данные внутри- и межполушарной когерентности в исследуемых группах лиц.

Таблица 1

Половозрастная и клиническая характеристика обследуемых лиц, Me [Q1; Q3]

Группа обследованных	Состав	Возраст, лет	Давность алкогольной зависимости, лет	Давность аффективного расстройства, лет
Пациенты с алкогольной зависимостью ($n=30$)	м – 23 (76,6%) ж – 7 (23,4%)	43 [35; 46]	11 [5; 20]	-
Пациенты с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства ($n=30$)	м – 17 (56,7%) ж – 13 (43,3%)	46 [39; 50]	11 [5; 21]	5 [2; 7]
Здоровые лица ($n=20$)	м – 12 (60%) ж – 8 (40%)	41 [33; 45]	-	-

Анализ данных когерентности выявил статистически значимо более низкие значения внутри- и межполушарной когерентности в обеих группах пациентов по сравнению с здоровыми лицами ($p < 0,05$). При межгрупповом анализе были выявлены статистически значимо более низкие значения внутривнутриполушарной когерентности у пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства по сравнению с пациентами, страдающими только алкогольной зависимостью ($p = 0,04$). При более детальном анализе были обнаружены статистически значимо более низкие значения внутривнутриполушарной когерентности в правой гемисфере у пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства по сравнению с пациентами, страдающими только алкогольной зависимостью ($p = 0,018$). Уровень когерентности в левой гемисфере статистически значимо не различался между исследуемыми группами пациентов ($p = 0,27$).

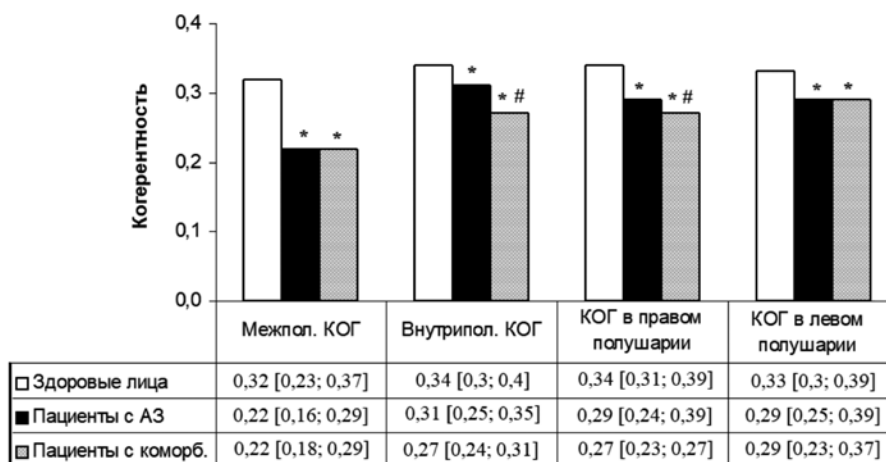
Фосфорилированный нейрофиламент — Н, рNF-H (нг/мл, BioVendor R & D Products). В табл. 2 представлены значения концентрации рNF-H в сыворотке крови у пациентов и группы здоровых лиц.

Анализ данных выявил статистически значимо более высокие значения концентрации рNF-H в группе пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства по сравнению со здоровой группой контроля ($p = 0,042$). Также при сравнении групп пациентов между собой были обнаружены более высокие значения рNF-H у пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства на уровне тенденции ($p = 0,092$). Статистически значимых различий уровня рNF-H между пациентами с алкогольной зависимостью и здоровыми лицами не обнаружено ($p = 0,302$).

Корреляционный анализ Спирмена выявил статистически значимые корреляции между значениями общей когерентности и уровнем рNF-H в группе пациентов с алкогольной зависимостью ($r = -0,3271$; $p = 0,031$) и коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства ($r = -0,3601$; $p = 0,028$).

Обсуждение

Таким образом, были определены значения когерентности ЭЭГ и уровень рNF-H в сыворотке крови у пациентов с алкогольной зависимостью и ко-



Значения когерентности в группах пациентов и здоровых лиц. Данные представлены в виде Ме [Q1; Q3]; * – уровень статистической значимости при сравнении групп пациентов со здоровыми лицами; # – уровень статистической значимости при сравнении групп пациентов между собой.

Таблица 2

Концентрация рNF-H обследуемых групп лиц, Ме [Q1; Q3]

Группа обследованных	рNF-H, пг/мл
Пациенты с алкогольной зависимостью (n=30)	24,88 [21,3; 32,2]
Пациенты с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства (n=30)	26,4 [19,5; 35,5]
Здоровые лица (n=20)	23,2 [20,1; 29,7]

морбидностью алкоголизма и аффективного расстройства.

Когерентность. В обеих исследуемых группах пациентов обнаружены статистически значимо более низкие значения внутри- и межполушарной когерентности по сравнению с контролем, что в целом согласуется с данными литературы [18, 19]. Поскольку известно, что величина когерентности отражает целостность проводящей системы в головном мозге, то вполне логично, что регулярное потребление алкоголя, оказывающее нейротоксическое воздействие на головной мозг, приводит к снижению когерентности биоэлектрической активности мозга.

При межгрупповом анализе пациентов, полученные данные указывают на более низкую функциональную связность в правом полушарии головного мозга у пациентов с коморбидным течением алкоголизма и аффективного расстройства по сравнению с пациентами, страдающими только алкогольной зависимостью. Более низкую когерентность правого полушария у пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства можно рассматривать как показатель более низкого уровня кортикальной интеграции. Кроме того, согласно данным литературы у пациентов с аффективными расстройствами акцент изменений кортикальной нейродинамики выявлен преимущественно в правой гемисфере, что свидетельствует о большей чувствительности к патопластическим влияниям правополушарных структур в случае данной патологии [20-22].

Фосфорилированные нейрофиламенты. Полученные результаты показали более высокое содержание рNF-H в сыворотке крови у пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства по сравнению со здоровыми лицами из группы контроля и пациентами, страдающими только алкогольной зависимостью. Повышенная концентрация рNF-H у пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства указывает на деструкцию аксонов нейронов, что подтверждает гипотезу о нейродегенерации. Таким образом, повреждение и потеря аксонов нейронов является патологическим субстратом коморбидного течения алкогольной зависимости и аффективного расстройства.

Заключение

В целом, полученные данные показывают, что наличие коморбидности алкоголизма и аффективных расстройств у пациентов приводит к нейрофизиологическим изменениям в виде снижения функциональной связности коры головного мозга, особенно в пра-

вой гемисфере, а также увеличением степени нейронального повреждения. При этом функциональная связность и степень нейронального повреждения находятся в обратной корреляции между собой. Было установлено, что чем ниже уровень функциональной связности, тем более высокие концентрации рNF-H в сыворотке крови у пациентов, как в случае «чистой» алкогольной зависимости, так и при коморбидном течении алкоголизма и аффективных расстройств. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о коморбидном течении алкогольной зависимости и аффективных расстройств.

Литература

(п.п. 4; 6-9; 12; 14-20 см. References)

1. Понизовский П.А., Гофман А.Г. Депрессия у больных алкогольной зависимостью. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015; (7): 146-50.
2. Розин А.И., Рошина О.В., Пешковская А.Г., Белокрылов И.И. Коморбидные сочетания алкогольной зависимости и депрессивных расстройств. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2018; (4): 40-5.
3. Галкин С.А. Клинико-нейрофизиологические особенности коморбидности алкогольной зависимости и аффективных расстройств. *Неврологический вестник*. 2019; 51(3): 57-9.
5. Мельникова Т.С., Лапин И.А., Саркисян В.В. Обзор использования когерентного анализа ЭЭГ в психиатрии. *Социальная и клиническая психиатрия*. 2009; (1): 90-4.
10. Галкин С.А., Савочкина Д.Н., Невидимова Т.И. Нейрофизиологические корреляты алкогольной зависимости. *Наркология*. 2019; (4): 44-8.
11. Лапин И.А., Алфимова М.В. ЭЭГ-маркеры депрессивных состояний. *Социальная и клиническая психиатрия*. 2014; (4): 81-9.
13. Афтанас Л.И. Депрессия и нейродегенерация: новые стратегии диагностики и терапии. *Наука из первых рук*. 2017; (1): 40-9.
21. Галкин С.А., Пешковская А.Г., Симуткин Г.Г., Васильева С.Н., Рошина О.В., Иванова С.А. и др. Нарушения функции пространственной рабочей памяти при депрессии легкой степени тяжести и их нейрофизиологические корреляты. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2019. 119(10): 56-61. DOI: 10.17116/jnevro201911910156

References

1. Ponizovskiy P.A., Hoffman A.G. Depression in patients with alcohol dependence. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii im. S.S. Korsakova*. 2015; (7): 146-50. (In Russian)
2. Rozin A.I., Roshchina O.V., Peshkovskaya A.G., Belokrylov I.I. Comorbid combinations of alcohol dependence and depressive disorders. *Sibirskiy vestnik psikhiiatrii i narkologii*. 2018; (4): 40-5. (In Russian)
3. Galkin S.A. Clinical and neurophysiological features of comorbidity of alcohol dependence and affective disorders. *Nevrologicheskiy vestnik*. 2019; 51(3): 57-9. (In Russian)
4. Becker A., Ehret A.M., Kirsch P. From the neurobiological basis of comorbid alcohol dependence and depression to psychological treat-

- ment strategies: study protocol of a randomized controlled trial. *BMC Psychiatry*. 2017; 17(1): 153. doi: 10.1186/s12888-017-1324-0
5. Melnikova T.S., Lapin I.A., Sarkisyan V.V. Review of the use of coherent EEG analysis in psychiatry. *Sotsial'naya i klinicheskaya psichiatriya*. 2009; (1): 90-4. (In Russian)
 6. Peer M., Nitzan M., Bick A.S., Levin N., Arzy S. Evidence for Functional Networks within the Human Brain's White Matter. *J Neurosci*. 2017; 37(27): 6394-407. doi:10.1523/JNEUROSCI.3872-16.2017
 7. Zhao J., Ding X., Du Y., Wang X., Men G. Functional connectivity between white matter and gray matter based on fMRI for Alzheimer's disease classification. *Brain Behav*. 2019; 9(10):e01407. doi:10.1002/brb3.1407
 8. Chen X., Zhang H., Zhang L., Shen C., Lee S.W., Shen, D. Extraction of dynamic functional connectivity from brain grey matter and white matter for MCI classification. *Human Brain Mapping*. 2017; 38(10): 5019-34. doi:10.1002/hbm.23711
 9. Rangaswamy M., Porjesz B. Understanding alcohol use disorders with neuroelectrophysiology. *Handb Clin Neurol*. 2014; 125: 383-414. doi:10.1016/B978-0-444-62619-6.00023-9
 10. Galkin S.A., Savochkina D.N., Nevidimova T.I. Neurophysiological correlates of alcohol dependence. *Narkologiya*. 2019; (4): 44-8. (In Russian)
 11. Lapin I.A., Alfimova M.V. EEG markers of depressive States. *Sotsial'naya i klinicheskaya psichiatriya*. 2014; (4): 81-9. (In Russian)
 12. Youh J., Hong J.S., Han D.H. Comparison of Electroencephalography (EEG) Coherence between Major Depressive Disorder (MDD) without Comorbidity and MDD Comorbid with Internet Gaming Disorder. *J Korean Med Sci*. 2017; 32(7): 1160-5. doi:10.3346/jkms.2017.32.7.1160
 13. Aftanas L.I. Depression and neurodegeneration: new strategies for diagnosis and therapy. *Nauka iz pervykh ruk*. 2017; (1): 40-9. (In Russian)
 14. Crews F.T., Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol*. 2009; 44(2): 115-27. doi:10.1093/alcalc/agn079
 15. Yuan A., Rao M.V., Nixon R.A. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017; 9(4): a018309. doi:10.1101/cshperspect.a018309
 16. Jakobsson J., Bjerke M., Ekman C.J. Elevated concentrations of neurofilament light chain in the cerebrospinal fluid of bipolar disorder patients. *Neuropsychopharmacology*. 2014; 39(10): 2349-56. doi:10.1038/npp.2014.81
 17. Yuan A., Nixon R.A. Specialized roles of neurofilament proteins in synapses: Relevance to neuropsychiatric disorders. *Brain Res Bull*. 2016; 126: 334-6. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.09.002
 18. Mumtaz W., Vuong P.L., Malik A.S., Rashid R.B. A review on EEG-based methods for screening and diagnosing alcohol use disorder. *Cogn Neurodyn*. 2018; 12(2): 141-56. doi:10.1007/s11571-017-9465-x
 19. Shim M., Im C.H., Kim Y.W., Lee S.H. Altered cortical functional network in major depressive disorder: A resting-state electroencephalogram study. *Neuroimage Clin*. 2018; 19: 1000-7. doi:10.1016/j.nicl.2018.06.012
 20. Pandya M., Altinay M., Malone D.A. Where in the brain is depression? *Curr Psychiatry Rep*. 2012; 14(6): 634-42. doi:10.1007/s11920-012-0322-7
 21. Galkin S.A., Peshkovskaya A.G., Simutkin G.G., Vasilieva S.N., Roshchina O.V., Ivanova S.A., et al. Violations of the function of spatial working memory in mild depression and their neurophysiological correlates. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. C.C. Korsakova*. 2019; 119(10): 56-61. (In Russian). DOI: 10.17116/jnevro201911910156
 22. Li M., Xu H., Lu S. Neural Basis of Depression Related to a Dominant Right Hemisphere: A Resting-State fMRI Study. *Behav Neurol*. 2018; 2018: 5024520. doi:10.1155/2018/5024520

Сведения об авторах:

Галкин Станислав Алексеевич, аспирант, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, e-mail: s01091994@yandex.ru;
Рощина Ольга Вячеславовна, мл. науч. сотр., НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ;
Кисель Наталья Игоревна, канд. мед. наук, 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, 2021

УДК 616-092

Капица И.Г., Алымов А.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б.

Влияние афобазола на изменения в раннем постнатальном периоде у мышей линии BALB/c с фетальным вальпроатным синдромом

ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»,
Россия, 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Введение. Воздействие вальпроевой кислоты во время беременности у грызунов широко используется для моделирования расстройств аутистического спектра (РАС).

Цель исследования – изучение ранних поведенческих изменений у мышей BALB/c, пренатально подвергшихся однократному воздействию натриевой соли вальпроевой кислоты (400 мг/кг), и возможности их коррекции афобазолом.

Методика. Объект исследования – мыши линии BALB/c с фетальным вальпроат-синдромом (ФВС), которым с 7-х по 14-е сут постнатального развития перорально ежедневно вводили афобазол (10 мг/кг) или 0,9% раствор хлорида натрия. Контрольная группа получала 0,9% раствор хлорида натрия в эквивалентном объеме (0,1 мл на 10 г массы). Состояние мышат изучали с 6-х по 14-е сут постнатального развития, оценивали их физическое развитие, скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов, эмоционально-двигательное поведение и точную координацию движений при помощи батареи «развитийных» тестов.

Результаты. Введение самкам мышей на 13-й день беременности вальпроевой кислоты приводило к отставанию созревания у потомства сенсорно-двигательных рефлексов, нарушению эмоционально-двигательного поведения и координации движений в гнездовом периоде. Афобазол, при введении 10 мг/кг перорально ежедневно, начиная с 7-х сут постнатального развития мышам с ФВС, корригировал отмеченные нарушения в тестах, отражающих нарушения развития нервной системы.

Заключение. Установлены корригирующие свойства афобазола в отношении нарушений, вызванных пренатальным введением ВПК, что определяет целесообразность дальнейшего изучения афобазола на моделях РАС.

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра (РАС); фетальный вальпроатный синдром (ФВС); мыши линии BALB/c; раннее постнатальное развитие; афобазол

Для цитирования: Капица И.Г., Алымов А.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б. Влияние афобазола на изменения в раннем постнатальном периоде у мышей линии BALB/c с фетальным вальпроатным синдромом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 12-21.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.12-21

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Капица И.Г., Воронина Т.А., Середенин С.Б.; сбор и обработка материала, подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка, написание текста – Алымов А.А., Капица И.Г.; редактирование – Капица И.Г., Воронина Т.А., Середенин С.Б.

Для корреспонденции: Капица Инга Геннадиевна, e-mail: ingakap73@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания по теме № 0521-2019-0007.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.08.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Kapitsa I.G., Alymov A.A., Voronina T.A., Seredenin S.B.

Effect of afobazole on early postnatal changes in BALB/c mice with fetal valproate syndrome

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

Introduction. Exposure of rodents to valproic acid during pregnancy is associated with increased incidence of autism spectrum disorders, and has been extensively used as an appropriate model of autism.

Aim. To study early behavioral changes in BALB/c mice prenatally exposed to a single dose of valproic acid sodium salt (400 mg/kg) and a possibility of correcting these changes with afobazole.

Methods. The study was performed on BALB/c mice with fetal valproate syndrome (FVS). The mice were daily injected orally afobazole 10 mg/kg or 0.9% sodium chloride from day 7 to day 14 of the postnatal development. The control group was injected

with an equivalent volume (0.1 ml per 10 g body weight) of 0.9% sodium chloride. The condition of mice was studied from day 6 to day 14 of the postnatal development with evaluation of their physical development, maturation rate of sensory-motor reflexes, emotional-motor behavior, and precise coordination using a battery of «developmental» tests.

Results. Administration of valproic acid to female mice on the 13th day of pregnancy led to delayed maturation of the offspring's sensory-motor reflexes, impaired emotional-motor behavior and coordination of movements during the nesting period. Afobazole administered to mice with fetal valproate syndrome from day 7 to day 14 of the postnatal development at a dose of 10 mg/kg (daily, orally), corrected the disorders in the tests used for assessing retardation or disruption of nervous system development.

Keywords: autism spectrum disorders; ASD; fetal valproate syndrome; FVS; BALB/c mice; early postnatal phase; afobazole

For citation: Kapitsa I.G., Alymov A.A., Voronina T.A., Seredenin S.B. Effect of afobazole on early postnatal changes in BALB/c mice with fetal valproate syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 12-21. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.12-21

Contribution of authors: the concept and design of the study – Kapitsa I.G., Voronina T.A., Seredenin S.B.; collection and processing of material, preparing illustrative material, statistical processing, writing a text – Alymov A.A., Kapitsa I.G.; editing – Kapitsa I.G., Voronina T.A., Seredenin S.B.

For correspondence: Inga G. Kapitsa, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Zakusov institute of pharmacology», e-mail: ingakap73@mail.ru

Acknowledgment. The study was carried out within the framework of the State Assignment on topic No. 0521-2019-0007

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

Information about the authors:

Kapitsa I.G., <https://orcid.org/0000-0003-4487-0991>

Alymov A.A., <https://orcid.org/0000-0001-7298-5791>

Voronina T.A., <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

Seredenin S.B., <https://orcid.org/0000-0003-4482-9331>

Received 18.08.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Расстройства аутистического спектра (РАС) – группа нарушений развития, характеризующаяся дефицитом социального взаимодействия, вербальной и невербальной коммуникаций, стереотипным поведением и ограничением интересов. Проявления заболевания у пациентов с РАС в основном регистрируют начиная с 16-18 месяцев жизни [1], однако уже на ранних стадиях жизни наблюдаются колебания массы тела [2], аномальное развитие мозга [3], нарушения синаптической передачи, гиперактивность нейрональных связей, что приводит к характерным для заболевания поведенческим паттернам [1].

Вальпроевая кислота (ВПК) – противоэпилептическое средство, прием которого при беременности увеличивает риск врожденных пороков развития, задержки когнитивных функций и РАС [4], объединенных в понятие «фетальный вальпроат-синдром» (ФВС) [5]. В настоящее время модель ФВС у грызунов хорошо валидирована и широко используется в патофизиологических и фармакологических исследованиях [6-10]. В качестве объекта исследования при моделировании ФВС используются крысы и мыши разных линий, однако наиболее целесоо-

бразным нам представляется применение отобранных по фенотипу инбредных линий, в особенности мышей, которые демонстрируют социальные дефициты и стереотипное поведение, а также ряд сопряженных с РАС симптомов, относящиеся к моделям идиопатического РАС [11], что позволяет совместить в рамках одной экспериментальной модели факторы, влияющие на развитие РАС: генетические особенности животных и повреждающие факторы окружающей среды. Одним из подобных объектов является линия мышей BALB/c, обладающая фенотипическими поведенческими и нейроанатомическими особенностями, имеющих сходство с проявлениями при РАС у человека [12-14]. Разработанный в «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» анксиолитик афобазол [15], обладающий антиоксидантными, нейропротекторными, цитопротекторными свойствами [16], как было показано нами ранее, является перспективным средством для фармакотерапии РАС [17, 18]. Цель исследования – изучение особенностей нарушений в раннем гнездовом периоде жизни у мышей линии BALB/c с ФВС и возможности их коррекции афобазолом.

Методика

Исследование проведено на 100 мышах линии BALB/c возрастом 6-14 сут, массой 2,0-3,0 г в начале исследования, родительское поколение которых было получено из филиала «Столбовая» ФГБУН «НЦБМТ ФМБА». Мышей содержали в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при регулируемом световом режиме 12ч/12ч (свет/темнота) и постоянной температуре (21-23 °С) со свободным доступом к воде и гранулированному корму (ГОСТ Р 50258-92) в полипропиленовых клетках с решеткой из цинкохромовой стали, с обеспыленной подстилкой из деревянной стружки в соответствии с приказом МЗ РФ №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и санитарно-эпидемиологическим правилам СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденные 29.08.2014 г. N 51. Проведение экспериментов было одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова».

Для получения «датированной беременности» к 2-3-ем самкам мышей BALB/c, находящимся на стадии проэструса или эструса, определяемым по цитологической картине влагалищного мазка, с 17-и часов вечера до 9-и утра следующего дня, который впоследствии принимали за «0» (E0) день развития плода, подсаживали 1 самца. Оплодотворенных самок содержали по 4-5 особей в одной клетке до появления видимых признаков беременности, после чего размещали в индивидуальные клетки. РАС моделировали путем подкожного введения ВПК в дозе 400 мг/кг самкам мышей BALB/c на 13-й день беременности (E13) [9, 19]. Самкам, из потомства которых формировали группы «пассивного» контроля, в эти же сроки (E13) подкожно вводили 0,9% раствор хлорида натрия в эквивалентном объеме (0,1 мл на 10 г веса). День появления мышат принимали за «0» сутки постнатального развития (P0). Полученное потомство было разделено на 6 групп: две группы «Контроль» – самцы ($n=12$) и самки ($n=15$); две группы «ВПК» – самцы ($n=15$) и самки ($n=24$) с фетальным вальпроат-синдромом (ФВС), рожденные от мышей, которым в период беременности вводили ВПК; и две опытные группы «ВПК+Афобазол» – самцы ($n=14$) и самки ($n=20$) с ФВС, которым начиная с P7 ежедневно вводили афобазол перорально (10 мг/кг). Животные контрольных групп с P7 перорально получали дистиллированную воду в эквивалентном объеме (0,1 мл на 10 г веса).

Состояние мышат в гнездовом периоде изучали с P6 по P14, оценивая их физическое развитие, скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов, эмоционально-двигательное поведение и точную координацию движений при помощи батареи «развитийных» тестов [19, 20]. Для оценки физического развития мышат ежедневно взвешивали, а с P10 отслеживали их прозревание [7].

Способность поддерживать позу изучали при помощи тестов «переворачивание на плоскости», «избегание наклонной плоскости» и «избегание обрыва». Рефлекс переворачивания на плоскости оценивали в период с P6 по P10 – мышонка клали на спину и отмечали время, за которое он перевернется на лапы [19]. Максимальное время наблюдения составляло 30 с.

Тест «избегания обрыва» проводили с P7 по P10 [20]. Мышь располагали на краю коробки с гладкой поверхностью таким образом, чтобы пальцы передних лап и голова свисали над её краем и в течение 30 с фиксировали латентное время поворота или отползания от края коробки и число животных, выполнивших задачу.

Врожденная постуральная реакция грызунов на поворот на 180° из положения «головой вниз» в положение «головой вверх» на наклонной плоскости появляется у здоровых мышат уже на второй неделе жизни и считается тестом золотого стандарта для оценки рефлекторного развития, моторики, вестибулярного лабиринта и целостности мозжечка [21]. Тест «отрицательный геотаксис» проводили с P7 по P12 [19]. Мышь помещали на наклонную под 45° сетку длиной 30 см, головой по направлению со склона, и в течение 30 с фиксировали время поворота животного в направлении вверх по склону.

Тест «переворот в воздухе», отражающий степень созревания подкорковых структур, проводили с P10 по P14 [22]. Мышь удерживали за голову и таз, головой вверх, на расстоянии 30 см над мягкой поверхностью, после чего отпускали. Попытка считалась успешной, если мышь приземлялась на все четыре лапы. Фиксировали количество успешных попыток и число мышат, успешно выполнивших 3 попытки.

Тест «горизонтальная веревочка» проводили с P10 по P13 [20]. Мышь подвешивали за передние лапы на горизонтально натянутой веревочке диаметром 1 мм, расположенной на расстоянии 30 см над мягкой поверхностью, и в течение 30 с фиксировали время удержания на ней.

Тест «вздрагивание на хлопок» проводили с P10 по P14 [20]. На расстоянии 15 см от мыши осуществляли одиночный хлопок в ладоши и фиксировали наличие или отсутствие вздрагивания. Ушной рефлекс тестировали с P10 по P14 [20] проводя по внутренней по-

верхности уха нитью и фиксируя ответную реакции – одергивание уха.

Тест «предпочтение материнского запаха» позволяет оценить способность мышат распознавать запах гнезда, который является для них социально-значимым фактором. Тестирование проводили на P14 [21]. Мышат помещали в тестовую клетку Т/ЗС, одна треть которой была заполнена на глубину 3 см опилками из «домашней» клетки, центральная – чистыми опилками, а другая – опилками из «чужой» клетки. Каждой мышке предъявляли три 1-минутных посадки с интервалом 10 с. При каждой посадке мышат помещали в центральную часть клетки с чистыми опилками, причем при первой посадке их помещали головой к боковой стенке клетки, при второй – головой к опилкам с запахом гнезда и при третьей – головой по направлению к опилкам из «чужой» клетки. Фиксировали продолжительность нахождения мышат в секциях клетки во время каждой попытки.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica V. 10.0.». Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена. Так как в экспериментальных группах либо отсутствовало нормальное распределение, либо межгрупповое равенство дисперсий не соблюдалось, дальнейшую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики Манна-Уитни. Для определения статистической значимости различий повторных измерений в группе использовали парный критерий Вилкоксона. Для обработки данных, выраженных в %, использовали точный критерий Фишера. Результаты в таблицах представлены как среднее \pm ошибка среднего (Mean \pm SEM), или в виде данных, выраженных в %. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Масса тела самцов и самок мышат контрольной группы на P6 и P7 превышала соответствующие показатели групп животных, пренатально получавших ВПК (табл. 1). При изучении прироста массы тела с P7 по

P14 относительно P6 (фоновый показатель) как у самцов, так и у самок мышат группы «ВПК» отмечалось ее увеличение в сравнении с показателями контрольной группы. Афобазол нормализовал прирост массы тела у мышат с фетальным вальпроат-синдромом (ФВС), что выразилось как в значимом снижении скорости набора массы в сравнении с группой «ВПК», так и в отсутствии различий по данному показателю относительно контроля (рис. 1).

Влияние афобазола на прирост массы тела у мышат VALB/c с ФВС (Mean \pm SEM).

Анализ сроков созревания у самцов мышат группы «ВПК» на P13 и P14 выявил их отставание по сравнению с показателями контрольной группы, что выразилось в уменьшении на 23,7% ($p = 0,09$) и 13,5% ($p < 0,05$) числа открытых глаз, а также в незначимом снижении на 30,0% и 26,7% числа животных, открывших оба глаза, соответственно (табл. 2). Афобазол не предотвратил задержку открывания глаз у самцов мышат с ФВС.

ВПК, введенный пренатально, не влиял на сроки созревания у самок мышат. Отмечалось лишь незначимое снижение на 24,7 и 21,7% числа самок мышат с полностью открытыми глазами на P13 в группах «ВПК» и «ВПК+Афобазол», соответственно, по сравнению с контрольной группой самок (табл. 2).

Таким образом, ВПК, введенная пренатально в дозе 400 мг/кг, отрицательно влияла на физическое развитие мышат линии VALB/c, что согласуется с литературными данными [20;23].

В тесте «переворачивания на поверхности» самцы мышат, получавшие ВПК, на P6 статистически значительно дольше выполняли переворот со спины с упором на все четыре конечности по сравнению с контрольными мышатами (9,64 \pm 2,55 или 10,79 \pm 2,61 vs 6,58 \pm 0,67 в контроле), однако в последующие дни отличий по данному параметру не наблюдали (данные не представлены). У самок с ФВС отличий относительно контрольной группы не зарегистрировано (данные не представлены).

В тесте «избегание обрыва» поведение мышат VALB/c контрольных и опытных групп, как самцов, так и самок, оказалось схожим (данные не представлены).

Таблица 1

Масса тела мышат VALB/c с ФВС на P6 - P7 (Mean \pm SEM)

Самцы	P6	P7	Самки	P6	P7
Контроль, n=12	3,9 \pm 0,1*	4,5 \pm 0,2*	Контроль, n=15	4,1 \pm 0,2#	4,6 \pm 0,3*
ВПК, n=15	3,5 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1	ВПК, VPA, n=24	3,6 \pm 0,1	4,1 \pm 0,1
ВПК+Афобазол, n=14	3,4 \pm 0,1	4,0 \pm 0,2	ВПК+Афобазол, n=20	3,5 \pm 0,2	4,1 \pm 0,2

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «ВПК», # – $p < 0,09$ по сравнению с группой «ВПК».

В тесте «отрицательный геотаксис» статистически значимые различия у самцов группы «ВПК» по сравнению с контрольной группой по времени поворота тела на наклонной плоскости головой в направлении подъема наблюдались только на P12 (табл. 3). Афобазол, в эти же сроки, увеличил в 1,9 раза ($p < 0,05$) скорость выполнения рефлекса у самцов с ФВС относительно самцов группы «ВПК» (табл. 3)

У самок мышей с ФВС значимых различий во времени, необходимом для принятия правильного положения тела в тесте «отрицательный геотаксис», относительно контрольной группы не обнаружено. При этом, на фоне введения афобазола самкам мышей с ФВС, от-

мечалась тенденция к превышению скорости поворота тела на P7 и P12 в 1,3 и 1,4 раз, соответственно, относительно группы «ВПК» (табл. 3). Межполовые различия в данном тесте наблюдались только на P12 в группах «ВПК+Афобазол», где самцы в 1,5 раза быстрее, чем самки, справлялись с задачей теста (табл. 3).

В тесте «переворачивание в воздухе» у самцов мышей группы «ВПК» значимое ухудшение координации движений по сравнению с контрольной группой отмечалось на P14, что выразилось в уменьшении на 27,0% ($p < 0,05$) числа животных в группе, успешно выполнивших все 3 попытки (табл. 4). Показатели самцов мышей с ФВС, получавших Афобазол, в тесте «пере-

Таблица 2

Влияние афобазола на скорость прозревания у мышей BALB/c с ФВС (Mean±SEM)

Группы, число мышей	Число открытых глаз, ед.		Число мышей с 2 открытыми глазами, %	
	P13	P14	P13	P14
Самцы				
Контроль, n=12	1,7±0,2	2,0±0,0	83,3	100,0
ВПК, n=15	1,3±0,2	1,7±0,1*	53,3	73,3
ВПК+Афобазол, n=12	0,8±0,3*	1,7±0,2	25,0#	75,0
Самки				
Контроль, n=15	1,5±0,2	1,8±0,1	66,7	86,7
ВПК, n=24	1,0±0,2	1,8±0,1	42,0	88,0
ВПК+Афобазол, n=20	1,2±0,2	2,0±0,1	45,0	95,0

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Контроль», # – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Контроль».

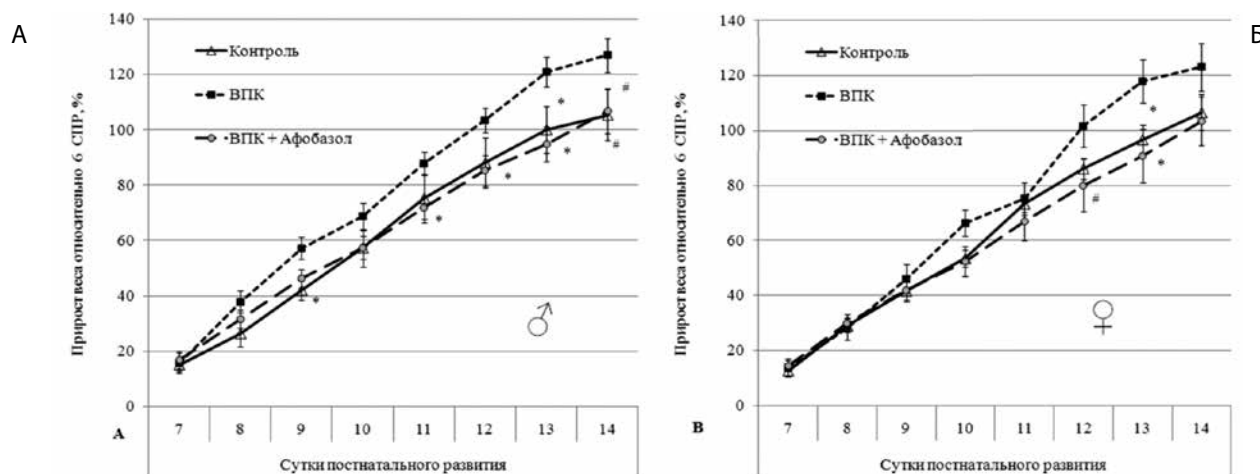


Рис. 1. А – самцы, В – самки; * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «ВПК», # – $p < 0,09$ по сравнению с группой «ВПК». СПР – сутки постнатального развития.

ворачивание в воздухе» во все дни тестирования не отличались от контрольных значений (табл. 4).

У самок мышей с ФВС в тесте «переворачивание в воздухе» наблюдалось замедление формирования рефлекса, что выразилось на P13 – P14 в значимом снижении на 38,0 и 32,0%, соответственно, числа животных в группе успешно выполнивших все 3 попытки. При этом самки мышей с ФВС, получавшие афобазол, справлялись с задачей теста значительно лучше во все дни наблюдений, что выразилось в значимом увеличении на 46,0, 37,0 и 31,0% числа мышей, успешно выполнивших перевороты в воздухе, на P12 – P14, соответственно, по сравнению с группой «ВПК» (табл. 4).

Анализ числа животных, успешно выполнивших все 3 попытки в тесте «переворачивание в воздухе», выявил позитивный эффект афобазола, в большей степени для самок с ФВС, что может свидетельствовать о

протективном действии препарата на процессы развития нервной системы.

В тесте «горизонтальная веревочка» у самцов и самок мышей BALB/c, пренатально получавших ВПК, выраженной динамики в увеличении длительности удержания на веревочке передними конечностями не наблюдалось, в отличие от мышей контрольных групп, что выразилось в значимом уменьшении в 1,6 раза времени удержания на веревочке на P10 (табл. 4). Афобазол не улучшил показатели мышей с ФВС в данном тесте.

Анализ результатов теста «вздрагивание на хлопок» у самцов мышей группы «ВПК» свидетельствует о задержке развития, что демонстрирует отсутствие ответной реакции на внезапный раздражитель у всех животных на P11 и в ее значимом снижении на P12, относительно значений контрольной группы (табл. 5). Самки мышей с ФВС на P11 вели себя аналогично самцам с

Таблица 3

Влияние афобазола на поведение мышей BALB/c с ФВС в тесте «отрицательный геотаксис» (Mean±SEM)

Группы, число мышей	Скорость поворота тела на наклонной плоскости, с					
	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Самцы						
Контроль, n=12	17,1±2,4	16,3±2,1	13,9±2,1	12,0±1,7	10,3±1,5	6,5±0,9*
ВПК, n=12	21,9±1,8	20,8±2,3	16,5±2,4	13,0±1,7	9,3±1,1	10,3±1,5
ВПК+Афобазол, n=14	20,3±2,9	19,0±2,6	13,1±2,5	11,7±2,8	8,9±1,6	5,3±1,0*
Самки						
Контроль, n=12	17,4±2,3	16,8±2,8	14,0±2,2	12,6±1,6	8,7±0,9	8,0±1,1
ВПК, n=24	21,5±1,8	17,7±1,7	16,6±1,9	12,2±1,4	12,2±1,5	11,3±1,6
ВПК+Афобазол, n=20	16,9±1,9#	14,7±2,0	14,5±1,4	10,8±1,5	10,6±1,1	8,1±0,8#^

Примечание. * – p < 0,05 по сравнению с группой «ВПК»; # – p < 0,09 по сравнению с группой «ВПК», ^ – p < 0,05 по сравнению с самцами группы «ВПК».

Таблица 4

Влияние афобазола на поведение мышей BALB/c с ФВС в тестах «переворачивание в воздухе» и «горизонтальная веревочка» (Mean±SEM)

Группы, число мышей	Число мышей, успешно выполнивших 3 попытки, %					Продолжительность удержания на веревочке, с
	P10	P11	P12	P13	P14	
Самцы						
Контроль, n=12	0	0	45	73	91	20,8±3,1
ВПК, n=15	0	20	36	60	64*	12,9±1,5*
ВПК+Афобазол, n=14	0	33	40	67	83	12,8±2,3*
Самки						
Контроль, n=15	7	14	29	71	86	18,3±2,6
ВПК, n=24	0	13	21	33*	54*	12,5±1,3*
ВПК+Афобазол, n=20	20	30	67#	70#	85#	12,7±2,1

Примечание. * – p < 0,05 по сравнению с группой «Контроль», # – p < 0,05 по сравнению с группой «ВПК».

ФВС, однако введение афобазола предотвращало снижение скорости формирования рефлекса (табл. 5).

Подобное изменение процессов развития нервной системы наблюдалось и при оценке формирования ушного рефлекса на фоне пренатального введения ВПК самцам и самкам мышей линии BALB/c, что выразилось в значимом снижении числа ответных реакций животных на раздражитель в сравнении с показателями контрольных групп (табл. 5). Афобазол облегчал формирование рефлекса, как у самцов, так и у самок мышей с ФВС. Число реакций на стимул у самцов группы «ВПК+Афобазол» было значимо больше на P10 – P12, а у самок с ФВС, получавших афобазол – на P10 в сравнении с показателем соответствующей группы «ВПК» (табл. 5).

Дефицит социального взаимодействия является одним из основных симптомов РАС, а наиболее распространенным тестом для его изучения в эксперименте является поведение в трех-камерной установке с предъявлением разных по социальной значимости объектов [23]. Поскольку данный тест применим для более взрослых животных, для определения ранних поведенческих нарушений при социальном распознавании мы использовали его модифицированную версию – тест «предпочтение материнского запаха».

Как следует из полученных результатов, самцы мышей контрольной группы при первоначальной посадке в опытную клетку пребывали примерно равное время в каждой из зон («домашней», «нейтральной» и «чужой»), тогда как мыши с ФВС больше времени проводили в зоне с опилками из домашней клетки ($p < 0,05$). При посадке мышей головой в направлении зоны с «домашним» запахом животные всех групп демонстрировали предпочтение этой части клетки. Однако, при помещении мышей головой в направлении зоны с запахом «чужой» клет-

ки, отмечалось отсутствие предпочтения определенного запаха у животных контрольной группы и группы с ФВС, в то время как под действием афобазола, самцы мышей с ФВС превалирующую часть времени проводили в зоне с опилками из домашней клетки ($p < 0,05$) (табл. 6).

Самки мышей контрольной группы, также как самки группы «ВПК» при первом помещении в опытную клетку вдоль зоны с нейтральными опилками вели себя аналогично самцам, не отдавая предпочтения какой-либо из них. Тогда как самки мышей с ФВС, получавшие афобазол, предпочитали зону с «домашним» запахом (табл. 6). При втором помещении мышей всех групп в экспериментальную клетку головой в направлении зоны с «домашним» запахом мыши всех групп преимущественно выбирали её. Наиболее интересным является анализ третьего размещения животных в клетке с разными по социальной значимости зонами, когда мыши контрольной группы, также как и мыши группы «ВПК + Афобазол», соответственно, в 2,0 ($p < 0,05$) и 3,0 раз ($p < 0,05$) больше времени проводили в зоне с опилками из «домашней» клетки (табл. 6).

Результаты проведенного исследования продемонстрировали наличие у мышей с ФВС, вызванным пренатальным введением ВПК в дозе 400 мг/кг, задержки развития и социального распознавания в гнездовом периоде с P6 по P14, проявляющейся в более позднем открывании глаз, замедлении развития ответных реакций на сенсорные стимулы, увеличении времени переворота на поверхности и ухудшение моторики и координации движений в тестах «отрицательный геотаксис» и «переворот в воздухе», и отсутствии предпочтения материнского запаха. Недавние исследования предполагают, что сниженный при рождении вес может быть фактором риска РАС [8]. В наших опытах мыши с ФВС значимо отставали по массе тела на P6 –

Таблица 5

Влияние афобазола на скорость формирования рефлексов у мышей BALB/c с ФВС (Mean±SEM)

Группы, число мышей	Вздрагивание на хлопок, балл			Реакция на прикосновение к уху, балл		
	P11	P12	P13	P10	P11	P12
Самцы						
Контроль, n=12	0,2±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1	0,6±0,2	0,75±0,13	0,9±0,1
ВПК, n=15	0,0±0,0	0,5±0,1*	0,8±0,1	0,0±0,0*	0,27±0,12*	0,7±0,1
ВПК+Афобазол, n=14	0,0±0,0	0,6±0,2	0,9±0,1	0,5±0,2#	0,67±0,14#	1,0±0,0#
Самки						
Контроль, n=15	0,2±0,1	0,6±0,1	0,9±0,1	0,3±0,1	0,5±0,1	0,9±0,1
ВПК, n=24	0,0±0,0*	0,5±0,1	0,8±0,1	0,1±0,1*	0,4±0,1	0,8±0,1
ВПК+Афобазол, n=20	0,2±0,1	0,5±0,1	0,9±0,1	0,5±0,1#	0,6±0,1	0,9±0,1

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Контроль»; # – $p < 0,05$ по сравнению с группой «ВПК».

P7 в сравнении с контрольными животными. Однако, в дальнейшем, прирост веса у получивших ВПК мышей превышал показатели контрольных групп, чего не наблюдалось на фоне введения афобазола. Можно отметить, что дети с PAC и деструктивным поведением подвержены повышенному риску ожирения [24].

Мышата групп, пренатально получавших ВПК, а затем с P7 по P14 – афобазол, проводили больше времени в зоне с опилками, взятыми из домашней клетки, в то время как у мышей групп «ВПК», отличий во времени, проведенном в разных по социальной значимости зонах (с чистыми опилками, опилками из домашней или чужой клетки), не было. Эти данные свидетельствуют о том, что у мышей линии BALB/c с ФВС нарушается способность различать социальные и не-социальные, а также знакомые и чужие запахи, что воспроизводит характерную для PAC дисфункцию социального взаимодействия и распознавания [8]. Полученные результаты указывают на способность афобазола ослаблять повреждающее воздействие и даже нормализовать обонятельную функцию. Следует отметить, что гломерулы в обонятельных луковицах мышей развиваются от E13 до E16 [25], т.е. в период введения нами токсической дозы ВПК.

Поведение самцов мышей BALB/c в тесте предпочтения материнского запаха возможно связано со специфичным для линии аутизм-релевантным фенотипом с нарушениями в обонятельной сфере, особенно проявляющимися при предъявлении социальных запахов [26]. Известно, что обонятельная функция у грызунов обеспечивается основной обонятельной системой и

вспомогательной, специализированной для внутривидовой связи. Показано что типичные гломерулы линий мышей BALB/c и CD-1 отличаются по своей внутригломерулярной связности и морфометрии [27], чем можно объяснить различное поведение мышей в ответ на запахи. Половой диморфизм в обонятельной функции был обнаружен в добавочной обонятельной системе, которая в основном связана с информацией о феромонах и репродуктивным поведением [28]. Согласно полученным результатам самки мышей линии BALB/c обладают лучшими обонятельными способностями, связанными с осуществлением видовых коммуникаций, что косвенно подтверждается большим числом нетипичных гломерул у самок [28], и позволяет предполагать половой диморфизм по данному признаку.

Выявленные в нашем исследовании позитивные эффекты афобазола – соединения, обладающего свойствами агониста сигма1-рецепторов, лиганда МТ1- и МТ3-рецепторов, а также регуляторного участка MAO-A [29-31], не противоречат представлениям о стимуляции препаратом шаперонной функции сигма1-рецепторов [32], что вероятно обеспечивает влияние на моноаминергические и глутаматергические системы мозга, на пластические и трофические процессы в ЦНС, изменения которых характерны при PAC [33].

Заключение

Таким образом, в результате проведенных экспериментов по изучению влияния афобазола на показатели развития нервной системы в периоде раннего постнатального развития мышей линии BALB/c на модели

Таблица 6

Влияние афобазола на поведение мышей BALB/c с ФВС в тесте «предпочтение материнского запаха» (Mean±SEM)

Группы, число мышей	Длительность нахождения в зоне клетки								
	Посадка в экспериментальную клетку, ориентация мыши.								
	головой к боковой стене			головой к «домашним» опилкам			головой к «чужим» опилкам		
Самцы	Д	Н	Ч	Д	Н	Ч	Д	Н	Ч
Контроль, n=11	16,0±6,9#	20,2±6,1	23,8±7,6	33,4±8,1	20,1±6,5	6,6±4,5^	17,2±7,0	22,5±6,3	20,4±7,5
ВПК, n=12	32,8±6,0	11,3±1,3	14,7±6,3^	46,5±4,1	9,1±1,9	3,3±2,6^	24,9±6,9	10,3±1,3	23,6±6,6
ВПК+Афобазол, n=14	36,2±5,3	22,4±4,9	1,8±1,5#^	49,2±2,2	10,8±2,2	0,0±0,0^	39,2±4,9^	16,8±4,3	4,1±2,4*^
Самки	Д	Н	Ч	Д	Н	Ч	Д	Н	Ч
Контроль, n=12	24,0±6,3	16,4±2,7	19,5±6,3	41,6±3,4	10,2±1,2	8,2±3,3^	31,9±6,0*	12,3±1,6*	15,9±5,6^
ВПК, n=24	17,3±5,0	19,5±3,6	23,2±5,0	35,8±4,9	17,9±3,5	6,2±2,6^	13,1±3,8	31,0±4,4	15,9±4,6
ВПК+Афобазол, n=20	32,4±4,3*	26,4±4,2	1,3±1,3*^	44,0±3,9	12,7±2,9	3,4±2,4^	31,7±4,7*	18,1±3,4*	10,3±3,9^

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «ВПК»; # – $p < 0,09$ по сравнению с группой «ВПК»; ^ – $p < 0,05$ по сравнению с отсеком, содержащим опилки из «домашней» клетки (внутригрупповое сравнение); Д – опилки из «домашней» клетки, Н – «нейтральные» (чистые опилки), Ч – опилки из «чужой» клетки.

ФВС установлены корригирующие свойства препарата в отношении нарушений, вызванных пренатальным введением ВПК, что определяет целесообразность дальнейшего изучения афобазола на моделях РАС.

Литература

(п.п. 1-4; 6-13; 19-28 см. References)

5. Паунова С.С., Донин И.М., Бусова Е.С., Семина И.В., Лифшиц М.И., Попов В.Е. и др. Вальпроат-синдром у новорожденного. *Педиатрия*. 2016; 95(1): 140-2.
14. Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б. Особенности поведенческого фенотипа мышей линии BALB/C. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2020; 106(3): 373–83.
15. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В., Маметова Л.Э. Новый селективный анксиолитик афобазол. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2005; 105(4): 35-40.
16. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Середенин С.Б. Антимутагенные и антитератогенные свойства афобазола. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009. 72(1): 46–51.
17. Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Калинина А.П., Середенин С.Б. Коррекция афобазолом тревоги при моделировании аутизма. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2019; 82(10): 3–7.
18. Капица И.Г., Калинина А.П., Алымов А.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б. Афобазол ослабляет когнитивную ригидность в экспериментальной модели расстройств аутистического спектра. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019; 168(8): 191–4.
29. Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009; 72(1): 3-11.
30. Середенин С.Б., Воронин М.В., Абрамова Е.В. Сигма-1 рецепторы – новая мишень фармакологической регуляции. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2017; 80(9): 9-19.
31. Абрамова Е.В., Воронин М.В., Середенин С.Б. Взаимодействие афобазола с Сигма-1 рецепторами головного мозга мышей. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015; 49(1): 9-11.
6. Kataoka S., Takuma K., Hara Y., Maeda Y., Ago Y., Matsuda T. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2013; 16(1): 91–103.
7. Rouillet F.I., Wollaston L., Decatanzaro D., Foster J.A. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience*. 2010; 170(2): 514–22.
8. Yang E.-J., Ahn S., Lee K., Mahmood U., Kim H.S. Early behavioral abnormalities and perinatal alterations of PTEN/AKT pathway in valproic acid autism model mice. *PLoS One*. 2016. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153298> (Accessed 08 June 2020)
9. Tartaglione A.M., Schiavi S., Calamandrei G., Trezz V. Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. *Neuropharmacology*. 2019. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0028390818309134?via%3Dihub> (Accessed 08 June 2020)
10. Nicolini C., Fahnstock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental Neurology*. 2018; 299: 217–227.
11. Kazdoba T.M., Leach P.T., Yang M., Silverman J.L., Solomon M., Crawley J.N. Translational Mouse Models of Autism: Advancing Toward Pharmacological Therapeutics. *Curr Top Behav Neurosci*. 2016; 28: 1-52.
12. Brodtkin E.S. BALB/c mice: low sociability and other phenotypes that may be relevant to autism. *Behav. Brain Res*. 2007; 176: 53-65.
13. Moy S.S., Nadler J.J., Young N.B., Perez A., Holloway L.P., Barbaro R.P., et al. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav Brain Res*. 2007; 176(1): 4-20.
14. Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A., Seredenin S.B. Autism-Relevant Behavioral Traits in Inbred Strain of Balb/C Mice. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2020; 106(3): 373–83. (In Russian).
15. Neznamov G.G., Syunyakov S.A., Chumakov D.V., Mаметова L.E. Afobazole – new selective anxiolytic drug. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2005; 105(4): 35-40. (In Russian)
16. Durnev A.D., Zhanataev A.K., Shreder O.V., Seredenin S.B. Antimutagenic and antiteratogenic properties of afobazole. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009; 72(1): 46–51. (In Russian)
17. Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A., Kalinina A.P., Seredenin S.B. Treatment of Anxiety with Afobazole in Experimental Model of Autism. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2019; 82(10): 3–7. (In Russian)
18. Kapitsa I.G., Kalinina A.P., Alymov A.A., Voronina T.A., Seredenin S.B. Afobazole facilitates cognitive rigidity in BALB/c mice with autism-relevant behavioral phenotype. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. 2019; 168(8): 191–4. (In Russian)
19. Wagner G.C., Reuhl K.R., Cheh M., McRae P., Halladay A.K. A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *Journal of autism and developmental disorders*. 2006; 36(6): 779-93.
20. Hill J.M., Lim M.A., Stone M.M. Developmental Milestones in the Newborn Mouse. In: Gozes I, eds. *Neuropeptide Techniques. Neuromethods №39*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 2008: 131-9.
21. Kane M.J., Angoa-Perez M., Briggs D.I., Sykes C.E., Francescutti D.M., Rosenberger D.R., et al. Mice genetically depleted of brain serotonin display social impairments, communication deficits and repetitive behaviors: possible relevance to autism. *PLoS One*. 2012.

References

1. Zwaigenbaum L., Bryson S., Rogers T., Roberts W., Brian J., Szatmari P. Behavioral manifestations of autism in the first year of life. *International journal of developmental neuroscience*. 2005; 23(2–3): 143–52.
2. Pyhala R, Hovi P, Lahti M, Sammallahti S, Lahti J, Heinonen K et al. Very low birth weight, infant growth, and autism-spectrum traits in adulthood. *Pediatrics*. 2014; 134(6): 1075–83.
3. Chen C., Van Horn J.D. Developmental neurogenetics and multimodal neuroimaging of sex differences in autism. *Brain imaging and behavior*. 2017; 11: 38-61.
4. Rasalam A.D., Hailey H., Williams J.H.G., Moore S.J., Turpenny P.D., Lloyd D.J., et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Developmental medicine and child neurology*. 2005; 47(8): 551-5.
5. Paunova S.S., Donin I.M., Busova E.S., Semina I.V., Lifshits M.I., Popov V.E., et al. Valproate syndrome in a newborn. *Pediatriya*. 2016; 95(1): 140-2. (In Russian)

- Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048975> (Accessed 08 June 2020)
22. Rodríguez-Fanjul J., Fernández-Feijóo C.D., Lopez-Abad M., Ramos M.G.L., Caballé R.B., Alcántara-Horillo S., et al. Neuroprotection With Hypothermia and Allopurinol in an Animal Model of Hypoxic-Ischemic Injury: Is It a Gender Question? *PLoS One*. 2017. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184643> (Accessed 08 June 2020)
 23. Moy S.S., Nadler J.J., Perez A., Barbaro R.P., Johns J.M., Magnuson T.R. et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, brain, and behavior*. 2004; 3(5): 287–302.
 24. Healy S., Aigner C.J., Haeghele J.A. Prevalence of overweight and obesity among US youth with autism spectrum disorder. *Autism*. 2019; 23(4): 1046–50.
 25. Blanchart A., Romaguera M., García-Verdugo J.M., de Carlos J.A., López-Mascaraque L. Synaptogenesis in the mouse olfactory bulb during glomerulus development. *The European journal of neuroscience*. 2008; 27(11): 2838–46.
 26. Burket J.A., Young C.M., Green T.L., Benson A.D., Deutsch S.I. Characterization of gait and olfactory behaviors in the BALB/c mouse model of autism spectrum disorders. *Brain research bulletin*. 2016; 122: 29–34.
 27. Weruaga E., Briñón J.G., Porteros A., Arévalo R., Aijón J., Alonso J.R. A sexually dimorphic group of atypical glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Chemical senses*. 2001; 26(1): 7–15.
 28. Segovia S., Guillamón A. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain research reviews*. 1993; 18(1): 51–74.
 29. Seredenin S.B., Voronin M.V. Neuroreceptor mechanisms involved in the action of afobazole. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009; 72(1): 3–11. (In Russian)
 30. Seredenin S.B., Voronin M.V., Abramova E.V. Sigma-1 receptors: a new pharmacological target. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2017; 80(9): 9–19. (In Russian)
 31. Abramova E.V., Voronin M.V., Seredenin S.B. Interaction of afobazole with Sigma-1 receptors in mice brain. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015; 49(1): 9–11. (In Russian).
 32. Hayashi T. The Sigma-1 receptor in cellular stress signaling. *Frontiers in neuroscience*. 2019. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00733/full> (Accessed 08 June 2020).
 33. Varghese M., Keshav N., Jacot-Descombes S., Warda T., Wicinski B., Dickstein D. L., et al. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol*. 2017; 134(4): 537–66.

Сведения об авторах:

Середин Сергей Борисович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, науч. руководитель ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Воронина Татьяна Александровна, доктор мед. наук, зав. лаб. психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Капица Инга Геннадиевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», e-mail: ingakar73@mail.ru;

Альмов Александр Александрович, аспирант, мл. науч. сотр. лаб. психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова».

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.18-005.4-001

Степанов С.С., Кошман И.П., Шоронова А.Ю., Калиничев А.Г., Акулинин В.А., Степанов А.С., Авдеев Д.Б., Маркелова М.В.

Структурные основы изменения межнейронной коммуникации нейронов поля CA₃ гиппокампа белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы

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

Цель – изучение пирамидных нейронов поля CA₃ гиппокампа белых крыс в динамике после тяжелой черепно-мозговой травмы (ТЧМТ).

Методы. ТЧМТ моделировали под наркозом с помощью свободно падающего груза массой 200–250 г с высоты 50 см на теменно-затылочную область. Гиппокамп изучали в контроле ($n=5$), через 1, 3, 5, 7 и 14 сут после ТЧМТ ($n=25$). Общую оценку состояния нейронов поля CA₃ проводили на препаратах окрашенных гематоксилином-эозином, численную плотность нейронов – при окраске по Нисслю, цитоскелет нейронов изучали с помощью реакции иммунотипирования *нейрон-специфического структурного белка (MAP-2)*, синаптические терминалы – иммунотипирования синаптофизина (*p38*). Для визуализации MAP-2 нейронов и p38 синаптических терминалов использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Морфометрический анализ проводили на цветных растровых и бинарных изображениях с использованием плагинов программы ImageJ 1.52s. Определяли относительную площадь зон отека-набухания, численную плотность пирамидных нейронов, количество дистрофически и некробиотически измененных нейронов, общую и относительную площадь синаптических терминалов.

Результаты. Через 1 сут после ТЧМТ нарастали явления отека-набухания, увеличивалось количество дистрофически и некробиотически измененных нейронов, уменьшалась общая и относительная площадь терминалов. В течение 14 сут общая плотность нейронов уменьшилась на 31%. Параллельно активировались механизмы нейро- и синаптической пластичности, в результате чего восстанавливался цитоскелет поврежденных нейронов и увеличивалось количество межнейронных синапсов (в 1,32 раза выше контроля).

Заключение. Восстановление структур межнейронной коммуникации происходило на фоне уменьшения общей численной плотности пирамидных нейронов. Выявленные изменения рассматриваются как основа перманентной компенсаторно-восстановительной реорганизации межнейронных отношений гиппокампа на фоне вторичной ишемии головного мозга.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма; CA₃ гиппокампа; нейроны, синапсы, цитоскелет; иммуногистохимия; морфометрия; крысы Wistar

Для цитирования: Степанов С.С., Кошман И.П., Шоронова А.Ю., Калиничев А.Г., Акулинин В.А., Степанов А.С., Авдеев Д.Б., Маркелова М.В. Структурные основы изменения межнейронной коммуникации нейронов поля CA₃ гиппокампа белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 22-34.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.22-34

Участие авторов: морфометрический и информационно-математический анализ, написание текста, иллюстративный материал, обсуждение результатов исследования – Степанов С.С.; эксперимент, уход за животными, забор материала, приготовление препаратов, обсуждение результатов исследования – Кошман И.П.; эксперимент, уход за животными, забор материала, обсуждение результатов исследования – Шоронова А.Ю.; разработка концепции эксперимента – Калиничев А.Г.; эксперимент, забор материала, написание текста, обсуждение результатов исследования – Акулинин В.А.; эксперимент, забор материала – Степанов А.С.; фотографирование препаратов, создание базы данных – Авдеев Д.Б., Маркелова М.В.

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.06.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Stepanov S.S., Koshman I.P., Shoronova A.Yu., Kalinichev A.G., Akulinin V.A., Stepanov A.S., Avdeev D.B., Markelova M.V.

The structural base for changes in the interneuronal communication of CA3 neurons in the hippocampus of white rats after severe traumatic brain injury

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

Aim. To study changes in hippocampal CA3 pyramidal neurons of white rats after severe traumatic brain injury (STBI).

Methods. STBI was modeled with a free-falling weight (200-250 g) impact. The hippocampus was studied in control rats ($n=5$), 3, 5, 7, and 14 days after STBI ($n=25$). The CA3 field neurons were examined on preparations stained with hematoxylin-eosin and the number of neurons was determined with Nissl staining. The neuronal cytoskeleton was studied by immunotyping of the neuron-specific structural protein MAP-2, and synaptic terminals were studied by immunotyping of synaptophysin ($p38$). Neuronal MAP-2 and $p38$ were visualized with a multimeric Novolink™ (DAB) Polymer Detection Systems kit (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Great Britain). Morphometric analysis was performed on color raster and binary images using ImageJ 1.52s plugins to determine the relative area of edema and swelling zones, number density of pyramidal neurons, content of dystrophic and necrobiotically altered neurons, and total and relative areas of synaptic terminals.

Results. On the next day after STBI, manifestations of edema and swelling and the content of dystrophic and necrobiotically altered neurons were increased whereas the total and relative areas of terminals were decreased. In 14 days, the total density of neurons decreased by 31%, which was in parallel with activation of mechanisms for neuro- and synaptic plasticity. As a result, the cytoskeleton of damaged neurons recovered, and the content of interneuronal synapses increased 1.32 times compared to the control.

Conclusion. The structural recovery of interneuronal communication was associated with a decrease in the total number density of pyramidal neurons. These changes were regarded as a base for permanent compensatory and restorative reorganization of hippocampal interneuronal relations in secondary cerebral ischemia.

Keywords: traumatic brain injury; CA3 hippocampus; neurons, synapses, cytoskeleton; immunohistochemistry; morphometry; Wistar rats

For citation: Stepanov S.S., Koshman I.P., Shoronova A.Yu., Kalinichev A.G., Akulinin V.A., Stepanov A.S., Avdeev D.B., Markelova M.V. The structural base for changes in the interneuronal communication of CA3 neurons in the hippocampus of white rats after severe traumatic brain injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 22-34. (in Russian).
DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.22-34

Contribution of authors: morphometric and information-mathematical analysis, text writing, illustrative material, discussion of research results – Stepanov S.S.; experiment, animal care, material sampling, preparation of preparations, discussion of research results – Koshman I.P.; experiment, caring for animals, sampling of material, discussion of research results – Shoronova A.Yu.; development of the concept of the experiment – Kalinichev A.G.; experiment, material sampling, text writing, discussion of research results – Akulinin V.A.; experiment, material sampling – Stepanov A.S.; photographing preparations, creating a database – Avdeev D.B., Markelova M.V.

For correspondence: **Dmitry B. Avdeev**, candidate of veterinary science, senior lecturer of the department of histology, cytology and embryology, 12 Lenin str., Omsk, 644099, Russian Federation, E-mail: avdeev86@inbox.ru

Acknowledgment. This study was supported by the UMNIC Program of the Foundation for Assistance to Innovations grant #14 of 15.12.2017 and the Omsk State Medical University in-house grant # 574 of 24.11.2017.

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

Information about the authors:

Stepanov S.S., <https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>

Koshman I.P., <https://orcid.org/0000-0002-9763-2981>

Akulinin V.A., <https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

Stepanov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-8392-9514>

Avdeev D.B., <https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>

Markelova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-5356-9669>

Received 29.06.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Гиппокамп является частью лимбической системы, играющей важную роль в обучении и хранении памяти, регуляции эмоций, сна, бодрствования, пространственной ориентации и фильтрации важной информации [1-3]. В связи с этим она привлекает

внимание исследователей, изучающих механизмы развития когнитивного дефицита при различных патологических состояниях, включая дегенеративные заболевания, ишемию и травму головного мозга [4-7].

Цито-, дендро- и синаптоархитектоника поля CA₃ гиппокампа хорошо изучены. Пирамидные нейроны

этого поля имеют мощные короткие апикальные дендриты, которые разделяются недалеко от перикариона, покрыты гигантскими шипиковыми выростами и образуют синаптические контакты с гигантскими терминалями аксонов гранулярных нейронов зубчатой фасции (мшистыми волокнами). Гигантские синапсы локализируются в *stratum lucidum* и на some пирамидных нейронов. От слоя пирамидных нейронов CA₃ отходят так называемые коллатерали Шаффера, которые образуют синапсы с апикальными дендритами пирамидных нейронов CA₁. Упомянутые связи являются основными ассоциативными путями гиппокампа (трисинаптический путь), которые соединяют воедино его основные элементы. Установлено, что именно поле CA₃ гиппокампа является точкой конвергенции потоков информации от ассоциативной коры и ствола мозга [8-10]. Нейроны гиппокампа отличаются не только структурным, но и генетическим полиморфизмом, что определяет особенности их ответной реакции на патологические воздействия [4]. Для нейронов гиппокампа характерна высокая синаптическая пластичность, которая обеспечивает адаптивную, компенсаторную и репаративную реорганизацию межнейронных отношений, подстраивая пространственную сетевую коммуникацию пирамидных нейронов гиппокампа к конкретным условиям [11].

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) занимает 3-е место среди причин смерти в РФ, является ведущей причиной смерти и инвалидности у лиц до 40-45 лет. Острые и хронические последствия ЧМТ разной этиологии хорошо изучены [12]. ЧМТ оказывает влияние на все отделы и структуры головного мозга в результате первичного травматического и вторичного ишемического воздействия [13-18].

Даже незначительные повреждения гиппокампа при легкой ЧМТ неизбежно приводят к когнитивной дисфункции и нарушениям пространственной ориентации [4]. Это связано с тем, что в ответ на травму и вторичные нарушения микроциркуляции, энергетического, водного и ионного обмена происходит ряд последовательных конформационных изменений (гидратации белков) цитоскелета нейронов (перикариона, дендритов, аксонов) и синапсов (пресинаптическая решетка, постсинаптическое уплотнение), которые блокируют физико-химические основы образования и движения нервного импульса, а также механизмы пульсации нейронов и перманентной физиологической пространственной реорганизации межнейронных отношений [17, 19, 20].

В этой связи важным является изучение последствий закрытой ТЧМТ в гиппокампе, который не име-

ет непосредственного контакта с травмирующим агентом, но, по данным литературы, оказывается вовлеченным в патологический процесс формирования посттравматической энцефалопатии. Особое значение в анализе изменений межнейронной коммуникации нейронов имеют данные о состоянии структур, участвующих в формировании синаптических связей — аксональных терминалях (селективное выявление с помощью типирования на синаптофизин и дендритах (селективное выявление с помощью реакции на белок, ассоциированный с микротрубочками). Первые являются пре-, вторые — постсинаптической частью синапсов [5, 6, 18].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных морфологии гиппокампа головного мозга белых крыс в норме и при различных патологических состояниях, особенности структур коммуникации пирамидных нейронов поля CA₃ после тяжелой черепно-мозговой травмы изучены недостаточно.

Цель исследования — изучение в динамике после ТЧМТ изменений пирамидных нейронов поля CA₃ гиппокампа и систем их межнейронной коммуникации (отростки нейронов, терминали синапсов, цитоскелет).

Методика

Исследование выполнено в ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрено этическим комитетом университета (протокол №107 от 2 октября 2018 года). В качестве экспериментальных животных использовали 30 половозрелых крыс Wistar (самцы масса 270–350 г. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях, эксперимент проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77 №755) и с рекомендациями Международного комитета по науке о лабораторных животных, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей».

Для изучения структурно-функционального состояния нейронов и синапсов поля CA₃ гиппокампа головного мозга в посттравматическом периоде моделировали тяжелую черепно-мозговую травму (ТЧМТ, $n=25$). Через 5 мин после введения Zoletil 100 (5–7 единиц) с помощью специальной рельсовой стойки нанесли удар свободно падающим грузом массой 200–250 г с высоты 50 см на теменно-затылочную область. Контролем служили интактные крысы ($n=5$).

Через 1, 3, 5, 7 и 14 сут (по 5 животных на каждый срок) после травмы (под наркозом Zoletil 100) голов-

ной мозг фиксировали перфузией. Последовательно вводили 100–125 мл раствора 0,9% NaCl и Фрагина (5000 ЕД) и 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,2–7,4). Мозг извлекали и хранили в фиксаторе при температуре 3–5 °С. Далее материал заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®) с помощью автомата «СТР 120». Серийные фронтальные срезы (4 мкм) готовили на санном микротоме НМ 450 (Thermo) на уровне (-) 2,40 и (-) 3,36 мм от Vregma [21].

Общую качественную оценку поля CA₃ проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином, численную плотность пирамидных нейронов определяли при окраске по Ниссли (учитывали только нейроны с видимым ядрышком), цитоскелет нейронов изучали с помощью иммунотипирования нейрон-специфического структурного белка, ассоциированного с микротрубочками (MAP-2). Он обратимо связывается с микротрубочками цитоскелета, способствуя их полимеризации, придает им устойчивость против деполимеризующих воздействий, а также вызывает образование пучков. Использовались поликлональные кроличьи антитела (разведение 1:400; ab32454, abcam, США). Синаптические терминалы изучали с помощью иммунотипирования синаптофизина (p38), который связан с синаптическими пузырьками и локализуется исключительно в пресинаптических терминалах. В качестве первичных использовали моноклональные (клон 27G12) мышинные антитела (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Для иммунотипирования срезы размещали на полилизинных стеклах. Для визуализации MAP-2 нейронов и p38 синаптических терминалов использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). После реакции с первичными антителами срезы последовательно инкубировали с вторичными антителами, затем хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол.

Препараты фотографировали (микроскоп Leica DM 1000, объектив ×100, камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1,4×1,4 μm), изображения сохраняли в файлах с расширением tiff (2592×1944 пикселей). Для достижения максимальной контрастности и четкости изображения проводили коррекцию с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость) в Photoshop CC. Дальнейшее морфометрическое исследование осуществляли с использованием программы ImageJ 1.52s. На каждый срок использовали по 50 случайно выбран-

ных полей зрения (область интереса) CA₃ гиппокампа. Цветные изображения (иммунотипирование p38) трансформировали в бинарные, на которых определяли («Analyze Particles») относительную площадь и численную плотность синаптических терминалов (на 1 мм²) в *stratum lucidum* и слое пирамидных нейронов CA₃ (область интереса: 25×25 мкм; объектив: ×100). Для стандартизации измерений численную плотность пирамидных нейронов определяли по наличию ядрышек на срезах перикарионов (окраска по Ниссли; область интереса: 130×70 мкм; объектив ×100).

На цветных изображениях (окраска гематоксилином&эозином) для выявления зон отека-набухания (максимальная яркость пикселей – Maxima) нервной ткани использовали плагин-фильтр «Find Maxima» из программы ImageJ 1.52s (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process.html#find-maxima>). Неравномерность распределения зон максимальной яркости (ЗМЯ) оценивали с помощью алгоритма водораздела “Segmented Particles”, примененного к значениям яркости изображения. На полученных в результате работы этого фильтра масках изображений определяли («Analyze Particles») относительную площадь зон максимальной яркости, которые затем переводили в объем (на 1 мм³).

Для проверки статистических гипотез из полученных массивов графических изображений формировали вариационные ряды: 1) на каждый срок фотографировали около 200 полей зрения гиппокампа (объектив: ×100); 2) с помощью специально написанного макроса в программе ImageJ выделяли на этих фотографиях области интереса: 25×25 мкм и помещали их в стеки; 3) затем осуществляли процедуру рандомизации зон интереса с помощью генератора случайных чисел (Statistica 8.0) и отбирали на каждый срок по 50 изображений. На этих изображениях проводили морфометрический анализ с получением цифрового материала. Таким образом, в итоге каждый вариационный ряд, отражающий один срок по изученным переменным, состоял из 50 измерений. Характер распределения вариационных рядов оценивали с помощью теста Shapiro-Wilk (Statistica 8.0) и квантильных графиков (среда R). Некоторые вариационные ряды не соответствовали условиям применения методов параметрической статистики. Поэтому проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими методами: парное сравнение – критерий Манна-Уитни, множественное сравнение – аналог однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA Краскела-Уоллиса). Количественные данные в работе представлены как медиана (50% квартиль – мера центральной тенденции), 25–75% квартили, диапазоны без выбросов (Max-Min)

и с выбросами — меры разброса изученных величин. Медиана является нечувствительной к распределению и наиболее подходит для анализа данных подобного

типа [22]. В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

В группе контроля на фронтальных срезах гиппокампа, окрашенных гематоксилином&эозином и по Нисслию в CA_3 преобладали типичные нормохромные пирамидные нейроны (до 25 мкм в диаметре) с крупным ядром, содержащим большое ядрышко (2,0–3,5 мкм). Признаков гидропической и белковой дистрофии нейронов выявлено не было. Нейропил молекулярного слоя, периваскулярные и перинейрональные зоны представлены однородным субстратом без структурных проявлений отека-набухания (рис 1, а).

При иммунотипировании на *MAP-2* перикарионы и отростки пирамидных нейронов равномерно заполнены маркером (рис 1, б). Вокруг перикарионов и дендритов пирамидных нейронов располагалось большое количество крупных *p38*-позитивных синаптических терминалей в виде круглых коричневых гранул (частиц) и их конгломератов (рис 1, б). Площадь срезов одной *p38*-позитивной частицы варьировала в пределах 1,5–6,6 мкм². Максимальное скопление этих терминалей в поле CA_3 отмечено в особой зоне (*stratum lucidum*), которая состояла из апикальных участков дендритов пирамидных нейронов и гигантских синапсов, сформированных терминалями аксонов мшистых волокон зубчатой фасции. В *stratum radiatum* и *lacunosum* молекулярного слоя поля CA_3 при иммуногистохимическом исследовании гигантские терминали встречались редко.

После ТЧМТ появлялись типичные структурные признаки гидропической (вакуолизированные нейроны), белковой дистрофии (гиперхромные нейроны, часть из которых с признаками сморщивания), хроматолиза (гипохромные нейроны и клетки-тени), отека-набухания перикарионов, крупных дендритов, нейропиля, отростков астроцитов и олигодендроглиоцитов (перичеселлюлярный и периваскулярный). Количество глиоцитов, по сравнению с контролем, увеличивалось в 2–3 раза (рис 2, а, б, в, г). Топографически изменения носили диффузно-очаговый характер.

Содержание неизмененных нормохромных нейронов в остром посттравматическом периоде уменьшалось до 20–30%. Среди дистрофически измененных нейронов преобладали гиперхромные нейроны без сморщивания и гомогенизации перикариона. В необратимо измененных гиперхромных пикноморфных нейронах отмечалась конденсация и гомогенизация хроматофильного вещества ядра и цитоплазмы,

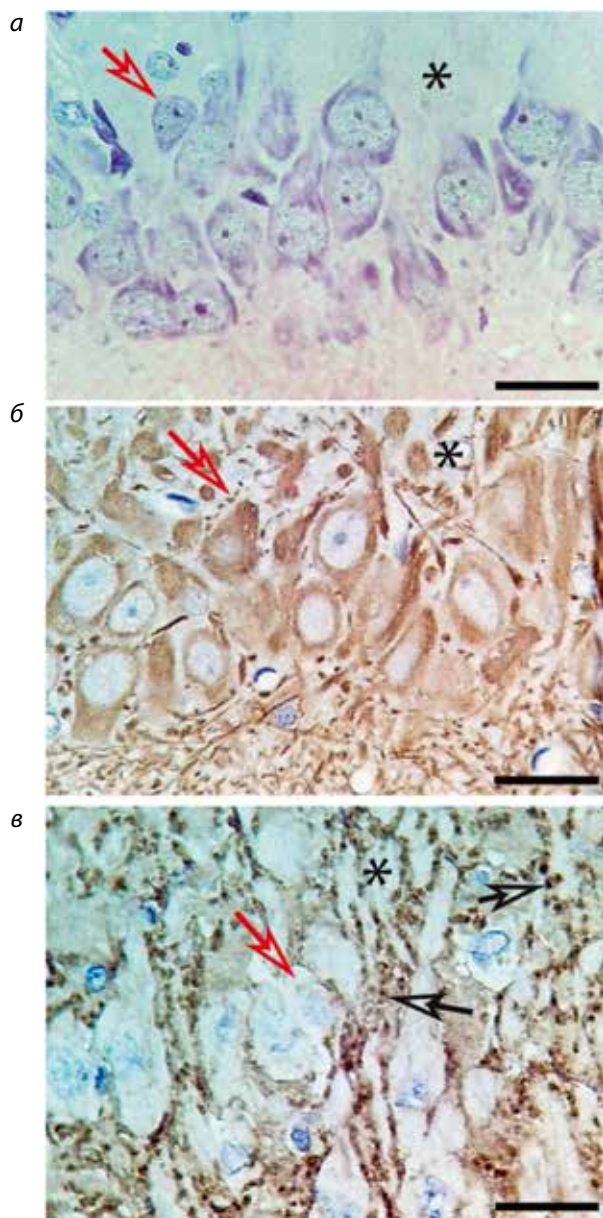


Рис. 1. Фрагменты поля CA_3 гиппокампа головного мозга белых крыс в норме: а – окраска гематоксилином-эозином, б – иммунотипирование *MAP-2*, в – иммунотипирование на *p38* (синаптофизин). Преобладают нормохромные пирамидные нейроны (а), равномерно заполненные *MAP-2*-позитивным материалом (б); вокруг перикарионов и дендритов пирамидных нейронов (в) располагается большое количество крупных *p38*-позитивных синаптических терминалей (черные стрелки). Красные стрелки – слой пирамидных нейронов.

* – *stratum lucidum*. Объектив $\times 100$; шкала – 25 мкм.

«исчезновение» ядрышка. Наибольшее количество таких нейронов выявлено через 3 и 5 сут после травмы (в некоторых очагах до 80% всех клеток) (рис. 2, б, в, г), на фоне максимального для посттравматического периода объема зон отека-набухания (рис 3, а). В этот же период отмечали большое количество (до 40–60%) нормохромных пирамидных нейронов с двумя–тремя ядрышками (рис 2, б), что, вероятно, свидетельствовало о компенсаторной активации ядер неповрежденных нейронов. Мы полагаем, что в активно функционирующих нейронах гиппокампа включались процессы адаптации белоксинтезирующей системы, которые проявлялись гипертрофией и амплификацией ядрышек. По данным литературы, это обеспечивало усиление рибосомного синтеза, регенерацию частично поврежденных и защиту функционирующих клеток. Аналогичные структурные изменения показаны нами после острой ишемии мозга [23].

Через 7 и 14 сут после ТЧМТ содержание в СА₃ нормохромных нейронов значительно увеличивалось, а гиперхромных уменьшалось (рис. 2, д, е). При этом общая численная плотность нейронов, в которых сохранялось и верифицировалось ядрышко, в течение 14 сут наблюдения (начиная с 3-х сут) статистически значимо уменьшалась (рис. 3, б). То есть, не все дистрофически измененные нейроны восстанавливались, часть из них необратимо разрушалась и, вероятно, элиминировались путем фагоцитоза. На рис. 3, б видно, что после ТЧМТ значительно увеличивались меры разброса вариационных рядов (диапазоны без выбросов и с выбросами) переменной «общая численная плотность нейронов». Это свидетельствовало о неоднородности (очагах или локусах) разрушения пирамидных нейронов – явные проявления полиморфизма однопипных по структуре пирамидных нейронов.

По данным иммунотипирования ассоциированного с микротрубочками протеина, после ТЧМТ в СА₃

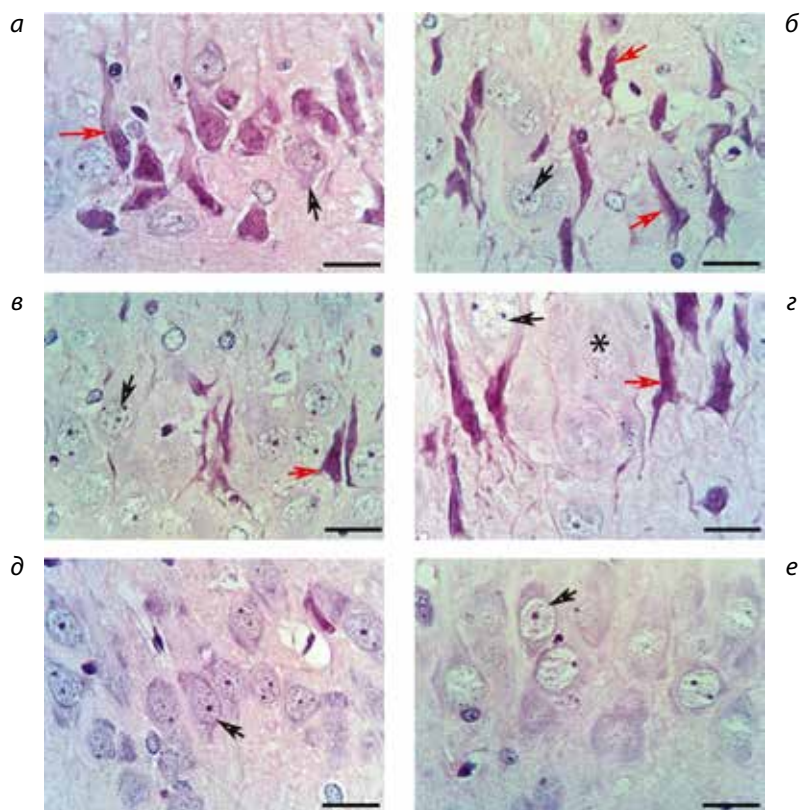


Рис. 2. Фрагменты поля СА₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а) 3 (б, в), 5 (г), 7 (д) и 14 (е) суток после тяжелой черепно-мозговой травмы: в первые 5 сут (а-г) уменьшалась доля нормохромных (черные стрелки) нейронов, появлялось большое количество гиперхромных несморщенных и пикноморфных нейронов (красные стрелки), глиальных клеток (а-в), отмечались гипохромные нейроны (*), проявления гидрической дистрофии (отек-набухание нейротила, астроцитов, перикариона, б и в); через 7 (д) и 14 (е) сут происходило выраженное восстановление содержания нормохромных нейронов. Окраска гематоксилином-эозином; объектив $\times 100$; шкала – 25 мкм.

появлялось большое количество очагов измененных нейронов с выраженной конденсацией микротрубочек цитоскелета по периферии перикариона и в дендритах, а также с разной степенью дегидратации и сморщивания клетки в целом. Это, вероятно, свидетельствовало о конформационных изменениях белков цитоскелета в перикарионе и отростках пирамидных нейронов. Максимальная степень конденсации MAP-2-позитивного материала (плотность хромогена по яркости пикселей) отмечена в сморщенных гиперхромных нейронах через 3, 5 и 7 сут (мода = 62–68, в несморщенных нейронах мода = 90–120). Наиболее часто крупные очаги сморщенных нейронов с высокой плотностью хромогена встречались через 3 сут после травмы (рис. 4, а-в). Значительное восстановление гидратации белков цитоскелета гиперхромных нейронов происходило, вероятно, только через 14 сут после травмы, когда доля клеток с выраженной гиперхромией и конденсацией микротрубочек цитоскелета существенно уменьшалась (рис. 4, е).

Таким образом, после ТЧМТ в поле CA₃ гиппокампа были отмечены очаговые изменения плотности MAP-2-позитивного материала цитоскелета пирамидных нейронов. В сморщенных гиперхромных клетках отмечалась выраженная конденсация цитоскелета, связанная с разрушением и дегидратацией его белков. Это неизбежно приводило к нарушению функций цитоскелета части нейронов и блокировало передачу импульсов по их отросткам. Найденные изменения цитоскелета в той или иной степени сохранялись на про-

тяжении всего изученного постишемического периода, но в большей степени проявлялись через 1, 3 и 5 сут. Именно в это время были выявлены максимальные проявления отека-набухания (рис. 3, а) и большое количество некробиотически измененных нейронов (рис. 2, а-г). Далее (7 и 14 сут) происходило восстановление цитоскелета основной массы несморщенных нейронов, а необратимо измененные сморщенные нейроны, вероятно, удалялись частями посредством фагоцитоза астроцитами и микроглиоцитами.

Деструктивные и репаративные изменения цитоскелета пирамидных нейронов CA₃ гиппокампа после ТЧМТ сопровождались статистически значимыми изменениями численной плотности и относительной площади крупных и гигантских терминалей в *stratum lucidum*. Эти терминали надежно верифицировались с помощью иммунотипирования на синаптофизин (*p38*) синаптических пузырьков, а их большие размеры позволяли точно оценить динамику изменения количества и площади терминалей в посттравматическом периоде (рис. 5, б, 7).

В остром периоде после травмы появлялись очаги с низкой и высокой плотностью частиц *p38*-позитивного материала. Низкая плотность соответствовала зонам CA₃ с высоким содержанием гиперхромных нейронов (рис. 5, а, в), а высокая плотность – зонам с преобладанием нормохромных нейронов (рис. 5, б, г).

Морфометрическая оценка синаптических терминалей проводилась по количеству и площади меток *p38* на бинарных изображениях. Через 1 сут после ТЧМТ про-

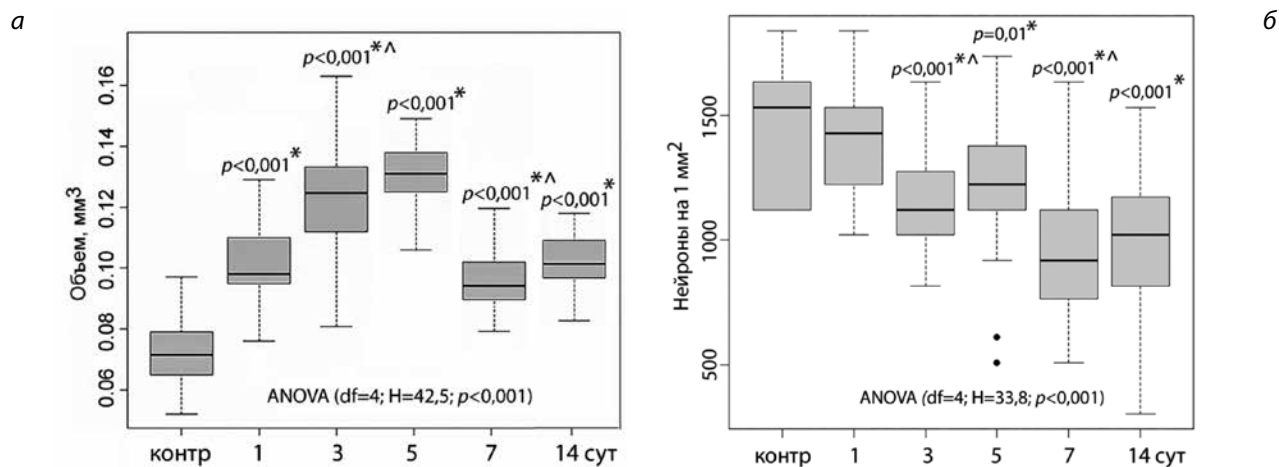


Рис. 3. Объем зон отека-набухания (а) и численная плотность пирамидных нейронов (б) в контроле и в посттравматическом периоде: через 5, 7 и 14 сут происходит статистически значимое уменьшение плотности нейронов. * – различия в сравнении с контролем; ^Λ – с предыдущим сроком статистически значимы (критерий Манна-Уитни). ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса, множественное сравнение переменных по срокам исследования. Материал представлен как медиана (50%), 25–75% квартили (бокс), диапазон без (Max-Min) и с выбросами (·).

исходило смещение в сторону увеличения доли полей зрения с низкой площадью меток (рис. 6). Это свидетельствовало о разрушении части синаптических терминалей (рис. 7, а) и содержащегося в них *p38* (рис. 7, б).

Однако уже через 3 сут после травмы происходило компенсаторное увеличение общей численной

плотности и площади *p38* (рис. 7, а, б). Увеличение численной плотности терминалей было нестабильным: через 5 сут показатель вновь снижался, затем (7 сут) увеличивался, через 14 сут достигал уровня контроля (рис. 7, а). Все это, вероятно, свидетельствовало об активации процесса синаптической пла-

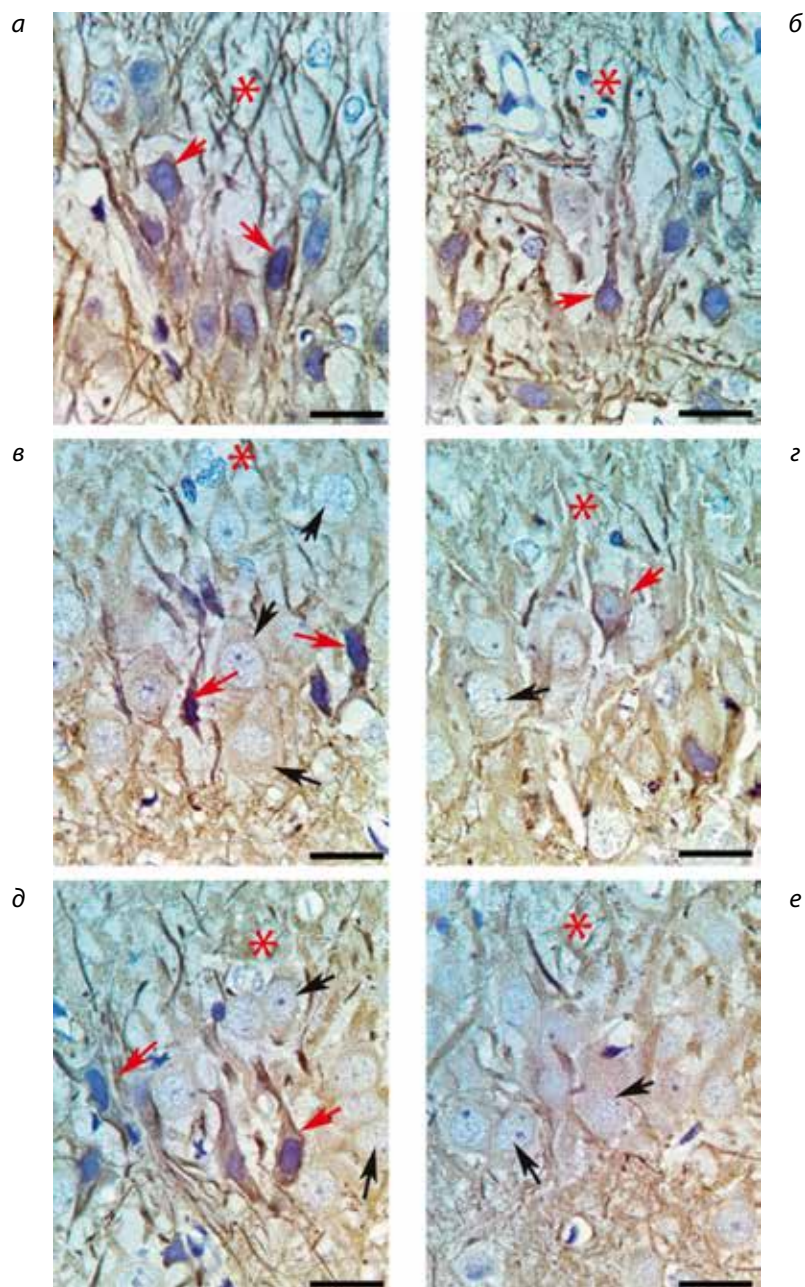


Рис. 4. Фрагменты поля CA₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а) 3 (б, в), 5 (г), 7 (д) и 14 (е) суток после тяжелой черепно-мозговой травмы: увеличивалась доля нейронов (красные стрелки) с выраженной конденсацией микротрубочек цитоскелета по периферии перикариона и дендритах с разной степенью сморщивания клетки; через 14 (е) сут происходило значительное восстановление гидратации цитоскелета. Черные стрелки – нормохромные нейроны, * – *stratum lucidum*. Окраска – реакция на MAP-2; объектив ×100; шкала – 25 мкм.

стичности на фоне вторичной ишемии и деструкции синапсов.

Таким образом, реорганизация межнейронных отношений в CA₃ гиппокампа после ТЧМТ – длительный волнообразный процесс, сочетающий в себе единство восстановления одних и деструкцию других синапсов. Реорганизация синапсов происходила на фоне отека-набухания нервной ткани, тинкториальных изменений нейронов, разрушения и конденсации их цитоскелета в перикарионе и отростках. Вполне вероятно, что гетерохронность и очаговость изменения количества межнейронных синапсов в посттравматическом периоде обусловлена полиморфизмом пирамидных нейронов CA₃ – особенностями их реакции, чувствительности, устойчивости и пластичности.

Обсуждение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что после ТЧМТ в поле CA₃ гиппокампа увеличивалась степень гидратации нервной ткани, изменялись тинкториальные свойства нейронов, разрушались дендриты и синаптические терминали. Изменения были мелкоочаговыми (мозаичными), имели гетерохронный и гетероморфный характер. Вполне вероятно, что выявленный гетероморфный характер изменений нейронов мог быть связан с нейрохимическими различиями морфологически однотипных пирамидных нейронов популяции поля CA₃ гиппокампа. По данным литературы, функциональный и генетический полиморфизм одинаковых нейронов имеет ре-

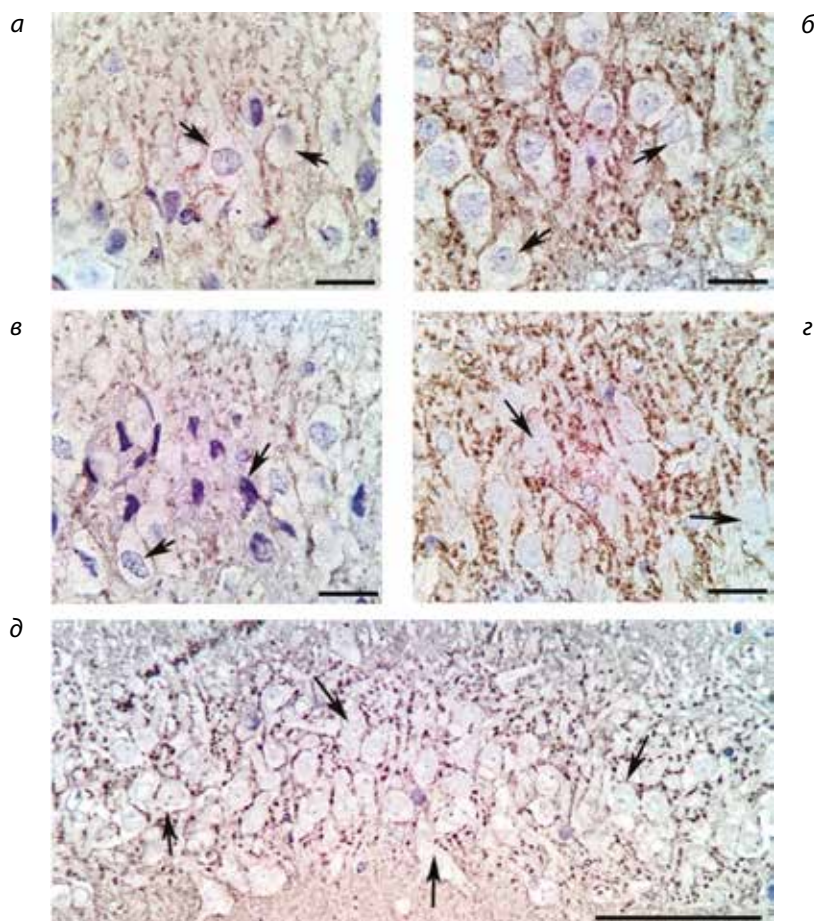


Рис. 5. Фрагменты поля CA₃ гиппокампа головного мозга через 1 (а) 3 (б), 5 (в), 7 (г) и 14 (д) сут после тяжелой черепно-мозговой травмы: через 1 сут (а) отмечалось явное уменьшение плотности и яркости p38-позитивных структур (синаптические терминали), через 3 сут (б) появлялось большое количество крупных интенсивно окрашенных синаптических терминалей вокруг перикарионов и отростков пирамидных нейронов (стрелки), через 5 сут (в) сохранялись очаги низкой плотности терминалей в зонах гиперхромных нейронов (стрелка), через 7 (г) и 14 (д) сут происходило восстановление распределения и интенсивности окраски терминалей в stratum lucidum. Окраска – иммуноцитопирование p38; объективы $\times 100$ (а-г) и $\times 40$ (д); шкала (а-г) – 25 мкм, шкала (д) – 100 мкм.

шающее значение для объяснения феномена селективности их повреждения [4].

По нашим данным, после ТЧМТ на уровне *stratum lucidum* даже при наличии достаточного количества синапсов происходило блокирование передачи импульсов в результате неполного восстановления цитоскелета части пирамидных нейронов, необходимого для проведения импульса и межнейронной коммуникации энторинальной коры, гиппокампа, зубчатой фации. Известно, что главным условием восстановления межнейронных связей является наличие нейромедиаторов в терминалях и восстановление конформационного состояния белков цитоскелета дендритов [18-20, 24]. В поле CA₃ гиппокампа после ТЧМТ в течение 14 сут наблюдения это условие полностью не соблюдалось. Например, через 7 сут происходило значительное (выше контроля) увеличение численной плот-

сти синаптических терминалей, восстановление содержания *p38* и *MAP-2* в целом (по медиане). Однако в это время сохранялись очаги с признаками структурно-функциональной дисфункции систем межнейронной коммуникации. То есть, несмотря на восстановление конформационного состояния белков цитоскелета в одних нейронах, в других сохранялась конденсация цитоскелета. Полное стабильное восстановление всех структур межнейронной коммуникации нейронов в

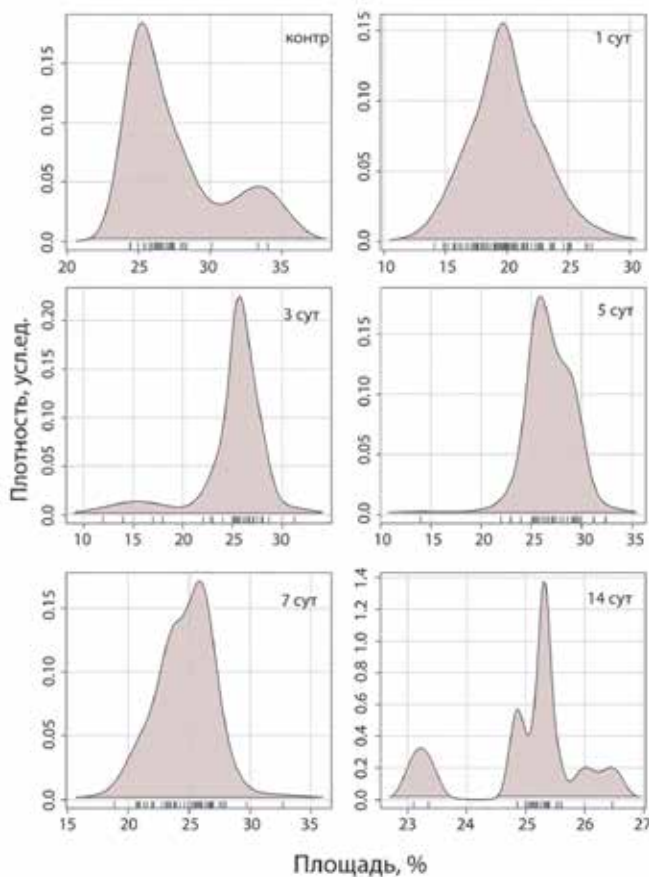


Рис. 6. Распределение полей зрения CA₃ гиппокампа по относительной общей площади меченых (*p38*) гигантских терминалей *stratum lucidum* в контроле и в посттравматическом периоде: через 1 сут происходит смещение в сторону увеличения доли полей зрения с меньшей (15–20%) площадью.

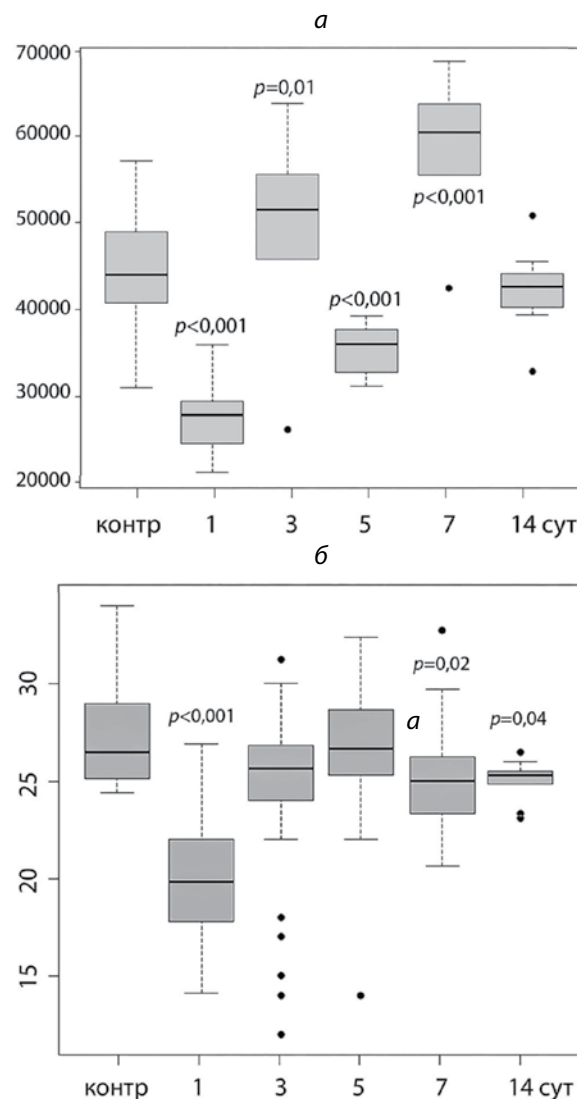


Рис. 7. Общая численная плотность (на 1 мм² плоскости среза, *а*) и относительная площадь (*б*) меченых (*p38*) гигантских терминалей *stratum lucidum* в контроле и в посттравматическом периоде: через 1 сут происходит разрушение части синапсов с уменьшением плотности и общей площади их терминалей. Материал представлен как медиана (50%), 25–75% квантили (бокс), диапазон без (Max-Min) и с выбросами (·).

поле CA₃ гиппокампа после ТЧМТ, вероятно, требовало значительно большего времени и происходило волнообразно на фоне перманентного разрушения какой-то части синапсов. Имеются работы, согласно которым восстановление структурно-функционального состояния нервной ткани головного мозга до контрольного состояния после ишемического повреждения невозможно в принципе. Происходит только приспособление к потере нейронов за счет репаративной синаптической пластичности и постоянной реорганизации сохранившихся нейронных сетей [18]. По данным D. Arneson et al. (2019), это может быть связано с тем, что структурно однородные и однотипные популяции нейронов CA₁ или CA₃ обладают выраженным функциональным и генетическим полиморфизмом [4]. Поэтому уже через 1 сут после травмы чувствительные к ишемии нейроны подвергались необратимым изменениям, а частичное функциональное восстановление гиппокампа происходило за счет реорганизации связей сохранившихся более устойчивых нейронов. То есть, восстановление происходило через образование избыточного количества терминалей с последующей реорганизацией старых и формированием новых нейронных сетей. В пользу этого свидетельствуют наши данные об увеличении общей численной плотности синаптических терминалей через 3 и 7 сут после травмы выше контрольного уровня. В это же время также выявлено увеличение доли нейронов с двумя и более ядрышками, что свидетельствовало о постишемической компенсаторной активации нервных клеток [23].

По данным литературы, нейропластичность предполагает не только образование новых синапсов, но и напротив – избавление от их излишков. Первая называется пластичностью Геббеса, а вторая – гомеостатической пластичностью. Соответственно, первая давала возможность мозгу строить ассоциативные связи (запоминать), а вторая поддерживать гомеостаз путем разрушения синапсов. Новые избыточные связи могли не понадобиться и, кроме того, были способны навредить, участвуя в образовании патологических нейронных систем мозга [18, 25]. Мы полагаем, что через 1 сут после травмы синапсы поля CA₃ разрушались, через 3 и 7 сут происходило избыточное образование новых синапсов в результате активации пластичности Геббеса, а затем восстановление количества синапсов (14 сут) в результате активации гомеостатической пластичности. В совокупности эти две разновидности нейропластичности обеспечивали более тонкое структурно-функциональное восстановление межнейронных взаимоотношений поля CA₃ после ЧМТ. По данным V.L. Zhang и соавт. (2018), не только повреждение синапсов, но и сам про-

цесс реорганизация межнейронных отношений после гибели части нейронов приводит к значительным длительным нарушениям баланса возбуждающих и тормозных систем гиппокампа [26]. Результаты этой и нашей работ свидетельствуют о том, что через 7 суток после травмы не происходило восстановления межнейронных отношений, до уровня, обеспечивающего нормальное функционирование гиппокампа. Поэтому, несомненно, для предотвращения формирования устойчивых патологических систем мозга, по типу эпилептических очагов на базе гиперактивных нейронов гиппокампа, необходим поиск способов коррекции дисбаланса возбуждающих и тормозных систем гиппокампа. Перспективными в этом направлении, вероятно, являются нейропротекторы, соединения, регулирующие процессы нейропластичности и передачи нервного импульса.

Заключение

1. В остром периоде после тяжелой черепно-мозговой травмы в поле CA₃ гиппокампа увеличивались степень гидратации нервной ткани (гидропическая дистрофия), содержание гиперхромных несморщенных и пикноморфных нейронов (белковая дистрофия и коагуляционный некроз), разрушались синапсы, дендриты и перикарианы пирамидных нейронов. Изменения имели диффузно-очаговый гетерохронный и гетероморфный характер. Параллельно происходило восстановление конформационного состояния белков цитоскелета отдельных нейронов, активировались процессы образования новых синапсов. При этом численная плотность p38-позитивных терминалей статистически значимо превышала контрольный уровень через 3 и 7 сут после травмы. До контрольного уровня этот показатель восстанавливался только через 14 сут наблюдения.

2. Выявленные изменения необходимо учитывать при оценке межнейронной коммуникации нейронов и компенсаторно-восстановительной перестройки нейронных сетей гиппокампа в посттравматическом периоде. Таким образом, структурно-функциональное восстановление CA₃ происходило путем длительной реорганизации межнейронных отношений на фоне сохранения дистрофически/некробиотически измененных нейронов и снижения общей численной плотности нейронов. Восстановление межнейронных отношений сохранившихся нейронов происходило путем образование избыточного количества синаптических терминалей с последующей их частичной элиминацией.

3. Полученные данные можно использовать при изучении феномена селективного повреждения и восстановления нейронов, структурных механизмов дисбаланса возбуждающих и тормозных систем гиппокам-

па, а также закономерностей формирования устойчивых патологических систем мозга после травмы у экспериментальных животных и у человека.

Литература

(п.п. 1-4; 7-17; 21; 25; 26 см. References)

5. Степанов А.С. Сравнительная характеристика синаптоархитектоники неокортекса, гиппокампа и миндалевидного комплекса белых крыс в норме и после острой ишемии. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2017; 6(4): 47–54.
6. Степанов А.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б., Горбунова А.В. Коммуникация нейронов поля СА₃ гиппокампа головного мозга белых крыс после острой ишемии. *Общая реаниматология*. 2018; 14(5): 38–49.
18. Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н. *Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты)*. М.: Директ-Медиа; 2014.
19. Яшкичев В.И. Изменение гидратации белков цитоскелета нейрона – механизм образования и движения нервного импульса. *Социально-экологические технологии*. 2015; Т.1-2: 58–64.
20. Яшкичев В.И. Пульсации клеток – основа жизни. *Евразийское Научное Объединение*. 2015; 1(5): 45–9.
22. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. 2-е изд. Издательство Питер; 2003.
23. Степанов С.С., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Степанов А.С., Горбунова А.В. Структурно-функциональная реорганизация ядрышкового аппарата нейронов неокортекса, архикортекса и базальных ганглиев головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2018; 7(4): 67–74.
24. Лю Б.Н., Исмаилов С.Б., Лю М.Б. Состояния цитоскелета: связь с “кислородно-перекисными” эффектами в норме, при клеточных патологиях и апоптозе. *Биомедицинская химия*. 2008; 54(1): 58–77.
- of the white rat brain after acute ischemia. *Obshchaya reanimatologiya*. 2018; 14(5): 38–49. (in Russian)
7. Blennow K., Brody D.L., Kochanek P.M., et al. Traumatic brain injuries. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; Vol. 2: 1–19.
8. Grieves R.M., Duvelle É., Wood E.R., Dudchenko P.A. Field repetition and local mapping in the hippocampus and the medial entorhinal cortex. *J. Neurophysiol*. 2017; 118(4): 2378–88.
9. Legéndy C.R. On the ‘data stirring’ role of the dentate gyrus of the hippocampus. *Rev. Neurosci*. 2017; 28(6): 599–615.
10. Moser E.I., Moser M.B., McNaughton B.L. Spatial representation in the hippocampal formation: a history. *Nat. Neurosci*. 2017; 20(11): 1448–64.
11. Leal G., Bramham C.R., Duarte C.B. BDNF and hippocampal synaptic plasticity. *Vitam. Horm*. 2017; Vol. 104: 153–95.
12. Leo P., McCrean M. Epidemiology. In: Laskowitz D, Grant G, eds. *Translational Research in Traumatic Brain Injury*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis Group; 2016.
13. Van den Bedem H., and Kuhl E. Molecular mechanisms of chronic traumatic encephalopathy. *Curr. Opin. Biomed. Eng*. 2017; Vol. 1: 23–30.
14. Harris T.C., de Rooij R., Kuhl E. The Shrinking Brain: Cerebral Atrophy Following Traumatic Brain Injury. *Ann Biomed Eng*. 2019; 47(9): 1941–59.
15. Cole J.H., Jolly A., de Simoni S., Bourke N., Patel M.C., Scott G., et al. Spatial patterns of progressive brain volume loss after moderate-severe traumatic brain injury. *Brain*. 2018; 141(3): 822–36.
16. Si Yun Ng, Alan Yiu Wah Lee. Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets. *Front. Cell. Neurosci*. 2019; Vol. 13: 528.
17. Stein T.D., Alvarez V.E., McKee A.C. Concussion in Chronic Traumatic Encephalopathy. *Curr Pain Headache Rep*. 2015; 19(10): 47.
18. Semchenko V.V., Stepanov S.S., Bogolepov N.N. *Brain synaptic plasticity (fundamental and applied aspects)*. [Sinapticheskaya plastichnost' golovnoy mozga (fundamental'nye i prikladnye aspekty)]. Moscow: Direkt-Media; 2014. (in Russian)
19. Yashkichev V.I. Change of hydration of proteins of the cytoskeleton – mechanism of creation and movement of nerve impulse. *Sotsial'no-ekologicheskie tekhnologii*. 2015; Vol. 1-2: 58–64. (in Russian)
20. Yashkichev V.I. Cell pulsations - the basis of life. *Evraziyskoe Nauchnoe Ob"edinenie*. 2015; 1(5): 45–9. (in Russian)
21. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
22. Боровиков В. *Statistica. The art of analyzing data on a computer*. 2-nd ed. Izdatel'stvo Piter; 2003. (in Russian)
23. Stepanov S.S., Akulinin V.A., Avdeev D.B., Stepanov A.S., Gorbunova A.V. Structural-functional reorganization of the nucleolar apparatus of neurons of the neocortex, archicortex and basal ganglia of the brain of white rats after a 20-minute occlusion of the common carotid arteries. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2018; 7(4): 67–74. (in Russian)
24. Lyu B.N., Ismailov S.B., Lyu M.B. The state of cytoskeleton and its links “oxygen-peroxide” effects in some pathologies and apoptosis. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2008; 54(1): 58–77. (in Russian)
25. Hobbiss A.F., Ramiro-Corte's Y., Israely I. Homeostatic Plasticity Scales Dendritic Spine Volumes and Changes the Threshold and Specificity of Hebbian Plasticity. *iScience*. 2018; Vol. 8: 161–74.
26. Zhang B.L., Fan Y.S., Wang J.W., et al. Cognitive impairment after traumatic brain injury is associated with reduced long-term depression of excitatory postsynaptic potential in the rat hippocampal dentate gyrus. *Neural Regen Res*. 2018; 13(10): 1753–8.

References

1. Raven F., Van der Zee E.A., Meerlo P., Havekes R. The role of sleep in re-gulating structural plasticity and synaptic strength: implications for memory and cognitive function. *Sleep Med. Rev*. 2018; Vol. 39: 3–11.
2. Spitz G., Bigler E.D., Abildskov T., Maller J.J., O'Sullivan R., and Ponsford J.L. Regional cortical volume and cognitive functioning following traumatic brain injury. *Brain Cogn*. 2013; Vol. 83: 34–44.
3. Palacios E.M., Sala-Llonch R., Junque C., FernandezEspejo D., Roig T., Tormos J.M., et al. Long-term declarative memory deficits in diffuse TBI: correlations with cortical thickness, white matter integrity and hippocampal volume. *Cortex*. 2013; Vol. 49: 646–57.
4. Arneson D., Zhang G., Ying Z. et al. Single Cell Molecular Alterations Reveal Target Cells and Pathways of Concussive Brain Injury. *Nat Commun*. 2018; 9(1): 3894.
5. Stepanov A.S. Comparative characteristics of the white rats neocortex, hippocampus and amygdale complex synaptoarchitectonics in norm and after acute ischemia. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2017; 6(4): 47–54. (in Russian)
6. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Avdeev D.B., Gorbunova A.V. Neurons communication in the hippocampus of field CA₃

Сведения об авторах:

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

Кошман Игорь Петрович, очный аспирант каф. неврологии и нейрохирургии Омского государственного медицинского университета, e-mail: koshman.ip@gmail.com;

Шоропова Анастасия Юрьевна, очный аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета, e-mail: nastasya1994@mail.ru;

Калиничев Алексей Геннадьевич, доктор мед. наук, проф. каф. неврологии и нейрохирургии Омского государственного медицинского университета, e-mail: akalinichev59@gmail.com;

Акулинин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета;

Степанов Александр Сергеевич, канд. мед. наук, заочный аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета, e-mail: stepan55@yandex.ru;

Авдеев Дмитрий Борисович, канд. ветеринарн. наук, ст. преподаватель каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета, e-mail: avdeev86@inbox.ru;

Маркелова Марина Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии Омского государственного медицинского университета, e-mail: marina.markelova@mail.ru

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092

Муровец В.О., Ленцман М.В.

Бензиловый эфир креатина эффективен для профилактики и лечения неврологических и когнитивных нарушений при фокальной ишемии головного мозга у крыс

ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН»,
199034, Санкт-Петербург, Россия, наб. Макарова, д. 6

Введение. Ишемический инсульт головного мозга является одной из главных причин преждевременных смертей во всем мире, вызванные им когнитивные и функциональные нарушения ведут к инвалидизации. Для клинического использования в настоящее время одобрено лишь одно средство – рекомбинантный активатор плазминогена, который обеспечивает восстановление (реканализацию) мозгового кровотока. Средства эффективной нейропротекции, обеспечивающие непосредственную защиту нейронов от ишемии (предотвращение апоптоза, сохранение функциональной активности), несмотря на огромное число исследований, по-прежнему не найдены. Поиск новых подходов к профилактике и лечению острых нарушений мозгового кровообращения по-прежнему остается одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Цель исследования – изучение влияния бензилового эфира креатина, нового синтетического соединения, обладающего способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и осуществлять нейропротекторное действие на неврологические и когнитивные нарушения, вызванные фокальной ишемией головного мозга у крыс линии Спрэг-Доули.

Методика. Фокальную ишемию головного мозга (ФИМ) индуцировали путем хронической окклюзии левой средней мозговой артерии (СМА) в соответствии с модификацией методики А. Tamura и соавт., 1981. Использовали комбинированный наркоз: Золетил/Домитор (внутрибрюшинно (в/б) по 50 мг/кг и 0.2 мг/кг, соответственно), температуру тела поддерживали постоянной на уровне 38 ± 0.5 °С. Окклюзию СМА производили путем биполярной высокочастотной электрокоагуляции (аппарат ЭХВЧ-25-11-С, «Медия», Россия) наиболее проксимального участка артерии, начиная с 0.5 мм от места ее отхождения от Виллизиева круга и на протяжении 2–3 мм. Процедура имитации ишемии (ложная операция) была аналогична вышеизложенной, но без электрокоагуляции СМА. Оценку степени неврологических нарушений проводили с использованием неврологической шкалы Гарсии и модифицированной шкалы тяжести неврологических нарушений (ОТНН) последовательно за 1 сут до и через 1, 3 и 7 сут после моделирования ФИМ. Для выявления когнитивных нарушений использовали водный лабиринт Морриса. Стандартный тест исследования процессов обучения и памяти применяли в версии для оценки пространственной референтной памяти, заключающейся в поиске животным скрытой под водой платформы при ориентации только по приметам окружающей обстановки. Бензиловый эфир креатина вводили внутрибрюшинно трижды – за 3, 2 и 1 ч до фокальной ишемии при профилактическом применении, либо через 1, 2 и 3 ч после моделирования ишемии при лечебном применении.

Результаты. Получены приоритетные данные о том, что бензиловый эфир креатина при профилактическом введении эффективно предупреждает развитие неврологических нарушений и ослабляет когнитивные нарушения после фокальной ишемии мозга; при лечебном применении препарат ослабляет тяжесть неврологических нарушений и снижает выраженность когнитивных расстройств.

Заключение. Результаты исследования позволяют рекомендовать данное производное креатина (после оценки возможной токсичности) для проведения первой фазы клинических испытаний в качестве препарата противоишемического действия.

Ключевые слова: фокальная ишемия мозга; креатин; аналоги креатина; водный лабиринт Морриса; неврологические шкалы; крысы

Для цитирования: Муровец В.О., Ленцман М.В. Бензиловый эфир креатина эффективен для профилактики и лечения неврологических и когнитивных нарушений при фокальной ишемии головного мозга у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 35-41.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.35-41

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста, редактирование – Ленцман М.В., Муровец В.О.; подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка – Муровец В.О.

Для корреспонденции: Ленцман Михаил Валерьевич, e-mail: MLensman@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014-2020 годы (ГП-14, раздел 64).

Благодарность. Авторы благодарят канд. биол. наук Артемьеву А.И. за неоценимую помощь в операционной подготовке животных и доктору хим. наук Буровой С.В. с коллегами из ФГБУН Институт Высокомолекулярных соединений РАН за синтез и предоставление для исследований бензилового эфира креатина.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.06.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Murovets V.O., Lentsman M.V.

Creatine benzyl ester is effective for prevention and treatment of neurological and cognitive disorders caused by focal cerebral ischemia in rats

I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Science,
Naberezhnaya Makarova 6, Saint Petersburg 199034, Russian Federation

Background. Ischemic stroke is one of the main causes for premature death worldwide. Cognitive and functional disorders induced by stroke result in disability. Currently, only one agent has been approved for the clinical use, recombinant plasminogen activator, which provides recovery (recanalization) of cerebral blood flow. Despite numerous studies, an effective treatment to protect directly neurons from ischemia (preventing apoptosis, maintaining functional activity) has not been found so far. Thus, search for new approaches to prevention and treatment of acute cerebrovascular accidents remains one of the most pressing challenges of modern medicine.

The aim of this work was to study the effect of creatine benzyl ester, a new synthetic compound capable for penetrating the blood-brain barrier to provide neuroprotection, on neurological and cognitive disorders induced by focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats.

Methods. Focal cerebral ischemia was induced by chronic occlusion of the left middle cerebral artery (MCA) by a A. Tamura et al. (1981) modified method. Combined intraperitoneal (i.p.) anesthesia with Zoletil/Domitor (50 mg/kg and 0.2 mg/kg, respectively) was used. Body temperature was maintained at 38 ± 0.5 °C. MCA occlusion was performed by bipolar high-frequency electrocoagulation (EKVCh-25-11-C, Media, Russia) of the most proximal part of the artery, from 0.5 mm from the place where it originates from the circle of Willis and over 2–3 mm. The sham ischemia procedure was similar to that described above but without MCA electrocoagulation. Severity of neurological disorders was assessed with the Garcia neurological scale and a modified scale for severity of neurological disorders (OTTN) one day before and at 1, 3, and 7 days following ischemia. Cognitive impairment was assessed with the Morris water maze, a standard test for learning and memory. This test was used in a version for studying spatial reference memory, which consists of finding a platform hidden under the water by the animal guided only by surrounding marks. Creatine benzyl ester was injected i.p. three times, 3, 2 and 1 h before focal ischemia for prevention or 1, 2 and 3 h after ischemia for treatment.

Results. The study produced priority data showing that preventive administration of creatine benzyl ester effectively abolished the development of neurological disorders and alleviated the cognitive impairment after focal cerebral ischemia whereas the therapeutic treatment restricted the severity of neurological and cognitive disorders.

Conclusion. The results of the study supported recommendation of this creatine derivative (after assessing potential toxicity) for the first phase of clinical trials as an anti-ischemic drug.

Keywords: focal cerebral ischemia; creatine; creatine analogs; Morris water maze; neurological scales; rats

For citation: Murovets V.O., Lentsman M.V. Creatine benzyl ester is effective for prevention and treatment of neurological and cognitive disorders caused by focal cerebral ischemia in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 35-41. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.35-41

Contribution: study concept and design, material collection and processing, text writing, editing – Lentsman M. V., Murovets V.O.; preparation of illustrations, statistical analysis – Murovets V.O.

For correspondence: **Michael V. Lentsman**, MD, PhD, Senior Research Scientist, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Science»; Nab. Makarova, 6, 199034, Saint-Petersburg, Russia, e-mail: mlensman@yandex.ru

Gratitude. The authors are grateful to Ph.D. Artemieva A.I. for invaluable assistance in the operational preparation of animals and Ph.D. Burov S.V. with colleagues from the Institute of High Molecular Compounds, Russian Academy of Sciences, for the synthesis and provision of creatine benzyl ester for research.

Acknowledgment. This study was supported by the Program of Basic Research of State Academies, 2014-2020 (GP-14, part 64).

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

Information about the authors:

Murovets V.O., <https://orcid.org/0000-0001-5741-1562>

Lentsman M.V., <https://orcid.org/0000-0003-2296-3687>

Received 03.06.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Частота встречаемости инсульта растет в мире с каждым годом. Ишемический инсульт — одна из главных причин преждевременной смерти и инвалидизации людей. Вызванные инсультом когнитивные и функциональные нарушения существенно снижают качество жизни [1]. Поиск новых подходов к профилактике и лечению острых нарушений мозгового кровообращения по-прежнему остается одной из наиболее актуальных проблем современной медицины [2, 3]. Для клинического применения одобрено средство — рекомбинантный активатор пламиногена (IV-tPA и аналоги), который обеспечивает восстановление мозгового кровотока [4, 5]. При всех достоинствах препарата, он зачастую не может обеспечить полноценную реперфузию и уменьшить тяжесть поражения в области формирующегося инфаркта мозга [6, 3]. Несмотря на огромное число исследований [2, 3] средства эффективной нейропротекции, по-прежнему не найдены,

Известно, что развитие необратимого поражения нервной ткани при ишемии в значительной степени связано с падением уровня высокоэнергетических фосфатов (АТФ и креатинфосфата) [7]. Поскольку креатинфосфат способен поддерживать ресинтез АТФ из АДФ при ишемии, наращивание пула мозгового креатинфосфата за счет введения его предшественника, креатина, представляется весьма перспективным способом нейропротекции. В опытах *in vitro* на переживающих срезах мозга эта гипотеза уже нашла подтверждение [8, 9]. Возможность достижения этого простым увеличением содержания креатина в пище наталкивается на чрезвычайно низкую проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для креатина [10–12], и, хотя ряд авторов действительно наблюдали увеличение уровня креатинфосфата и нейропротекторный эффект на модели ишемии при длительном кормлении животных креатином [13, 14], это скорее может объясняться выявленным стимулирующим эффектом креатина на ряд генов, ответственных за дифференцировку ткани [15].

Авторы ранее впервые показали, что предварительное интрацеребровентрикулярное введение 50 мМ раствора креатина эффективно предупреждает развитие неврологических нарушения и ослабляет когнитивные нарушения, вызванные глобальной ишемией головного мозга у крыс, а также обладает сильным нейропротекторным действием [16–18]. Поскольку такой спо-

соб введения очевидно непригоден для использования в клинике, дальнейшим развитием стало исследование производных креатина, обладающих потенциальной способностью прохождения через ГЭБ. Одним из таких препаратов был бензиловый эфир креатина (БЭКр), предложенный в патенте¹ ранее был протестирован в модели срезов гиппокампа. Было показано, что БЭКр хорошо проникает через мембрану нейрона независимо от специализированного транспортера креатина CRT и значимо увеличивает содержание креатина в ткани. Были получены также данные о том, что БЭКр обладает определенными противоишемическими свойствами².

Цель исследования — оценка профилактической и лечебной эффективности БЭКр при неврологических и когнитивных нарушениях, вызванных экспериментальной фокальной ишемией головного мозга у крыс *in vivo*.

Методика

Исследование проведено в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 и под контролем Комиссии по биоэтике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. В опытах использовали 48 самцов крыс (290–340 г) линии Спрэг-Доули (ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН»). Животных содержали в лабораторном виварии в клетках Т4 по 4–5 особей при регулируемом световом (12/12 ч) и температурном режиме (22 °С), и свободном доступе к пище (гранулированный корм, «Волосово») и воде.

Фокальную ишемию головного мозга (ФИМ) индуцировали путем хронической окклюзии левой средней мозговой артерии (СМА) в соответствии с модификацией [19] методики [20]. Использовали комбинированный наркоз: Золетил/Домитор (внутрибрюшинно (в/б) по 50 мг/кг и 0.2 мг/кг, соответственно), температуру тела поддерживали постоянной на уровне 38±0.5. Окклюзию СМА производили путем биполярной высокочастотной электрокоагуляции (аппарат ЭХВЧ-25-11-С, «Медия», Россия) наиболее проксимального участка артерии, начиная от 0.5 мм от места ее отхождения от Виллизиева круга и на протяжении 2–3 мм. Процедура имитации ФИМ (ложная операция) была аналогична вышеизложенной, но без электрокоагуляции СМА.

Животным экспериментальных групп в/б вводили водный раствор гидрохлорида бензинового эфира кре-

¹Vennerstrom J.L. and Miller D.W. Creatine ester pronutrient compounds and formulations. Patent WO0222135, USA; 2002.

²Поленов С.А. и соавт «Применение бензинового эфира креатина в качестве противоишемического препарата. Заявка на Росс. патент, МПК 7 А61К 31/661/2. – Приоритет 02.04.06].

атина, негативному ($n=21$) и ложнооперированному контролю ($n=5$) – физраствор. БЭКр (200 мг/кг) и физраствор вводили по 0.5 мл/кг трижды за 180, 120 и 60 мин до (режим профилактического применения, $n=11$), или через 60, 120 и 180 мин (режим лечебного применения, $n=9$) после моделирования ФИМ. Поскольку в водной среде БЭКр довольно быстро распадается на креатинин и бензол [19], каждый раз использовали свежеприготовленный раствор. Препарат готовили в соответствии с методикой, описанной [19].

Оценку степени неврологических нарушений проводили с использованием неврологической шкалы Гарсии [22] и модифицированной шкалы тяжести неврологических нарушений (ОТНН) [23] последовательно за 1 сут до ФИМ и через 1, 3 и 7 сут после. Шкала Гарсии включала 6 тестов спонтанной активности, асимметрии движений и соматосенсорной чувствительности. Увеличение итогового балла (3–18) соответствовало снижению выраженности нарушений. ОТНН выявляла неспособность выполнять отдельный тест из 4 основных групп тестов, оценивающих моторные и сенсорные асимметрии, сенсомоторные нарушения при балансировании на приподнятом горизонтальном стержне, отсутствие определенного рефлекса (мигательный, старт-рефлекс и т.д.). При этом увеличению балла (0–18) соответствовало увеличение тяжести нарушений. Для исследования когнитивных нарушений использовали водный тест (лабиринт) Морриса (ВТМ) [24] – стандартный тест для исследования процессов обучения и памяти [25, 26], в версии на исследование пространственной референтной памяти, заключающийся в поиске животным платформы, скрытой под водой, при ориентации только по приметам окружающей обстановки. Установка ВТМ представляла собой бассейн диаметром 145 см и высотой 50 см, заполненный на 25 см теплой водой (≈ 24 °C), замутненной небольшим количеством мела. В центре одного из квадрантов (т.н. целевой квадрант) находилась платформа (диаметр 12 см, заглубление 1 см, в 25 см от стенки бассейна), положение которой не менялось в течение всего периода обучения. Бассейн располагался в отдельном помещении с достаточным количеством визуальных ориентиров на стенах, которое освещалось рассеянным светом двух 250 Вт ламп накаливания. Обучение в ВТМ проводили, начиная с 2-х сут после ФИМ, ежедневно в течение 6 сут, по четыре 120-секундных попытки с интервалом 30 с из 4 стартовых точек, варьирующихся в псевдослучайной последовательности. Между попытками крыса оставалась на платформе. Время поиска в блоке из 4 последовательных попы-

ток усредняли и использовали как обобщенный показатель «навигационных» способностей дня. На 6-е сут через 40–50 мин после последней попытки проводили так называемую пробную попытку, во время которой при изъятых платформах в течение двух минут производили видеорегистрацию поискового поведения животного. При последующем анализе видеозаписи определяли характеристики эффективности обучения: подсчитывали число пересечений места локализации платформы и с использованием оригинальной программы для приложения IMAQ Vision рассчитывали время, проведенное животным у стенок бассейна (в пределах аннулюса – полосы шириной 20 % от диаметра бассейна) и в целевом квадранте, а также общую протяженность поискового пути и среднюю скорость плавания.

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, США). Для построения графиков использовали Microsoft® Excel 365. Все результаты представлены в виде средней арифметической и стандартной ошибки средней. Анализ неврологических данных проводили с помощью U критерия Манна-Уитни; данные статистики приведены с учетом поправки Бонферрони на множественность сравнений. Данные ВТМ анализировали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA), где факторами были день обучения и воздействие, результаты пробных попыток – с помощью однофакторного ANOVA. Апостериорные сравнения средних проводили с использованием критерия Фишера наименьшей значимой разницы (LSD-тест, Фишер НЗР). Был принят уровень значимости $p < 0.05$.

Результаты исследования и обсуждение

Неврологические тесты обеих шкал (Гарсии и ОТНН) выявляли значительные нарушения, вызванные фокальной ишемией (ФИМ) у крыс ($n=18$) в течение всей недели наблюдений (рис. 1, а, б), что хорошо согласуется с данными литературы [22, 23]. Предварительное введение БЭКр практически полностью защищало крыс ($n = 10$) от эффекта ФИМ (рис. 1). Во все дни после ФИМ эта группа не отличалась от ложнооперированного контроля (ЛО) и от собственного контрольного уровня до ФИМ; незначительное снижение/увеличение баллов по обоим шкалам (на 1–2 балла) отмечалось лишь у отдельных особей.

Крысы группы с «лечебным» введением БЭКр ($n=9$) в шкале Гарсии (рис. 1, а) демонстрировали промежуточный уровень нарушений между ЛО и негативным контролем, отличаясь от негативного контроля

через 1 и 7 сут после ФИМ, а от ЛО через 1 и 3 сут после ФИМ (при $p < 0.05 \sim 0.01$; U-тест). В то же время, по Шкале ОТНН (рис. 1, б) животные, получавшие лечебные инъекции БЭКр, после операции не отличались от негативного контроля, но отличались от ЛО на 1-е и 3-и сут ($p < 0.05$; U-тест). Таким образом, лечебное введение БЭКр после ФИМ ослабляло выраженность неврологических нарушений и ускоряло восстановление неврологического статуса, но в меньшей степени, чем профилактическое.

Двухфакторный ANOVA выявил значимые различия между протестированными группами по ходу освоения водного теста Морриса (ВТМ) (рис. 2, а); эффект воздействия (группа) – $F(3, 25) = 7.66, p < 0.001$; эффект дня обучения – $F(5, 130) = 36.10, p < 0.0001$, взаимодействие факторов – $F(15, 130) = 1.51, p < 0.11$. Дальнейший анализ показал, что животные из группы негативного контроля ($n=8$) обучались значительно хуже группы ЛО ($n=5$), а также групп, получавших препарат ($p < 0.05 \sim 0.001$). Внутригрупповой анализ хода обучения показал, что группа ЛО быстро осваивала задачу теста: латентность поиска значимо снижалась уже на 2-е сут обучения (2-е сут отличаются от 1-х ($p < 0.02$), 4-х и 5-х сут ($p < 0.05$), а на 3-и сут приближалась к минимально возможному значению. У крыс негативного контроля существенное снижение латентности происходило лишь на 4-е сут и продолжалось далее вплоть до 6-х сут обучения (4-е сут отличаются от 1-х и 5–6 сут ($p < 0.05 \sim 0.01$)). В сравнении с ЛО контролем, крысы негативного контроля характеризовались большей латентностью поиска платформы на 2-е – 4-е сут обу-

чения (рис. 2, а). Таким образом, ФИМ значимо замедляла освоение ВТМ. Препарат оказывал выраженное положительное влияние на освоение теста после ФИМ. В сравнении с негативным контролем, крысы с «профилактическим» БЭКр ($n=8$) существенно быстрее находили платформу на 2-е и 4-е сут, а крысы с «лечебным» введением БЭКр ($n=9$) – на 4-е сут обучения (рис. 2, а). При этом наблюдались различия в характере кривых обучения. Крысы с «профилактическим» БЭКр первые 2 сут имели такую же низкую латентность как и ЛО, только на 4-е сут наблюдалось дальнейшее снижение (4-е–6-е отличаются от 1-х сут, $p < 0.001$). В то время как животные с «лечебным» БЭКр последовательно снижали время поиска первые 4 сут обучения и далее оно значимо не менялось (отличие между сутками 1–4, $p < 0.05 \sim 0.001$).

Анализ поисковых траекторий во время пробной попытки подтвердил существенное негативное влияние ФИМ на пространственное обучение и память. Животные негативного контроля демонстрировали явное нарушение запоминания места платформы. Так, в отличие от ЛО они не предпочитали целевой квадрант (находились в нем около четверти времени), демонстрировали выраженный тигмотаксис (в 2.5 раза дольше плавали на периферии бассейна) и очень редко пересекали место положения платформы (рис. 2, в-д). Таким образом, ФИМ нарушала механизмы обработки, запоминания и/или использования пространственной информации у крыс, что стимулировало компенсаторное развитие так называемых непространственных стратегий поиска (тигмотаксис – инстинктивный по-

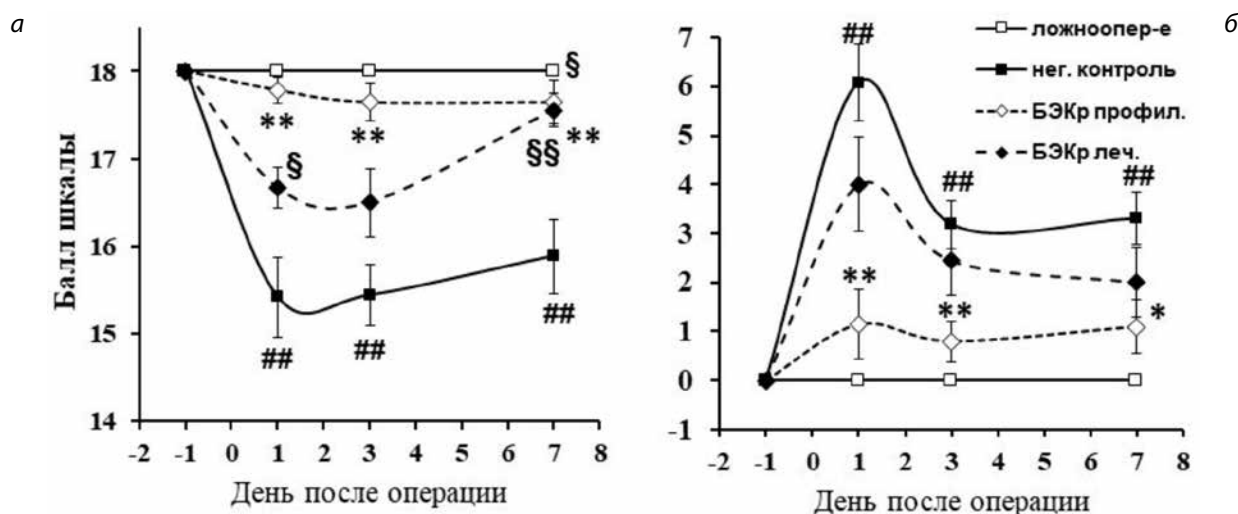


Рис. 1. Влияние бензилового эфира креатина (БЭКр) на неврологические нарушения, вызванные фокальной ишемией головного мозга (ФИМ) у крыс, выявленные шкалами Гарсии (а) и ОТНН (б).

иск спасения на периферии бассейна, ориентирование относительно стенок бассейна). Поскольку при этом общая длина пути поиска/средняя скорость плавания в обеих группах были сопоставимы (рис. 2, б), можно заключить, что неврологические нарушения у крыс с ФИМ не влияли на способность к плаванию в бассейне ВТМ, т.е. отсутствовала интерференция между неврологическими и когнитивными нарушениями. Очевидно, ФИМ негативно влияла именно на процессы пространственного обучения и памяти в водном тесте, а не на иные типы обучения (ассоциативное и пр.), что согласуется с данными литературы [27].

В сравнении с негативным контролем крысы с предварительным введением БЭКр имели меньшую продолжительность тигмотаксиса (рис. 2, в), а группа с лечебным введением БЭКр, демонстрировала хорошее запоминание локализации платформы и меньшую продолжительностью тигмотаксиса (рис. 2, г, д). При этом обе группы, получавшие препарат, не отличались друг от друга по показателю общего пути поиска (средней скорости плавания) и времени в целевом квадранте. Таким образом, введение БЭКр значительно облегчало освоение ВТМ после ФИМ, а также улучшало пространственную память; когнитивные процессы пространственного обучения у групп с препаратом протекали быстрее и эффективнее, чем в контрольной группе с ФИМ, при этом динамика процессов и эффективность запоминания и использования простран-

ственной информации несколько варьировала в зависимости от порядка введения.

Продемонстрированное отличие степени эффективности бензилового эфира креатина для протекции неврологических и когнитивных способностей у крыс после ФИМ при его профилактическом и лечебном введении требует особого объяснения. По всей видимости, высокая скорость развития нейронального поражения при ФИМ в значительной степени ограничивает эффективность лечебного введения исследуемого вещества, поскольку необходимый этап превращения креатина в креатинфосфат (т.е. «аккумуляция» энергии в макроэргических соединениях) неизбежно затягивается из-за нехватки или отсутствия необходимых субстратов энергетического метаболизма. Кроме того, так как активность белка–переносчика креатина зависит от градиента Na^+/Cl^- [28], в условиях ишемии транспорт креатина в клетки может нарушаться из-за снижения мембранного градиента соответствующих ионов.

Заключение

Впервые показано, что внутрибрюшинное введение нового синтетического производного креатина – бензилового эфира креатина – эффективно предупреждает развитие неврологических нарушений и снижает степень когнитивных нарушений вызванных экспериментальной фокальной ишемией мозга у крыс при профилактическом режиме введения, а также ослабляет

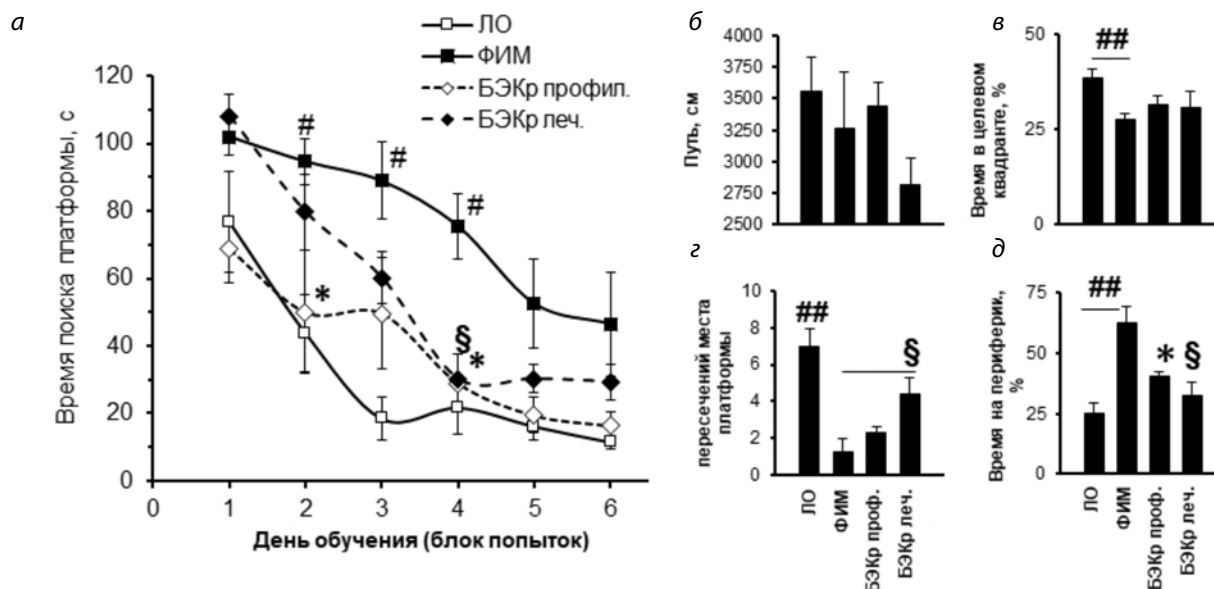


Рис. 2. Влияние бензилового эфира креатина (БЭКр) на обучение крыс (а) в водном тесте Морриса после фокальной ишемии головного мозга и параметры поисковой активности животных в пробную попытку (б–д).

тяжесть неврологических нарушений и снижает выраженность когнитивных нарушений при лечебном режиме введения. Результаты исследования позволяют рекомендовать данное производное креатина (после завершения оценки возможной токсичности) для проведения первой фазы клинических испытаний в качестве противоишемического препарата.

Литература

(п.п. 1-6; 8-17; 19-28 см. References)

7. Самойлов М.О. Мозг и адаптация: молекулярно-клеточные механизмы. Санкт-Петербург: Изд-во ин-та физиологии им. И.П. Павлова РАН; 1999.
18. Муровец В.О., Ленцман М.В., Артемьева А.И., Балестрино М., Поленов С.А. Креатин эффективен для профилактики неврологических и когнитивных нарушений, вызванных глобальной ишемией головного мозга у крыс. *Нейронауки*. 2006; 1(3): 20-4.

References

1. Benjamin E.J., Blaha M.J., Chiuve S.E., Cushman M., Das S.R., Deo R., et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*. 2017; 135(10): e146-e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485.
2. Furlan A.J. Challenges in acute ischemic stroke clinical trials. *Curr Cardiol Rep*. 2012; 14(6): 761-6. doi: 10.1007/s11886-012-0311-9.
3. Chamorro Á. Neuroprotectants in the Era of Reperfusion Therapy. *Journal of Stroke*. 2018; 20(2): 197-207.
4. Bhaskar S., Stanwe P., Cordato D., Attia J. and Levi C. Reperfusion therapy in acute ischemic stroke: dawn of a new era? *BMC Neurology*. 2018; 18(1): 8. doi: 10.1186/s12883-017-1007-y.
5. You S., Saxena A., Wang X., Tan W.Y., Han Q., Cao Y., Liu C.-F. Efficacy and safety of intravenous recombinant tissue plasminogen activator in mild ischaemic stroke: a meta-analysis. *Stroke and Vascular Neurology*. 2018; 3: e000106. doi:10.1136/svn-2017-000106.
6. El Amki M., Wegener S. Improving Cerebral Blood Flow after Arterial Recanalization: A Novel Therapeutic Strategy in Stroke. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 18(12): 2669. doi: 10.3390/ijms18122669.
7. Samoilov M.O. Brain and adaptation. Molecular and cellular mechanisms. [*Mozg i adaptatsia: molekuliarno-kletochnie mekhanizmi*]. Saint-Petersburg: Pavlov Institute of Physiology Press, 1999. (In Russian)
8. Carter A.J., Muller R.E., Pschorn U., Stransky W. Preincubation with creatine enhances levels of creatine phosphate and prevents anoxic damage in rat hippocampal slices. *J. Neurochem*. 1995; 64(6): 2691-9.
9. Balestrino M., Lensman M., Parodi M., Perasso L., Rebaudo R., Melani R., et al. Role of creatine and phosphocreatine in neuronal protection from anoxic and ischemic damage. *Amino Acids*. 2002; 23(1-3): 221-9.
10. Horn M., Frantz S., Remkes H., Laser A., Urban B., Mettenleiter A., et al. Effects of chronic dietary creatine feeding on cardiac energy metabolism and on creatine content in heart, skeletal muscle, brain, liver and kidney. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1998; 30(2): 277-84.
11. Dechent P., Pouwels P.J.W., Wilken B., Hanefeld F., Frahm J. Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatinemonohydrate. *Am. J. Physiol*. 1999; 277(3): R698-704.
12. Perasso L., Cupello A., Lunardi G. L., Principato C., Gandolfo C., Balestrino M. Kinetics of creatine in blood and brain after intraperitoneal injection in the rat. *Brain Res*. 2003; 974(1-2): 37-42.
13. Wick M., Fujimori H., Michaelis T., Frahm J. Brain water diffusion in normal and creatine-supplemented rats during transient global ischemia. *Magn. Reson. Med*. 1999; 42(4): 798-802.
14. Zhu S., Li M., Figueroa B.E., Liu A., Stavrovskaya I.G., Pasinelli P., et al. Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. *J. Neurosci*. 2004; 24(26): 5909-12.
15. Gualano B., Artioli G.G., Poortmans J.R. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids*. 2010; 38(1): 31-44.
16. Otellin V.A., Korzhevskii D.E., Kostkin V.B., Balestrino M., Lensman M. V., Polenov S.A. The neuroprotective effect of creatine in rats with cerebral ischemia. *Doklady Biological Sciences*. 2003; 390: 197-9.
17. Lensman M., Korzhevskii D., Mourovets V., Kostkin V., Izvarina N., Perasso L. et al. Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. *Brain Res*. 2006; 1114(1): 187-94.
18. Mourovets V.O., Lensman M.V., Artemieva A.I., Balestrino M., Polenov S.A. Creatine is effective in the prevention of neurological and the reduction of cognitive disturbances induced by global cerebral ischemia in rats. *Russ. J. Neurosci*. 2006; 1(3): 20-4. (in Russian)
19. Lunardi G., Parodi A., Perasso L., Pohvozheva A.V., Scarrone S., Adriano E. et al. The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds. *Neuroscience*. 2006; 142(4): 991-97.
20. Bederson J.B., Pitts L.H., Tsuji M. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986; 17(3): 472-76.
21. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1981. 1(1): 53-60.
22. Garcia J.H., Wagner S., Liu K., Hu X. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical Validation. *Stroke*. 1995; 26(4): 627-35.
23. Chen J., Li Y., Wang L., Zhang Z., Lu D., Lu M., et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001; 32(4): 1005-11.
24. Morris R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*. 1981; 12(2): 239-60.
25. DeVries A.C., Nelson R.J., Traystman R.J., Hurn P.D. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2001; 25(4): 325-42.
26. Vorhees C.V., Williams M.T. Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies. *Neurotoxicology and Teratology*. 2015; 52(Pt A): 93-108.
27. Roof R.L., Schielke G.P., Ren X., Hall E.D. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke*. 2001; 32(11): 2648-57.
28. Speer O., Neukomm L.J., Murphy R.M., Zanolla E., Schlattner U., Henry H., et al. Creatine transporters: a reappraisal. *Mol. Cell. Biochem*. 2004; 256-257(1-2): 407-24.

Сведения об авторах:

Муровец Владимир Олегович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., e-mail: mourovets@mail.ru;

Ленцман Михаил Валерьевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., e-mail: mlensman@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.13-004.6-005.6

Гончаров М.Д.^{1,2}, Гринштейн Ю.И.¹, Савченко А.А.^{1,3}, Косинова А.А.¹

Хемилюминесцентная активность и агрегация тромбоцитов при хронической коронарной болезни сердца на фоне терапии ацетилсалициловой кислотой до и после коронарного шунтирования

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022, Красноярск, Россия, ул. Партизана Железняка, д. 1;

²ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Минздрава России, 660020, Красноярск, Россия, ул. Караульная, д. 45;

³ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», 660022, Красноярск, Россия, ул. Партизана Железняка, д. 3Г

Введение. При использовании ацетилсалициловой кислоты (АСК) в качестве антиагреганта после операции аортокоронарного шунтирования (АКШ) может встречаться феномен резистентности к АСК, генез которого недостаточно изучен. С помощью хемилюминесцентного (ХЛ) анализа изучена функциональная активность тромбоцитов резистентных и чувствительных к АСК.

Методика. Обследовано 104 пациента с хронической коронарной болезнью (ХКБ). Контрольная группа - 30 здоровых доноров. Забор крови проводили до АКШ, в 1-е и на 8-е – 10 сут после АКШ. Определяли агрегацию с коллагеном, адреналином, АДФ и резистентность тромбоцитов к АСК с помощью оптической агрегометрии с арахидоновой кислотой при уровне $\geq 20\%$. Исследовали спонтанную и АДФ-индуцированную ХЛ тромбоцитов с люминолом и люцигенином на биохемилюминесцентном анализаторе.

Результаты. 71 пациент с ХКБ оказался чувствительным к АСК (чАСК), 33 - резистентными (рАСК). У чАСК пациентов большинство показателей ХЛ было выше, чем в контрольной группе в течение всего периода наблюдения, у рАСК пациентов таковые были на уровне контрольных значений. До АКШ у чАСК пациентов значения показателей ХЛ с люцигенином выше, чем у рАСК. В группе чАСК пациентов на 1-е сут после АКШ наблюдалось снижение ХЛ с люцигенином, а на 8-10-е сут повышение ХЛ с люминолом по сравнению с уровнем до операции. У рАСК пациентов наблюдается положительная корреляция показателей ХЛ и агрегации тромбоцитов.

Заключение. С помощью ХЛ можно судить о функциональной активности тромбоцитов при ХКБ. Исследование показателей ХЛ позволяет до операции АКШ выявить рАСК пациентов. Наличие динамики в показателях ХЛ тромбоцитов у чАСК пациентов до и после АКШ, отсутствие таковой у рАСК пациентов позволяет сделать предположения о зависимости резистентности к АСК не только от внутреннего состояния тромбоцитов, но и от межклеточных связей.

Ключевые слова: хроническая коронарная болезнь; резистентность; ацетилсалициловая кислота; тромбоцит; хемилюминесценция; активные формы кислорода

Для цитирования: Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Косинова А.А. Хемилюминесцентная активность и агрегация тромбоцитов при хронической коронарной болезни сердца на фоне терапии ацетилсалициловой кислотой до и после коронарного шунтирования. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 42-51.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.42-51

Для корреспонденции: Гончаров Максим Дмитриевич, e-mail: adimax07@mail.ru

Участие авторов: сбор и обработка материала, написание текста – Гончаров М.Д.; разработка концепции и дизайна исследования, редактирование – Гринштейн Ю.И.;

статистическая обработка данных, редактирование – Савченко А.А.; редактирование – Косинова А.А.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта: № 18-415-243003 «Персонализация антитромбоцитарной терапии пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) в зависимости от уровня экспрессии гена Р-селектина, выраженности межклеточного взаимодействия и воспаления».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.04.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Goncharov M.D.^{1,2}, Grinshtein Yu.I.¹, Savchenko A.A.^{1,3}, Kosinova A.A.¹

Chemiluminescent activity and platelet aggregation in chronic coronary heart disease during the acetylsalicylic acid therapy before and after coronary bypass surgery

¹Professor V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University. 1, Partizanaa Zheleznaya Str., Krasnoyarsk 660022, Russian Federation;²Federal Center of Cardiovascular Surgery, Karaul'naya Str. 45, Krasnoyarsk 660020, Russian Federation;³Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center", Research Institute of Medical Problems of the North, Partizana Zheleznaya Str. 3G, Krasnoyarsk 660022, Russian Federation

Introduction. Some patients after coronary artery bypass grafting (CABG) may be resistant to acetylsalicylic acid (ASA) used as an antiplatelet agent. The mechanisms of this condition are still under discussion. We studied the functional activity of ASA-resistant and -sensitive platelets using a chemiluminescent (CL) analysis.

Methods. 104 patients with chronic coronary disease (CCD) were evaluated. The control group consisted of 30 healthy donors. Blood sampling was performed prior to CABG and at one and 8-10 days after CABG. Platelet aggregation with collagen, adrenaline, and ADP and platelet resistance to ASA were determined by optical aggregometry with arachidonic acid at a level $\geq 20\%$. Spontaneous and ADP-induced CL of platelets with luminol and lucigenin was studied with a biochemiluminescence analyzer.

Results. 71 patients with CCD were found to be sensitive to ASA (sASA) whereas 33 patients were resistant to ASA (rASA). Most of CL indexes were higher in sASA patients than in the control group during the entire observation period; in rASA patients, values of these indexes were at the control level. Pre-CABG values of CL indexes were higher in rASA patients than in sASA patients. Lucigenin-enhanced CL was decreased in rASA patients on the first day after CABG and increased on days 8-10 compared to the pre-operative level. CL indexes positively correlated with platelet aggregation in rASA patients.

Conclusion. The CL method allows assessing the functional activity of platelets in CCD. The study of CL indexes may identify rASC patients before the CABG surgery. The dynamics of CL index values in sASK patients before and after surgery and the absence of such dynamics in patients with rASC suggests that aspirin resistance depends not only on the internal condition of platelets but also on intercellular relations.

Keywords: chronic coronary disease; resistance; acetylsalicylic acid; platelet; chemiluminescence; reactive oxygen species

For citation: Goncharov M.D., Grinshtein Yu.I., Savchenko A.A., Kosinova A.A. Chemiluminescent activity and platelet aggregation in chronic coronary heart disease during the acetylsalicylic acid therapy before and after coronary bypass surgery. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 42-51. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.42-51

Contribution: collection and processing of material, writing text – Goncharov M.D.; research concept and design development, editing – Grinshtein Yu.I.; statistical data processing, editing – Savchenko A.A.; editing – Kosinova A.A.

For correspondence: Maxim D. Goncharov, Doctoral Student, Chair of Therapy, Krasnoyarsk State Medical University; Laboratory Diagnosis Doctor Krasnoyarsk Federal Center for Cardiovascular Surgery (Krasnoyarsk), 45 Karaul'naya str., Krasnoyarsk 660020, Russian Federation, e-mail: adimax07@mail.ru

Acknowledgment. This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, the Government of the Krasnoyarsk Territory, and the Krasnoyarsk Regional Fund of Science (project "Personification of the antiplatelet therapy for patients with coronary heart disease (CHD) based on the level of P-selectin gene expression, intensity of intercellular interaction, and inflammation).

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

Information about the authors:

Goncharov M.D., <https://orcid.org/0000-0001-5583-7412>Grinshtein Yu.I., <https://orcid.org/0000-0002-4621-1618>Savchenko A.A., <https://orcid.org/0000-0001-5829-672x>Kosinova A.A., <https://orcid.org/0000-0002-7412-2516>

Received 14.04.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Известно, что после операции аортокоронарного шунтирования (АКШ), для снижения рисков окклюзии сосудов и шунтов назначают ацетилсалициловую кислоту (АСК) [1]. АСК является одним из наиболее старых и широко используемых антиагрегантов, необратимо блокирует фермент циклооксигеназу-1 (ЦОГ-1)

в тромбоцитах, препятствует их склеиванию и образованию тромбов [2]. Однако применение препаратов АСК не всегда успешно профилактирует возникновение тромбоза шунтов с развитием ишемии миокарда, что обусловлено так называемым феноменом резистентности к АСК [3, 4]. Стандартного метода определения этого явления нет, но многие исследователи

основываются на измерении остаточной активности тромбоцитов после воздействия на них АСК (*in vivo* либо *in vitro*) с помощью агрегометрии с различными индукторами [5, 6]. Из-за вариабельности условий исследования, различий в применяемых анализаторах и реагентах отличаются и данные по количеству резистентных пациентов, от 1% до 50% [7].

При реализации функциональной и регуляторной активности тромбоциты генерируют активные формы кислорода (АФК). Эти молекулы выступают в роли мессенджеров внутри клетки, при межклеточных контактах, выполняют защитную функцию [8, 9]. В состоянии относительного покоя клетки продукция АФК является базовой, а при активации она может значительно изменяться. Для определения уровня и интенсивности синтеза АФК используют метод хемилюминесценции (ХЛ). В реакционную смесь к клеткам добавляют ХЛ индикаторы (например, люминол или люцигенин), которые усиливают сигнал и помогают разграничить первичные и вторичные АФК. Люцигенин не проникает в клетку, взаимодействует только с супероксид анион-радикалом, который относится к первичным формам кислорода, а люминол способен проходить сквозь мембрану клетки, что позволяет ему взаимодействовать со всеми видами АФК [10]. Введение дополнительных модуляторов при проведении ХЛ анализа позволяет оценить функциональные резервы клеток и их физиологическое состояние. Например, добавление к тромбоцитам пациентов с острым коронарным синдромом фактора активации тромбоцитов приводит к увеличению ХЛ с люминолом, также как и добавление АДФ к тромбоцитам здоровых доноров, а исследование базового уровня ХЛ позволяет судить об изначальном состоянии этих клеток [11, 12]. В связи с тем, что ХЛ метод дает возможность оценить функциональный статус тромбоцитов, их потенциал на момент исследования, что зависит от влияния активирующих и ингибирующих эти клетки агентов (в том числе АСК), представляется важным и перспективным исследование продукции АФК тромбоцитами для понимания некоторых механизмов резистентности к АСК.

Цель исследования – изучение функционального состояния тромбоцитов чувствительных и резистентных к действию АСК с помощью ХЛ метода, а также влияния искусственного кровообращения (ИК) при АКШ на показатели ХЛ у пациентов с хронической коронарной болезнью (ХКБ).

Методика

На базе Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии г. Красноярск было обследовано 104 пациен-

та с хронической коронарной болезнью (79 мужчин 25 женщин) в возрасте $61 \pm 5,5$ лет, с II-IV функциональным классом стабильной стенокардии, согласно Канадской классификации, которым показана операция АКШ. Атеросклеротическое поражение коронарных артерий, с наличием гемодинамически значимых стенозов, подтверждалось коронароангиографией. Критериями исключения из обследования являлись хроническая болезнь почек (клубочковая фильтрация по клиренсу креатинина < 60 мм/мин/1,73 м²), печеночная недостаточность, язвенная болезнь желудка и/или 12-перстной кишки в стадии обострения, непереносимость АСК. Минимум за 5 сут до АКШ пациенты прекращали прием АСК, а с первых суток после операции им назначалось 100 мг/сут кишечнорастворимой формы АСК. Забор крови проводили до АКШ на фоне отмены АСК (1-я точка наблюдения), в 1-е сутки после АКШ до терапии (2-я точка наблюдения) и на 8-е – 10-е сут после операции на фоне терапии АСК (3-я точка наблюдения). Контрольную группу составили 30 здоровых доноров.

Определяли резистентность тромбоцитов к АСК в богатой тромбоцитами плазме (центрифугирование крови при 400g в течение 10 мин, используется насадок) на оптическом агрегометре CHRONO-LOG 490. Критерием служил уровень агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой (0,5мМ) $\geq 20\%$ хотя бы в одной точке наблюдения: при инкубации с раствором 3,36 ммоль АСК (Sigma, USA) *in vitro* до операции, в 1-е сут после АКШ и на 8-е – 10-е сут терапии АСК. Также определяли агрегацию тромбоцитов с коллагеном (2 мкг/мл), адреналином (10 мкМ) и АДФ (5 мкМ). Параллельно проводили исследование ХЛ тромбоцитов, выделенных из венозной крови (с 3,2% цитратом натрия в соотношении 9:1) поэтапным центрифугированием [13]. Для исследования ХЛ на анализаторе БЛМ-3607 (ООО «МедБиоТех», Россия) к буферу (130 мМ NaCl, 20 мМ Трис-НCl буфер, 30 мМ Na₂-EDTA, 15 мМ глюкоза, pH 7,4) добавляли 2×10^7 клеток на пробу. В качестве ХЛ индикаторов использовали люцигенин и люминол (Sigma, USA) в концентрациях 50 мкг/мл. Оценивали следующие показатели спонтанной и АДФ-индуцированной ХЛ тромбоцитов (50 мкл 0,1 М АДФ (AppliChem GmbH, Германия)): время выхода на максимум интенсивности (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax) и площадь (S) под кривой ХЛ. Усиление индуцированной ХЛ оценивали соотношением площади под кривой индуцированной (Синд.) к площади под кривой спонтанной (Спонт.) ХЛ и показатель определяли, как индекс активации (ИА) [14].

Исследование было выполнено с учетом информированного согласия испытуемых в соответствии с

Результаты

Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» 1975 г. и ее пересмотренным вариантом 2008 г. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с применением критерия Шапиро-Уилка для $8 \leq n \leq 50$ и с использованием критерия Колмагорова-Смирнова для $n > 50$. Распределение всех выборок в нашем исследовании отличалось от нормального, поэтому в дальнейшем применялись непараметрические критерии. Статистическую обработку данных проводили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Статистическую значимость различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ по Крускалу-Уоллису (Kruskal-Wallis ANOVA test) с последующей обработкой по критерию множественных сравнений (Multiple of mean ranks for all groups). Значимость различий в динамике лечения определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test) и ранговому дисперсионному анализу Фридмана (Friedman ANOVA by Ranks). Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (Spearman rank R). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

При проведении анализа на резистентность тромбоцитов к АСК все пациенты с ХКБ были разделены на 2 основные большие группы: чувствительные к АСК (чАСК) 71 человек, (68,3%) и резистентные к АСК (рАСК) 33 человека (31,7%), что согласуется с рядом данных литературы [15, 16].

Установлены значительные различия в большинстве показателей ХЛ тромбоцитов у пациентов с ХКБ в зависимости от чувствительности к АСК, как до операции АКШ, так и в послеоперационном периоде на фоне терапии АСК. У чАСК пациентов с ХКБ по сравнению с контрольной группой на всем периоде наблюдения (в тех или иных точках) выявляются повышенные уровни I_{max} , S , T_{max} спонтанной и индуцированной ХЛ с люминолом и с люцигенином. У рАСК пациентов с ХКБ наблюдается лишь повышение T_{max} индуцированной ХЛ с люцигенином относительно значений в контрольной группе и только до операции, в остальных точках наблюдения значимых различий обнаружено не было (табл. 1-6).

До операции АКШ у чАСК пациентов с ХКБ значения ХЛ с люцигенином (I_{max} и S индуцированной и T_{max} спонтанной) оказались выше, чем у рАСК (табл. 1). Причем, статистическая значимость различий подтверждается с помощью однофакторного дисперсионного анализа по Крускалу-Уоллису и последующим анализом по критерию множественного сравнения: для T_{max} спонтанной ($N=6,41$, $p=0,041$ без статистической значимости между обследуемыми групп-

Таблица 1

Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люцигенином у пациентов с ХКБ до АКШ [Me (C_{25} – C_{75})]

Показатели	Контроль ($n=30$) 1	чАСК ($n=71$) 2	рАСК ($n=33$) 3
Спонтанная хемилюминесценция			
T_{max} , секунды (с)	213 (80-354);	813 (222-2841); $p_1=0,047$	212 (35-286); $p_2=0,024$
I_{max} , о.е. $\times 10^3$	0,08 (0,07-0,09);	0,12 (0,09-0,50)	0,09 (0,08-0,38)
S , о.е. $\times c \times 10^6$	0,23 (0,19-0,26)	0,30 (0,18-0,79); $p_1=0,038$	0,22 (0,19-0,31)
Индуцированная хемилюминесценция			
T_{max} , с	96 (49-230);	1036 (445-3745); $p_1 < 0,001$	764 (287-1201); $p_1=0,027$
I_{max} , о.е. $\times 10^3$	0,08 (0,07-0,08);	0,13 (0,08-0,43); $p_1=0,006$	0,08 (0,07-0,12); $p_2=0,045$
S , о.е. $\times c \times 10^6$	0,27 (0,18-0,29)	0,41 (0,25-1,11); $p_1=0,038$	0,23 (0,20-0,29); $p_2=0,042$
Синд./Спонт.	1,03 (0,95-1,66)	1,06 (0,89-1,28)	0,96 (0,91-1,15)

Примечание. p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями контрольной группы; p_2 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями чувствительных к АСК пациентов; p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными показателями в данной группе до операции АКШ.

мами), T_{\max} спонтанной ($N=8,03$, $p=0,018$ при значимости между показателями чАСК пациентов и лиц контрольной группы, $p=0,023$), T_{\max} индуцированной ($N=8,37$, $p=0,015$ при значимости различий между показателями чАСК пациентов и лиц контрольной группы, $p=0,012$) и T_{\max} индуцированной ХЛ ($N=11,15$, $p=0,004$ при значимости между показателями чАСК пациентов и лиц контрольной группы $p=0,014$).

Такая же тенденция наблюдается и на 1-е сут после операции, однако только по показателю T_{\max} спонтанной ХЛ с люцигенином (табл. 2), а однофакторный дис-

персионный анализ по Крускалу-Уоллису и последующий анализ критерием множественного сравнения показали значимые различия между группами сравнения по показателям T_{\max} спонтанной ХЛ с люцигенином ($N=9,05$, $p=0,01$ при значимости между показателями чАСК и рАСК пациентов $p=0,023$), T_{\max} спонтанной ($N=7,99$, $p=0,018$ при значимости между показателями чАСК пациентов и лиц контрольной группы, $p=0,015$) и T_{\max} индуцированной ХЛ с люминолом ($N=11,57$, $p=0,003$ при значимости между показателями чАСК пациентов и лиц контрольной группы, $p=0,0025$).

Таблица 2

Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люцигенином у пациентов с ХКБ в первые сутки после АКШ [Me ($C_{25} - C_{75}$)]

Показатели	Контроль (n=30) 1	чАСК (n=71) 2	рАСК (n=33) 3
Спонтанная хемилюминесценция			
T_{\max} , секунды (с)	213 (80-354);	494 (255-2043); $p_1=0,011$	89 (33-203); $p_1=0,048$ $p_2=0,001$
I_{\max} , о.е. $\times 10^3$	0,08 (0,07-0,09)	0,1 (0,08-0,30); $p_1=0,017$; $p_3=0,045$	0,09 (0,09-0,13)
S, о.е. $\times c \times 10^6$	0,23 (0,19-0,26)	0,35 (0,21-0,56); $p_1=0,036$	0,28 (0,21-0,39)
Индуцированная хемилюминесценция			
T_{\max} , с	96 (49-230)	458 (177-985); $p_1=0,014$; $p_3=0,041$	269 (68-404)
I_{\max} , о.е. $\times 10^3$	0,08 (0,07-0,08)	0,1 (0,08-0,45); $p_1=0,049$; $p_3=0,044$	0,08 (0,08-0,10)
S, о.е. $\times c \times 10^6$	0,27 (0,18-0,29)	0,32 (0,21-0,67); $p_1=0,025$	0,23 (0,20-0,31)
Синд./Спонт.	1,03 (0,95-1,66)	1,03 (0,97-1,17)	0,96 (0,91-1,15)

Примечание: то же, что и для табл. 1.

Таблица 3

Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люцигенином у пациентов с ХКБ на 8–10-е сут после АКШ на фоне терапии АСК [Me ($C_{25} - C_{75}$)]

Показатели	Контроль (n=30) 1	чАСК (n=71) 2	рАСК (n=33) 3
Спонтанная хемилюминесценция			
T_{\max} , секунды (с)	213 (80-354)	611 (185-2198); $p_1=0,010$	177 (75-526)
I_{\max} , о.е. $\times 10^3$	0,08 (0,07-0,09);	0,11 (0,09-0,34); $p_1=0,017$	0,09 (0,08-0,12)
S, о.е. $\times c \times 10^6$	0,23 (0,19-0,26)	0,32 (0,20-0,85)	0,30 (0,18-0,35)
Индуцированная хемилюминесценция			
T_{\max} , с	96 (49-230)	1625 (161-3099); $p_1=0,012$	532 (106-1123)
I_{\max} , о.е. $\times 10^3$	0,08 (0,07-0,08);	0,12 (0,09-0,53); $p_1=0,001$	0,10 (0,08-0,12)
S, о.е. $\times c \times 10^6$	0,27 (0,18-0,29)	0,35 (0,28-1,47); $p_1=0,044$	0,32 (0,24-0,36)
Синд./Спонт.	1,03 (0,95-1,66)	1,10 (0,88-1,95)	1,09 (0,95-1,35)

Примечание. То же, что и для табл. 1.

На 8–10-е сут после АКШ на фоне терапии АСК одноклассный дисперсионный анализ по Крускалу-Уоллису и последующий анализ критерием множественного сравнения показали значимые различия между группами сравнения по показателям I_{max} спонтанной ($N=8,08, p=0,017$ при значимости между показателями чАСК пациентов и лиц контрольной группы, $p=0,014$) и I_{max} индуцированной ХЛ с люцигенином ($N=8,02, p=0,018$ при значимости между показателями чАСК пациентов и лиц контрольной группы, $p=0,022$), I_{max} спонтанной ($N=6,7, p=0,035$ при значимости между показателями чАСК пациентов и лиц контрольной группы, $p=0,03$) и I_{max} индуцированной ХЛ с люминолом ($N=10,07, p=0,006$ при значимости между показателями чАСК пациентов и лиц контрольной группы,

$p=0,005$), S спонтанной ХЛ с люминолом ($N=6,93, p=0,031$ при значимости между показателями чАСК пациентов и лиц контрольной группы, $p=0,025$).

Таким образом при множественном сравнении наблюдаются значимые различия по многим показателям ХЛ во всех периодах наблюдения в сравниваемых группах, по большинству параметров значения этих показателей в группе чАСК пациентов оказались выше, чем в контрольной группе.

В группе чАСК пациентов с ХКБ на 1-е сут после операции АКШ наблюдалось снижение ХЛ с люцигенином (T_{max} и I_{max} индуцированной и I_{max} спонтанной), а на 8-е – 10-е сут повышение ХЛ с люминолом (S спонтанной и I_{max} и S индуцированной) по сравнению с начальным уровнем до операции (таблицы 1,

Таблица 4

Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люминолом у пациентов с ХКБ до АКШ [Ме ($C_{25} - C_{75}$)]

Показатели	Контроль (n=30) 1	чАСК (n=71) 2	рАСК (n=33) 3
Спонтанная хемилюминесценция			
T_{max} , секунды, (с)	71 (0-442,7)	229,5 (40,2-1833,5)	71 (70-252)
I_{max} , о.е. $\times 10^3$	0,08 (0,07-0,09)	0,12(0,08-0,55); $p_1=0,026$	0,08 (0,08-0,45)
S , о.е. $\times c \times 10^6$	0,26 (0,22-0,29)	0,29 (0,2-0,95)	0,3 (0,22-0,34)
Индуцированная хемилюминесценция			
T_{max} , секунды, с	154 (0-261)	454,5 (0-1800,25); $p_1=0,011$	71 (65,5-1808,5)
I_{max} , о.е. $\times 10^3$	0,07 (0,07-0,08);	0,113 (0,08-0,5); $p_1=0,01$	0,09 (0,07-0,27)
S , о.е. $\times c \times 10^6$	0,23 (0,2-0,24)	0,3 (0,22-0,88)	0,32 (0,17-0,35)
Синд./ Спонт.	0,96 (0,77-1,18)	0,98 (0,75-1,13)	1,09 (0,78-1,19)

Примечание. То же, что и для табл. 1.

Таблица 5

Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люминолом у пациентов с ХКБ в первые сутки после АКШ [Ме ($C_{25} - C_{75}$)]

Показатели	Контроль (n=30) 1	чАСК (n=71) 2	рАСК (n=33) 3
Спонтанная хемилюминесценция			
T_{max} , секунды, (с)	71 (0-442,7)	141 (0-1107)	389 (12,75-1909)
I_{max} , о.е. $\times 10^3$	0,8 (0,07-0,09)	0,15 (0,086-0,46); $p_1=0,007$	0,12 (0,09-0,63)
S , о.е. $\times c \times 10^6$	0,26 (0,22-0,29)	0,33 (0,22-0,86)	0,34 (0,32-0,73)
Индуцированная хемилюминесценция			
T_{max} , с	154 (0-261)	198 (0-1529)	80 (0-648,5)
I_{max} , о.е. $\times 10^3$	0,07 (0,07-0,08);	0,130 (0,09-0,45); $p_1=0,001$	0,09 (0,08-0,55)
S , о.е. $\times c \times 10^6$	0,23 (0,2-0,24)	0,33 (0,17-1,05)	0,33 (0,31-0,55)
Синд./ Спонт.	0,96 (0,77-1,18)	0,94 (0,83-1,1)	0,88 (0,7-1,07)

Примечание. То же, что и для табл. 1.

2, 4, 6). У рАСК пациентов с ХКБ в динамике различий не было выявлено. Динамика изменений исследуемых показателей на протяжении всего периода исследования также подтверждается методом рангового дисперсионного анализа Фридмана у чАСК пациентов с ХКБ - I_{\max} спонтанной люминол-зависимой ХЛ ($\chi^2=28,53, p<0,001$).

В группе рАСК пациентов с ХКБ до операции АКШ выявлена прямая корреляция между I_{\max} индуцированной ХЛ с люцигенином и люминолом и уровнем агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой ($r=0,85; p=0,004$ и $r=0,72; p=0,026$), а также S индуцированной ХЛ с люцигенином и люминолом и уровнем агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой ($r=0,7; p=0,04$ и $r=0,91; p<0,001$). У этой категории пациентов после операции АКШ наблюдались положительные корреляционные связи показателей спонтанной и индуцированной люминолом и люцигенином ХЛ с уровнем агрегации тромбоцитов с коллагеном, АДФ и адреналином ($r>0,7; p<0,05$). Наличие корреляций между продукцией АФК и агрегацией тромбоцитов с различными индукторами указывает на то, что ХЛ метод отражает активность клеток тромбоцитов в данный момент исследования, по которому можно судить о базовом и потенциальном состоянии тромбоцитов при ХКБ как до, так и после АКШ.

Обсуждение

Вопрос резистентности к АСК остается весьма дискуссионным, так как обнаружено множество возможных факторов влияющих на функциональную активность тромбоцитов, которые можно разделить на кли-

нические, клеточные, генетические. К клиническим факторам относятся нарушение всасываемости и снижение биодоступности АСК, взаимодействие с ибупрофеном, гипергликемия, застойная сердечная недостаточность, системное воспаление, курение, стресс, использование искусственного кровообращения (ИК) во время операции. Клеточные факторы как причина резистентности, это изначально функциональное состояние тромбоцитов, недостаточное угнетение циклооксигеназы (ЦОГ)-1, избыточная экспрессия ЦОГ-2 на мРНК, индуцированная эритроцитами активация тромбоцитов, контакты тромбоцитов с другими клетками крови и эндотелием сосудов, и наконец генетические факторы – полиморфизмы генов ЦОГ-1 и тромбоцитарных рецепторов [17, 18]. В ряде случаев можно свести к минимуму феномен резистентности к АСК, применив определенные действия, в частности сократить время между забором крови и измерением устойчивости тромбоцитов к АСК, увеличив концентрацию АСК в крови, используя таблетки АСК без покрытия, четко соблюдая схемы приема препарата, исключив взаимодействие с ибупрофеном, улучшая состояние мембран тромбоцитов с помощью веществ мембранотропного действия (ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты) [19, 20]. Но, тем не менее, в ряде случаев даже всё вышеперечисленное не приводит к достижению должного эффекта от АСК, резистентность имеет место быть и необходимо контролировать и корректировать данный феномен с целью профилактики нежелательных сосудистых событий.

У чАСК пациентов с ХКБ наблюдается повышенная базовая и АДФ-индуцированная продукция тром-

Таблица 6

Хемилюминесцентная активность тромбоцитов с люминолом у пациентов с ХКБ на 8-10 сутки после АКШ на фоне терапии АСК [Me ($C_{25} - C_{75}$)]

Показатели	Контроль (n=30) 1	чАСК (n=71) 2	рАСК (n=33) 3
Спонтанная хемилюминесценция			
T _{max} , секунды, (с)	71 (0-442,7)	264 (0-1164)	71 (17,75-2754)
I _{max} , о.е. × 10 ³	0,8 (0,07-0,09);	0,14 (0,09-1,253); $p_1=0,001$	0,13 (0,1-1,12)
S, о.е. × с × 10 ⁶	0,26 (0,22-0,29);	0,4 (0,3-2,35); $p_1=0,001; p_3=0,008$	0,32 (0,3-1,79)
Индуцированная хемилюминесценция			
T _{max} , сек.	154 (0-261)	492 (84,5-1876,5); $p_1=0,028$	71 (17,75-2329,75)
I _{max} , о.е. × 10 ³	0,07 (0,07-0,08);	0,18 (0,09-1,57); $p_1=0,001; p_3=0,037$	0,11 (0,09-0,265)
S, о.е. × сек. × 10 ⁶	0,23 (0,2-0,24)	0,41 (0,22-2,27); $p_1=0,037; p_3=0,037$	0,31 (0,23-0,5)
Синд./ Спонт.	0,96 (0,77-1,18)	0,9 (0,62-1,5)	0,91 (0,67-1,01)

Примечание. То же, что и для табл. 1.

боцитами первичных и вторичных АФК до и после операции АКШ, что указывает на высокую активность данных клеток крови, а именно их ферментов, участвующих в синтезе АФК (НАДФН-оксидаза, ЦОГ-1, супероксиддисмутаза, NO-синтаза, миелопероксидаза и др.). При этом, на 1-е сут после оперативного вмешательства уровень спонтанной и АДФ-индуцированной продукции супероксид анион-радикала снижается, что может быть связано с использованием аппарата искусственного кровообращения (ИК). Применение ИК при АКШ сопровождается контактом крови с «неэндотелиальной» поверхностью контура аппарата, использованием нефракционированного гепарина, протамин сульфата, увеличением экспрессии Р-селектина, тромбоцитарного фактора-4, увеличением содержания тромбина, активацией провоспалительных цитокинов, когда происходит снижение активности НАДФН-оксидазы, как основного источника данной АФК [21, 22]. Помимо тромбоцитов, активируются лейкоциты и эндотелиальные клетки из-за контакта крови с инородными поверхностями и воздухом во время ИК, возникает воспалительная реакция, что подтверждается увеличением в послеоперационном периоде продукции IL-6, IL-8, С-реактивного белка, нейтрофильной эластазы, TNF- α [23]. Так как тромбоциты являются активными участниками воспалительных процессов, их контакт в очаге с другими клетками (эндотелиальные клетки, клетки лейкоцитарного ряда) приводит к дополнительной стимуляции, в результате чего они функционально и метаболически истощены в тесте *in vitro* [24]. На 8–10-е сут (данный период совпадает со средней продолжительностью жизни тромбоцитов) активность тромбоцитов восстанавливается, вероятно, в результате поступления в кровяной ток молодых форм с высоким потенциалом, что характеризуется повышенной продукцией всех форм АФК как в спонтанном, так и в АДФ-индуцированном тесте.

Группа рАСК пациентов с ХКБ характеризуется стабильностью по продукции АФК до и после АКШ без значимых изменений в послеоперационном периоде. Только до операции для достижения максимального уровня АДФ-индуцированной продукции супероксид анион-радикала требуется больше времени, по сравнению с контрольной группой (табл. 1), что свидетельствует о пролонгированном периоде активации в связи с рефрактерностью к стимулирующим агентам. Это может быть вызвано резистентностью тромбоцитов не только к АСК, но и другим факторам. «Поломка» и замедление метаболических и регуляторных механизмов в резистентных к АСК тромбоцитах может являться результатом сбоя межклеточных взаимодей-

ствий, в частности с нейтрофилами, которые способны снабжать тромбоциты субстратами (например, арахидоновой кислотой) с помощью микровезикул, а также активировать их на уровне рецепторов [25]. Тромбоцитарные микровезикулы, как дополнительный инструмент обмена информацией, могут содержать митохондрии в активном состоянии с обеспечением клеточного дыхания (являются также источником супероксид анион-радикала) [26]. Для образования микровезикул необходима стимуляция клетки тромбином, медиаторами воспаления, АДФ, воздействием АФК, гипоксией, стрессом [27]. Нейтрофильные микровезикулы могут вызвать повышенную коагуляцию и адгезию тромбоцитов, приводящую к микротромбозам, системному воспалению сосудов [28].

Логично, что любые сбои в рецепторном аппарате, в передаче сигналов и метаболитов между взаимодействующими клетками, особенно при различных патологических состояниях, в том числе и сердечно-сосудистых заболеваниях, оказывают влияние на процессы протекающие как внутри, так и снаружи клетки. Резистентность тромбоцитов обусловлена невосприимчивостью ЦОГ-1 к действию АСК, а с другой стороны, работа ЦОГ-1 по образованию из арахидоновой кислоты тромбоксана А₂ сопровождается работой АФК [29]. Сниженная до АКШ продукция первичных АФК при стимуляции АДФ у рАСК пациентов в сравнении с чАСК подтверждает данное предположение, так как в результате возможного нарушения связи с нейтрофилами (на уровне микровезикул или рецепторного аппарата), выработка АФК и метаболизм арахидоновой кислоты в резистентных тромбоцитах могут быть снижены, а ЦОГ-1, как точка приложения АСК, становится неактуальной у данной категории пациентов.

Заключение

Таким образом, наше исследование подтверждает тот факт, что ХЛ анализ дает возможность оценивать функциональную активность тромбоцитов, а исследование показателей ХЛ тромбоцитов позволяет выявить резистентных к АСК пациентов с ХКБ, готовящихся к операции АКШ. У рАСК пациентов с ХКБ продукция первичных АФК значительно ниже до АКШ, чем у чАСК. У рАСК пациентов с ХКБ уровень ХЛ активность тромбоцитов находится на уровне контрольных значений, причем операция АКШ не оказывает значительного влияния на показатели ХЛ. У чАСК пациентов с ХКБ наблюдается повышенная спонтанная и АДФ-индуцированная ХЛ активность тромбоцитов по сравнению с контрольной группой в до и послеопера-

ционном периоде, со снижением в 1-е сут после АКШ продукции первичных АФК и увеличением на 8 – 10-е сут АКШ первичных и вторичных АФК по сравнению с исходными значениями до операции. Наличие динамических изменений в показателях ХЛ чувствительных к АСК тромбоцитов до и после АКШ и отсутствие такового у резистентных к АСК тромбоцитов позволяет сделать предположение о различиях в метаболическом статусе чувствительных и резистентных к АСК тромбоцитов, что может лежать в основе резистентности последних к АСК. При этом нельзя исключить роль межклеточного взаимодействия тромбоцитов в генезе недостаточного ответа тромбоцитов на АСК. Изучение возможных механизмов данного явления на межклеточном уровне перспективно в плане поиска методов преодоления невосприимчивости тромбоцитов к АСК.

Литература

(п.п. 2; 3; 15; 17; 19; 21; 23; 23; 29 см. References)

1. Жердев Н.Н. Рекомендации ESC/EACTS по реваскуляризации миокарда 2018. Адаптированный перевод на русский язык: Российское кардиологическое общество. *Российский кардиологический журнал*. 2019; 24(8): 151-226.
4. Гринштейн И.Ю., Савченко А.А., Гринштейн Ю.И., Савченко Е.А., Петрова М.М. Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ тромбоцитов у аспирирезистентных больных стабильной стенокардией. *Сибирское медицинское обозрение*. 2013; 3: 33-6.
5. Гринштейн Ю.И., Савченко Е.А., Филоненко И.В., Гринштейн И.Ю., Савченко А.А. Зилт у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий после аортокоронарного шунтирования. Предварительные результаты открытого, рандомизированного, сравнительного исследования ЗЕВС. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2008; 7(6): 43-9.
6. Политидис Р.Р., Лянг О.В., Кобелевская Н.В., Огурцов П.П., Кочетов А. Г. Клинические и лабораторные предикторы развития агрегационной аспирирезистентности у больных с ИБС. *Вестник последилового медицинского образования*. 2017; 4: 55-63.
7. Комаров А.Л., Панченко Е.П. Тестирование функции тромбоцитов для оценки риска тромбозов и кровотечений у больных ИБС, получающих антиагреганты. *Российский кардиологический журнал*. 2015; 3(119): 25-34.
9. Пожилова Е.В., Новиков В.Е., Левченкова О.С. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2015; 14(2): 13-22.
10. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов. *Биофизика*. 2011; 56(6): 1081–90.
11. Кривохижина Л.В., Кантюков С.А., Ермолаева Е.Н., Кривохижин Д.Н. Хемилюминесценция тромбоцитов. Использование метода хемилюминесценции для определения активности тромбоцитов. *Вестник Тюменского государственного университета. Медико-биологические науки*. 2013; 6: 174-81.
12. Рыжкова Е.В., Рязанкина Н.Б., Лебедева А.М., Албакова Т.М., Албакова Р.М., Габбасов З.А. и др. Хемилюминесценция тромбоцитов и эндотелиальная дисфункция у пациентов с острым инфарктом миокарда. *Креативная кардиология*. 2016; 10(3): 195-200.
13. Савченко Е.А., Савченко А.А., Герасимчук А.Н., Грищенко Д.А. Оценка метаболического статуса тромбоцитов в норме и при ишемической болезни сердца. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2006; 5: 33-6.
14. Савченко А.А., Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Гвоздев И.И., Монгуш Т.С., Косинова А.А. Анализ синтеза активных форм кислорода тромбоцитами больных ишемической болезнью сердца с помощью хемилюминесцентного метода. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020; 169(4): 525-8.
16. Гринштейн И.Ю., Савченко А.А., Гринштейн Ю.И., Савченко Е.А. Метаболические особенности тромбоцитов у больных стабильной стенокардией, резистентных и чувствительных к аспирину. *Креативная кардиология*. 2014; 8(1): 15-24.
18. Коронарное шунтирование: исходы и эффективность антитромбоцитарной терапии. *Креативная кардиология*. 2020; 14(2): 138-49.
20. Пучиньян Н.Ф., Фурман Н.В., Малинова Л.И., Долотовская П.В. Проблема контроля эффективности антитромбоцитарной терапии в кардиологической практике. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2017; 13(1): 107-15.
22. Корнев В.И., Шелухин Д.А. Гемостаз при мининвазивном искусственном кровообращении. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2019; 23(3): 84-97.
25. Свиридова С.П., Соменова О.В., Кашия Ш.Р., Обухова О.А., Сотников А.В. Роль тромбоцитов в воспалении и иммунитете. *Исследования и практика в медицине*. 2018; 5(3): 40-52.
26. Пинегин Б.В., Воробьева Н.В., Пашенков М.В., Черняк Б.В. Роль митохондриальных активных форм кислорода в активации врожденного иммунитета. *Иммунология*. 2018; 39(4): 221-9.
27. Момот А.П., Царигородцева Н.О., Фёдоров Д.В., Бишевский К.М., Вострикова Н.В., Климова Е.Е. Тромбоцитарные микровезикулы и их роль в обеспечении гемостатического потенциала (обзор литературы). *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40(2): 4-14.
28. Маркова К.Л., Коган И.Ю., Шевелева А.Р., Михайлова В.А., Сельков С.А., Соколов Д.И. Микровезикулы лейкоцитарного происхождения. *Вестник РАМН*. 2018; 73(6): 378-87.

References

1. Zherdev N.N. ESC/EACTS recommendations for myocardial revascularization 2018. Adapted translation into Russian: Russian Society of Cardiology. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2019; 24(8): 151-226. (in Russian)
2. Wang M.M., Xue M., Xu Y.G., Miao Y., Kou N., Yang L., et al. Panax notoginseng saponin is superior to aspirin in inhibiting platelet adhesion to injured endothelial cells through COX pathway in vitro. *Thrombosis research*. 2016; 141: 146-52.
3. Macchi L., Sorel N., Christiaens L. Aspirin resistance: definitions, mechanisms, prevalence, and clinical significance. *Current pharmaceutical design*. 2006; 12(2): 251-8.
4. Grinshtein I.Yu., Savchenko A.A., Grinshtein Yu.I., Savchenko E.A., Petrova M.M. Activity of NAD- and NADP-dependent platelet dehydrogenases in aspirin-resistant patients with stable angina pectoris. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie*. 2013; 3: 33-6. (in Russian)
5. Grinshtein Yu.I., Savchenko E.A., Filonenko I.V., Grinshtein I.Yu., Savchenko A.A. Zyllt in coronary atherosclerosis patients after coronary artery bypass graft surgery. Preliminary results of an open, ran-

- domized, comparative ZEUS Study. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2008; 7(6): 43-9. (in Russian)
6. Politidis R.R., Lyang O.V., Kobelevskaya N.V., Ogurtsov P.P., Kochetov A. G. Clinical and laboratory predictors of the development of aggregation aspirin resistance in patients with coronary artery disease. *Vestnik posle diplomnogo meditsinskogo obrazovaniya*. 2017; 4: 55-63. (in Russian)
 7. Komarov A.L., Panchenko E.P. Testing platelet function to assess the risk of thrombosis and bleeding in patients with coronary artery disease receiving antiplatelet drugs. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2015; 3(119): 25-34. (in Russian)
 8. Zhang P., Du J., Zhao L., Wang X., Zhang Y., Yan R., et al. The role of intraplatelet reactive oxygen species in the regulation of platelet glycoprotein Iba ectodomain shedding. *Thrombosis research*. 2013; 132(6): 696-701.
 9. Pozhilova E.V., Novikov V.E., Levchenkova O.S. Reactive oxygen species in cell physiology and pathology. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoy meditsinskoy akademii*. 2015; 14(2): 13-22. (in Russian)
 10. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmaylov D.Yu. Kinetic chemiluminescence as a method for studying the reactions of free radicals. *Biofizika*. 2011; 56(6): 1081-90. (in Russian)
 11. Krivokhizhina L.V., Kantyukov S.A., Ermolaeva E.N., Krivokhizhin D.N. Platelet chemiluminescence. Using the chemiluminescence method to determine the activity of platelets. *Vestnik Tyumenskogo gosudarstvennogo universiteta. Mediko-biologicheskie nauki*. 2013; 6: 174-81. (in Russian)
 12. Ryzhkova E.V., Ryazankina N.B., Lebedeva A.M., Albakova T.M., Albakova R.M., Gabbasov Z.A., et al. Platelet chemiluminescence and endothelial dysfunction in patients with acute myocardial infarction. *Kreativnaya kardiologiya*. 2016; 10(3): 195-200. (in Russian)
 13. Savchenko E.A., Savchenko A.A., Gerasimchuk A.N., Grishchenko D.A. Assessment of the metabolic status of platelets in health and in ischemic heart disease. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2006; 5: 33-6. (in Russian)
 14. Savchenko A.A., Goncharov M.D., Grinshtein Yu.I., Gvozdev I.I., Mongush T.S., Kosinova A.A. Analysis of the active oxygen form synthesis by thrombocytes of patients with ischemic heart disease by the chemiluminescent method. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2020; 169(4): 525-8. (in Russian)
 15. Lev E.I. Aspirin resistance: transient laboratory finding or important clinical entity? *Journal of the American college of cardiology*. 2009; 53(8): 678-80.
 16. Grinshtein I.Yu., Savchenko A.A., Grinshtein Yu.I., Savchenko E.A. Platelet metabolic features in patients with stable angina regarding aspirin resistant. *Kreativnaya kardiologiya*. 2014; 8(1): 15-24. (in Russian)
 17. Wang T.H., Bhatt D.L., Topol E.J. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *European Heart Journal*. 2006; 27(6): 647-54.
 18. Grinshtein Yu.I., Kosinova A.A., Mongush T.S., Goncharov M.D. Bypass grafting: outcomes and efficiency of antiplatelet treatment. *Kreativnaya kardiologiya*. 2020; 14(2): 138-49. (in Russian)
 19. Grosser T., Fries S., Lawson J.A., Kapoor S., Grant G., FitzGerald G. Drug resistance and pseudoresistance: an unintended consequence of enteric coating aspirin. *Circulation*. 2013; 127(3): 377-85.
 20. Puchin'yan N.F., Furman N.V., Malinova L.I., Dolotovskaya P.V. The problem of monitoring the effectiveness of antiplatelet therapy in cardiological practice. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2017; 13(1): 107-15. (in Russian)
 21. Bauer A., Hausmann H., Schaarschmidt J., Scharpenberg M., Troitzsch D., Johansen P. et al. Shed-blood-separation and cell-saver: an integral part of MiECC? Shed-blood-separation and its influence on the perioperative inflammatory response during coronary revascularization with minimal invasive extracorporeal circulation systems a randomized controlled trial. *Perfusion*. 2018; 33(2): 136-47.
 22. Kornev V.I., Shelukhin D.A. Haemostasis and minimally invasive extracorporeal circulation. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. 2019; 23(3): 84-97. (in Russian)
 23. Elçi M.E., Kahraman A., Mutlu E., İspir C.S. Effects of minimal extracorporeal circulation on the systemic inflammatory response and the need for transfusion after coronary bypass grafting surgery. *Cardiology research and practice*. 2019; 2019: 1-8.
 24. Jenne C.N., Urrutia R., Kubus P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *International journal of hematology*. 2013; 35(3): 254-61.
 25. Sviridova S.P., Somonova O.V., Kashiya Sh.R., Obukhova O.A., Sotnikov A.V. The role of platelets in inflammation and immunity. *Issledovaniya i praktika v meditsine*. 2018; 5(3): 40-52. (in Russian)
 26. Pinegin B.V., Vorob'eva N.V., Pashchenkov M.V., Chernyak B.V. The role of mitochondrial reactive oxygen species in activation of innate immunity. *Immunologiya*. 2018; 39(4): 221-9. (in Russian)
 27. Momot A.P., Tsarigorodtseva N.O., Fedorov D.V., Bishevskiy K.M., Vostrikova N.V., Klimova E.E. Platelet microvesicles and their role in providing hemostatic potential (literature review). *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*. 2020; 40(2): 4-14. (in Russian)
 28. Markova K.L., Kogan I.Yu., Sheveleva A.R., Mikhaylova V.A., Sel'kov S.A., Sokolov D.I. Microvesicles of leukocyte origin. *Vestnik RAMN*. 2018; 73(6): 378-87. (in Russian)
 29. Xiao Y., Gu Y., Purwaha P. Characterization of free radicals formed from COX-catalyzed DGLA peroxidation. *Free radical biology and medicine*. 2011; 50(9): 1163-70.

Сведения об авторах:

Гончаров Максим Дмитриевич, соискатель, каф. терапии Института последипломного образования, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого; врач клинической лабораторной диагностики клиничко-диагностической лаб. ФЦССХ, e-mail: adimax07@mail.ru;

Гринштейн Юрий Исаевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. терапии Института последипломного образования, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого;

Савченко Андрей Анатольевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. физиологии им. проф. А.Т. Пшоники, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, руководитель лаб. клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера»;

Косинова Александра Александровна, канд. мед. наук, ассистент, каф. терапии Института последипломного образования, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

© Коллектив авторов, 2021

УДК 612.115.3

Ляпина Л.А.¹, Мясоедов Н.Ф.², Шубина Т.А.¹, Андреева Л.А.², Оберган Т.Ю.¹, Григорьева М.Е.¹

Сравнительное действие пептида Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro, варфарина и ацетилсалициловой кислоты при интрагастральном введении на параметры гемостаза и уровень глюкозы крови на фоне развития метаболического синдрома у крыс

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
119234, Москва, Россия Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²ФГБУН Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт»,
123182, Москва, Россия, площадь акад. Курчатова, д. 2

Введение. Препараты разной структуры – углеводной, пептидной, белковой оказывают значительный противосвертывающий эффект в кровотоке с одновременным улучшением углеводного обмена.

Цель – изучение в сравнительном аспекте влияния препаратов разной структуры (пептида, производного диоксикумарина и ацетилсалициловой кислоты –АСК) на свертывание крови, изменение углеводного обмена при интрагастральном способе их введении крысам.

Методика. Использовались стандартные коагулологические методы и способы определения уровня глюкозы крови крыс. Каждый из препаратов (пептид Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro, варфарин и АСК) вводили лабораторным крысам Wistar интрагастрально в эффективной дозе (100 мкг/кг – пептид и варфарин и 1 мг/кг – АСК) в течение 7 сут на фоне развития метаболического синдрома, индуцируемого высококалорийной диетой (ВКД). Определения производили через 20 и 168 ч после последнего введения препаратов при продолжающемся постоянном кормлении крыс ВКД.

Результаты. Установлено, что как через 20 ч, так и через 168 ч после последнего введения пептида и АСК агрегация тромбоцитов имела тенденцию к снижению и составляла 72-76% (через 20 ч) и 81-66,7% (через 168 ч); фибринолиз статистически значимо повышался при действии пептида на 61-180%, АСК – на 15-41%, варфарина – на 14-34%; активированное частичное тромбопластиновое время значимо удлинялось под влиянием пептида и варфарина на 24-52 и 31-52% соответственно; свертывание крови по тесту протромбинового времени снижалось только под влиянием варфарина (на 12.3%); уровень глюкозы крови нормализовался под влиянием всех использованных препаратов и составлял 4,9–6,5 ммоль/л против 8.1-8.8 ммоль/л при метаболическом синдроме.

Заключение. При сравнении действия пептида, варфарина и АСК установлены гипокоагуляционные и гипогликемические эффекты в разной степени. Максимальным антикоагулянтным и фибринолитическим действием обладал пептид; варфарин проявлял антикоагулянтное действие только по тесту протромбинового времени, ацетилсалициловая кислота обладала антитромбоцитарным и фибриндеполимеризационным действием.

Ключевые слова: варфарин; регуляторный пептид лизин- и аргинин-содержащий; ацетилсалициловая кислота; система гемостаза; глюкоза крови

Для цитирования: Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Шубина Т.А., Андреева Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е. Сравнительное действие пептида Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro, варфарина и ацетилсалициловой кислоты при интрагастральном введении на параметры гемостаза и уровень глюкозы крови на фоне развития метаболического синдрома у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; (65): 52-59.
DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.52-59

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Мясоедов Н.Ф., написание текста – Ляпина Л.А., редактирование – Андреева Л.А., определение параметров – Шубина Т.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Ляпина Людмила Анисимовна, e-mail: lyapinal@mail.ru

Финансирование. Финансовая поддержка гранта РФФИ № 18-04-00260.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.07.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Lyapina L.A.¹, Myasoedov N.F.², Shubina T.A.¹, Andreeva L.A.², Obergan T.Yu.¹, Grigorieva M.E.¹**Comparative effects of intragastric Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro peptides, warfarin, and acetylsalicylic acid on hemostasis indexes and blood glucose in development of metabolic syndrome in rats**¹M.V. Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gory 1, Bld. 12, Moscow, 119234, Russia;²Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences,
Ploshchad Akad. Kurchatova 2, Moscow 123182, Russia

Drugs with different structure, carbohydrates, peptides, and proteins, can produce a significant anticoagulation effect and simultaneously improve carbohydrate metabolism. The aim of this study was to compare effects of drugs with different structure, a peptide, a dioxycoumarin derivative, and acetylsalicylic acid (ASA), on coagulation and changes of carbohydrate metabolism in intragastric administration to rats.

Methods. Standard methods for studying coagulation and measuring blood glucose in rats were used. Each of the study drugs (Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro peptide, warfarin, and ASA) was administered to Wistar rats intragastrically at an effective dose (100 mcg/kg for the peptide and warfarin and 1 mg/kg for ASA) for 7 days during the development of metabolic syndrome (MS) induced by a high-calorie diet (HCD). Measurements were performed at 20 and 168 h after the last administration of the drugs with continuing HCD.

Results. Both at 20 and 168 h after the last administration of the peptide and ASA, platelet aggregation showed a tendency to a decrease and was 72-76% (at 20 h) and 81-66.7% (at 168 h); fibrinolysis significantly increased under the action of the peptide, ASA, and warfarin by 61-180%, 15-41%, and 14-34%, respectively. Activated partial thromboplastin time significantly increased under the action of the peptide and warfarin by 24-52% and 31-52%, respectively; blood clotting as estimated in the prothrombin time test decreased only under the action of warfarin by 12.3%; blood glucose returned to a normal level under the action of each of the three study drugs and was 4.9-6.5 mmol/l vs. 8.1-8.8 mmol/l in MS.

Conclusion. The peptide, warfarin, and ASA produced different degrees of the anticoagulation and hypoglycemic effects. The peptide had the strongest anticoagulation and fibrinolytic effects, warfarin produced an anticoagulant effect only according to the prothrombin time test, and acetylsalicylic acid exerted both antiplatelet and fibrin-depolymerizing effects.

Keywords: warfarin; lysine-and arginine-containing regulatory peptide; acetylsalicylic acid; hemostasis system; blood glucose

For citation: Lyapina L.A., Myasoedov N.F., Shubina T.A., Andreeva L.A., Obergan T.Yu., Grigorieva M.E. Comparative effects of intragastric Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro peptides, warfarin, and acetylsalicylic acid on hemostasis indexes and blood glucose in development of metabolic syndrome in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 52-59. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.52-59

Contribution: study concept and design – Myasoedov N.F.; text writing – Lyapina L.A.; editing – Andreeva L.A.; measurements – Shubina T.A., Obergan T.Yu., Grigorieva M.E. All authors approved the final version of the article and are responsible for the integrity of all its parts.

For correspondence: Lyapina Lyudmila Anisimovna, e-mail: lyapinal@mail.ru

Acknowledgment. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research grant #18-04-00260.

Conflict of interest. The authors declare that there are no conflicts.

Information about the authors:

Lyapina L.A., <http://orcid.org/0000-0002-8983-652X>
Myasoedov N.F., <http://orcid.org/0000-0003-1294-102X>
Shubina T.A., <http://orcid.org/0000-0003-1092-8382>
Andreeva L.A., <http://orcid.org/0000-0002-3927-8590>
Obergan T.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-3760-3943>
Grigorjeva M.E., <http://orcid.org/0000-0003-0469-3943>

Received 08.07.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Известно, что препараты разной структуры проявляют в организме противосвертывающие эффекты. К ним могут относиться регуляторные пептиды глипролинового ряда [1], не прямые оральные антикоагулян-

ты (НОАК) [2] и ингибитор агрегации тромбоцитов – ацетилсалициловая кислота (АСК), или аспирин [3]. В то же время механизмы противосвертывающего действия в организме этих препаратов различны.

Не прямые антикоагулянты, например, варфарин, являются антагонистами витамина К и ингиби-

руют факторы протромбинового комплекса крови. Это факторы свертывания (II, VII, IX, X), а также протеины С и S, синтезирующиеся в печени, приобретают биологическую активность лишь после реакции γ -карбоксилирования, вследствие чего обеспечивается их способность связывать Ca^{2+} с последующей сборкой активного каталитического комплекса на мембранах. Терапевтические дозы варфарина снижают содержание всех витамин-К-зависимых факторов свертывания на 30–50% [4]. После назначения пациентам препаратов НОАК время достижения постоянной активности каждого фактора определяется их периодом полураспада – $T_{1/2}$ (у фактора VII – 6 ч, IX – 24 ч, X – 36 ч, протромбина – 50 ч, протеина С – 8 ч, протеина S – 30 ч). Благодаря большому $T_{1/2}$ некоторых факторов свертывания (особенно протромбина) антикоагулянтное действие варфарина достигает максимума лишь через несколько суток после начала лечения, хотя протромбиновое время (ПВ) удлиняется гораздо раньше из-за распада факторов с меньшим $T_{1/2}$. На все витамин-К-зависимые факторы свертывания варфарин действует одинаково, хотя его антикоагулянтное действие обычно оценивают по активности протромбина и, в меньшей степени, фактора Ха [5, 6].

Об эффективности антиагрегантного по отношению к тромбоцитам агента – АСК в организме получены убедительные доказательства того, что в малых дозах этот препарат значительно снижает риски сосудистых событий: инфаркта миокарда на 22%, инсульта – на 5%. Во вторичной профилактике этот препарат уменьшает риск повторных инфарктов и инсультов в еще большей степени (на 22–46%). Это обусловлено тем, что АСК как антитромбоцитарное средство ингибирует производство тромбоксана, который в нормальных условиях связывает молекулы тромбоцитов и покрывает поврежденные стенки кровеносных сосудов [3]. Активный компонент АСК был впервые обнаружен в коре ивы в 1763 г. Эдвардом Стоуном из Уэдхем-Колледжа, Оксфорд. АСК применяется для устранения целого ряда симптомов, и лечения воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, перикардит и болезнь Кавасаки, а также опухолевых процессов. Аспирин входит в группу препаратов под названием «нестероидные противовоспалительные препараты» (НПВП). Хотя аспирин и препараты с аналогичной структурой действуют подобно другим НПВП (проявляя жаропонижающее, противовоспалительное, обезболивающее действия) и ингибируют фермент циклооксигеназу (ЦОГ), аспирин отличается от них тем, что действует необратимо. Механизм действия АСК заключается в том, что он подавляет актив-

ность ЦОГ – фермента, регулирующего превращение арахидоновой кислоты в простагландины (ПГ), простациклин (ПГ₂) и тромбоксан (ТхА₂) [7]. При приеме внутрь АСК полностью абсорбируется из желудочно-кишечного тракта и подвергается системной элиминации в стенке кишечника и в печени (деацетируется). Метаболизируется она преимущественно в печени с образованием метаболитов, обнаруживаемых во многих тканях и моче, а выводится преимущественно через почки в неизменной форме (60%) и в виде метаболитов [8].

Пептиды глипролинового ряда, т.е. содержащие группировку Pro-Gly-Pro (PGP), обладают эндотелий-зависимой реакцией экскреции в кровотоке тканевого активатора плазминогена, который активно участвует в процессах ферментативного фибринолиза. Эти пептиды оказывают антитромбоцитарный и антикоагулянтный эффекты в организме. Доказана защитная роль указанных регуляторных пептидов при нарушениях ряда систем организма – гемостаза, углеводного и липидного обмена веществ [1].

Ранее было установлено, что при развитии у человека и животных метаболического синдрома (МС) страдают регуляторные взаимоотношения между свертывающей и противосвертывающей системами, нарушается нормальное функционирование сосудистого эндотелия, поджелудочной железы, других органов и систем организма [1, 9, 10].

Цель настоящей работы заключалась в выявлении сравнительных эффектов 3 веществ – пептида глипролинового ряда Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro (KRRKPGP), непрямого антикоагулянта варфарина и антиагреганта ацетилсалициловой кислоты (АСК) при их пероральном введении животным на параметры гемостаза и уровень глюкозы крови на фоне развития МС.

Методика

В работе применялись пептид Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro (KRRKPGP), синтезированный в Институте молекулярной генетики РАН (Москва), и коммерческие препараты АСК (степень чистоты – 98%) производства Хэбэй Цзихэн (Груп) Фармасьютикал Ко. Лтд (Китай) и варфарина производства Такеда Фарма А/С (Польша). Препараты для введения крысам готовили ежедневно в необходимых концентрациях, используя в качестве растворителя 0,85%-й NaCl.

В экспериментах, проведенных с соблюдением этических правил, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, применяемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 15.06.2006), были использованы крысы-самцы Wistar массой тела

300–400 г. Животных содержали в пластиковых клетках в стандартных лабораторных условиях при искусственном освещении (12 ч/12 ч – светлое/темное время суток), принудительной 12-кратной в час вентиляции, температуре 22–26 °С и относительной влажности 50–70%. Животные имели свободный доступ к питью и пище.

Для индуцирования метаболических нарушений использовали высококалорийную диету (ВКД), энергетическая ценность которой составляла не менее 3500 ккал/кг [1]. ВКД включала избыток углеводов, холестерина и насыщенных жирных кислот и содержала жир свиной (15%), манную кашу на молоке (30%), муку пшеничную и хлеб (15%), сахарный песок (5%), животные жиры (маргарин с гидрогенизированными жирами, майонез, сыр) (25%), стандартный гранулированный комбикорм фирмы «Лабораторкорм» (10%). В качестве питья животные получали 10%-ый раствор глюкозы (в среднем 30 мл в сутки на одну крысу). Дополнительно в клетку помещали поилку с обычной водой для исключения дегидратации.

Животные были разделены на 4 группы – получавшие пептид (группа 1), или препарат варфарина (группа 2) в ежедневной дозе 100 мкг/кг массы тела, или АСК (группа 3) в ежедневной дозе 1 мг/кг. Все препараты вводили интрагастрально через зонд один раз в сутки (каждые 24 ч) в течение 7 сут. Животные 4-й группы, как и животные 1-й, 2-й и 3-й групп находились постоянно на ВКД. Интактные крысы 5-й группы – (группа «Норма») содержались на стандартном гранулированном комбикорме «Лабораторкорм» (калорийность 2950 ккал/кг) и не получали никаких препаратов. Кровь на исследование брали у животных из *v. jugularis* с использованием в качестве консерванта 3,8%-го цитрата натрия через 20 ч после 7-го (последнего) введения исследуемых препаратов и спустя 7 сут после отмены их введения при продолжающемся кормлении крыс ВКД. В эти периоды брали кровь аналогично и у контрольных крыс (4-я группа) и крыс группы «Норма» (5-я группа).

В плазме крови оценивали фибринолиз по следующим тестам: суммарной (СФА), неферментативной (или фибриндеполимеризационной – ФДПА), ферментативной (ФФ) фибринолитической активности, активности тканевого активатора плазминогена (ТАП), времени лизиса эуглобулинового сгустка (ВЛЭС); изменение свертывания крови по тестам: активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), тромбоинового времени (ТВ); агрегацию тромбоцитов, индуцированную 10^{-6} М АДФ (АТ), концентрацию фибриногена по Клауссу (Ф) и активность фактора XIIIa [11]. Уровень глюкозы в крови определяли на биохимическом анализаторе One Touch Horizon (США) с ис-

пользованием специальных тест-полосок для данного прибора.

Статистический анализ данных осуществляли, используя пакет статистических программ Statistica 8 (StatSoft Inc., США), а также графических программ Microsoft Excel. Эмпирические распределения проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для попарного сравнения независимых групп применяли непараметрический критерий Манна Уитни. Полученные данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

В первой серии экспериментов при развитии МС (1–3-я группы) через 20 ч после 7-го (последнего) введения препаратов установлено, что агрегация тромбоцитов имела тенденцию к снижению при действии всех исследуемых препаратов. Антикоагулянтная активность по тесту АЧТВ возрастала под влиянием пептида и варфарина на 24–52%, по тесту протромбинового времени (ПВ) – только под влиянием варфарина (на 12%). Фибринолиз увеличивался в разной степени по тестам суммарной и фибриндеполимеризационной (ФДП) активности при действии всех препаратов, а по активности тканевого активатора плазминогена (ТАП) – только под влиянием пептида и варфарина. Отмечалось подавление активности свертывающего фактора XIIIa под влиянием всех трех препаратов. При этом наблюдалось снижение концентрации глюкозы крови на 35–44% под влиянием всех препаратов по сравнению с контрольной (4-й) группой животных. Наибольший эффект по параметрам гемостаза и уровню глюкозы крови (**табл. 1**) установлен при введении пептидного препарата.

Сходная картина отмечалась и через 7 сут после отмены введения препаратов на фоне продолжающегося кормления крыс ВКД. В этих условиях агрегация тромбоцитов после введения пептида и варфарина имела тенденцию к снижению (на 14–19%), а после введения АСК снижение было статистически значимым – на 31.3% по сравнению с контролем. Антикоагулянтная активность по тесту АЧТВ была удлинена только после отмены введения варфарина (на 31.5%); СФА оставалась повышенной после введения пептида и АСК на 41–61%, ФДПА – на 42–55%, а ФФ был статистически значимо повышен при действии всех трех препаратов, то есть наблюдался отдаленный эффект по ФФ. Об этом же свидетельствуют параметры ВЛЭС и ТАП. Активность фактора XIIIa оставалась значимо сниженной только после воздействия пептида. Уровень глюкозы в этот период был снижен после воздей-

ствия всех трех препаратов по сравнению с показателем группы контроля (табл. 2).

Обсуждение

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить взаимосвязь между веществами с разной химической структурой и их влиянием на восстановление состояния системы гемостаза и углеводного обмена. Установлено, что при развитии нарушений липидного обмена, осложняющегося тромбозами, аргинин- и лизинсодержащий пептид KRRKPGP, как и другие ранее исследованные пептидные препараты глипролинового ряда [1], проявлял антикоагулянтный, фибринолитический и антитромбоцитарный эффекты и усиливал активность тканевого активатора плазминогена, включаясь в процессы фибринолиза и сосудисто-эндотелиальной функции. Наши данные согласуются с исследованиями, показавшими, что использование жировой диеты в течение 3 мес вызывало непереносимость глюкозы [12]. Эти исследователи, рассматривая

жировую ткань в качестве эндокринного органа, отмечают, что ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1) выделяется в кровоток параллельно с увеличением жировой массы, и он функционирует как важнейший адипокин, который отрицательно влияет на физиологический метаболизм и функционирование сосудов. Повышенные уровни PAI-1 индуцируют инсулинорезистентность, метаболические нарушения, хроническое воспаление и приводят к расстройству фибринолиза через дизрегуляцию процессов свертываемости крови, эндотелиальную дисфункцию и метаболические нарушения. Мы полностью согласны с вышевысказанными соображениями [12], так как в наших экспериментах при моделировании МС снижалась активность тканевого активатора плазминогена, что, возможно, и приводило к увеличению ингибиторов фибринолиза с последующим развитием инсулинорезистентности и ингибированием фибринолиза, а также к дисфункции эндотелия.

Таблица 1

Изменение параметров гемостаза, уровня глюкозы через 20 ч после 7-кратного интрагастрального введения пептида KRRKPGP, варфарина в ежедневной дозе 100 мкг/кг и АСК в ежедневной дозе 1 мг/кг массы тела крыс при развитии метаболического синдрома (МС)

Параметры	Контроль (МС)	Введение пептида KRRKPGP	Введение варфарина	Введение АСК	Норма (здоровые крысы)
Агрегация тромбоцитов, (индекс, %)	2.5 ± 0.6 (100%)	1.8 ± 0.3 (72%)	2.3 ± 0.4 (92%)	1.9 ± 0.3 (76%)	1.5 ± 0.3* (60%)
АЧТВ (с, %)	31.8 ± 2.5 (100%)	39.5 ± 1.2* (124%)	48.4 ± 1.8** (152%)	32.5 ± 2.4 (102%)	36.6 ± 4.2 (115%)
Протромбиновое время (с, %)	20.3 ± 1.2 (100%)	19.4 ± 1.5 (95.5%)	22.8 ± 1.0* (112.3%)	21.6 ± 2.0 (106.4%)	34.8 ± 2.1** (171%)
Активность фактора XIIIa (усл. ед., %)	86.7 ± 2.5 (100%)	56.0 ± 1.9** (64%)	68.8 ± 1.0** (79%)	63.0 ± 2.5** (72%)	65.0 ± 2.9** (75%)
Суммарная фибринолитическая активность (мм ² , %)	19.6 ± 0.9 (100%)	39.4 ± 1.5** (206%)	21.8 ± 1.1 (114%)	22.4 ± 1.3 (115%)	32.5 ± 0.5** (166%)
Фибриндеполимеризационная активность (мм ² , %)	14.2 ± 0.7 (100%)	24.2 ± 1.3** (170%)	15.6 ± 1.8 (109%)	18.0 ± 2.1** (126%)	22.7 ± 0.5** (160%)
Ферментативный фибринолиз (мм ² , %)	5.4 ± 0.5 (100%)	15.2 ± 1.2** (280%)	6.2 ± 0.9 (114%)	4.4 ± 0.7 (81%)	9.7 ± 0.7** (180%)
Время лизиса эуглобулинового сгустка (мин, %)	103.8 ± 2.5 (100%)	88.0 ± 2.7** (85%)	73.0 ± 2.7** (70%)	71.2 ± 1.6** (69%)	71.6 ± 2.8** (69%)
Активность тканевого активатора плазминогена (мм ² , %)	32.2 ± 1.9 (100%)	44.0 ± 3.7* (137%)	75.2 ± 4.9** (234%)	24.4 ± 6.8 (76%)	51.7 ± 1.5** (161%)
Активность плазмينا (мм ² , %)	30.0 ± 3.5 (100%)	16.8 ± 1.1* (56%)	9.0 ± 0.7** (30%)	19.5 ± 1.1* (65%)	28.3 ± 2.8 (94%)
Уровень глюкозы (ммоль/л, %)	8.8 ± 0.7 (100%)	5.7 ± 0.3** (65%)	5.7 ± 0.4** (65%)	4.9 ± 0.6** (56%)	4.2 ± 0.06** (48%)

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятого за 100%. Сравнение опыта с контролем: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

Следует отметить, что под влиянием исследуемых препаратов активность тканевого активатора плазминогена возрастала, что соответствовало уменьшению активности ингибиторов фибринолиза, которые и способствовали активации противосвертывающей системы. Введение регуляторного глипролинового пептида и каждого из препаратов сравнения – варфарина и АСК, обладающих противосвертывающим действием, приводило к восстановлению указанных параметров гемостаза при МС. Входящий в состав глипролиновых пептидов пролин играет важную роль в метаболизме органов и тканей. Как показано другими авторами [13], пролин и гидроксипролин – самые широко распространенные аминокислоты в белках коллагена млекопитающих, которые могут синтезировать пролин из аргинина и глутамин/глутамата, но скорость эндогенного синтеза недостаточна для новорожденных, птиц и рыб. В этом отношении работа с молодняком свиней (широко используемая модель

для изучения питания) показала, что добавление 0,35; 0,7; 1,05; 1,4 и 2,1% пролина к свободной от пролина диете, содержащей 40% аргинина и 2%-го глутамата, зависимо улучшала ежедневные скорость роста и эффективность питания. Пролин можно рассматривать как функциональную аминокислоту для млекопитающих, птиц и рыб. В наших исследованиях оказалось, что непрямой антикоагулянт варфарин также способствует снижению концентрации глюкозы крови, повышенной при развитии МС. Это согласуется с данными других авторов [14, 15], которые все же высказывают опасения по поводу клинической эффективности и безопасности варфарина, применяемого у больных сахарным диабетом, особенно с фибрилляцией предсердий. Кроме того, поскольку варфарин ингибирует витамин К-зависимое гамма-глутамил-карбоксилирование белков, в том числе остеокальцина и матричного белка Gla, то его применение может повысить риск остеопоротического перелома костей и кальци-

Таблица 2

Изменение параметров гемостаза и уровня глюкозы через 7 сут после отмены введения пептида KRRKPGP, варфарина и АСК крысам при развитии метаболического синдрома (МС); $M \pm m$ (%)

Параметры	Контроль (МС)	Введен KRRKPGP	Введен варфарин	Введена АСК	Норма (здоровые крысы)
Агрегация тромбоцитов (индекс, %)	2.1 ± 0.1 (100%)	1.7 ± 0.2* (81%)	1.8 ± 0.2 (86%)	1.4 ± 0.3** (66.7%)	2.2 ± 0.8 (105%)
АЧТВ (сек, %)	31.7 ± 0.5 (100%)	36.6 ± 0.6 (115.5%)	41.7 ± 2.7* (131.5%)	34.5 ± 0.2 (109%)	35.9 ± 1.4 (113%)
Протромбиновое время (сек, %)	25.1 ± 1.7 (100%)	24.7 ± 2.0 (98.4%)	24.5 ± 0.7 (97.6%)	24.9 ± 2.7 (99.0%)	24.7 ± 0.3 (98%)
Активность фактора XIIIa (усл. ед. %)	88.0 ± 2.5 (100%)	68.0 ± 2.0** (77%)	77.0 ± 2.5* (91%)	80.0 ± 2.7* (87%)	58.8 ± 4.3* (67%)
Суммарная фибринолитическая активность (мм ² , %)	18.0 ± 1.0 (100%)	30.0 ± 0.9** (161%)	23.0 ± 0.7* (120%)	25.4 ± 0.7** (141%)	34.0 ± 2.0** (189%)
Фибриндеполимеризационная активность (мм ² , %)	13.4 ± 1.0 (100%)	20.8 ± 0.9** (155%)	17.4 ± 0.5* (129%)	19.2 ± 1.0** (142%)	23.2 ± 0.9** (173%)
Ферментативный фибринолиз (мм ² , %)	4.6 ± 0.5 (100%)	9.2 ± 1.2** (200%)	6.2 ± 0.9** (134%)	6.4 ± 0.7** (138%)	10.7 ± 0.7** (232%)
Время лизиса эуглобулинов (мин, %)	117.0 ± 4.5 (100%)	85.4 ± 6.3** (73%)	102.0 ± 7.6 (87%)	93.2 ± 5.0** (79%)	78.3 ± 2.9** (67%)
Активность тканевого активатора плазминогена (мм ² , %)	19.6 ± 3.0 (100%)	88.0 ± 2.8** (449%)	32.8 ± 1.6** (167%)	33.0 ± 2.6** (168%)	54.7 ± 0.6** (279%)
Активность плазмينا (мм ² , %)	12.4 ± 2.5 (100%)	4.0 ± 0.1** (32%)	23.2 ± 2.5* (187%)	14.0 ± 1.8 (113%)	23.3 ± 2.8* (188%)
Уровень глюкозы (ммоль/л, %)	8.1 ± 1.0 (100%)	6.3 ± 0.5 (78%)	6.5 ± 0.4 (80%)	5.1 ± 0.9* (63%)	4.1 ± 0.1** (51%)

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятого за 100%. Сравнение опыта с контролем: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

фикации сосудов, что является ведущими причинами, снижающими качество жизни у больных сахарным диабетом [16].

Имеются сообщения, что аспирин положительно влияет на уровень глюкозы при развитии сахарного диабета [17], что наблюдалось и в наших исследованиях.

Однако же при сравнительном исследовании эффектов АСК, варфарина и пептида глипролинового ряда, применяемых перорально в максимальных дозах и в одинаковых условиях на фоне развития МС, нами показано, что пептид обладал максимальным антитромботическим и гипогликемическим эффектами. Он не проявлял отрицательных побочных влияний, наблюдаемых при использовании варфарина и АСК, на которые указывается в литературе [15-17]. Поэтому мы можем с уверенностью говорить о преимуществах применения лизин- и аргинин-содержащего пептида в условиях метаболического синдрома в качестве средства, одновременно усиливающего противосвертывающие свойства крови и положительно влияющего на углеводный и липидный обмен.

Заключение

В условиях предтромбоза, вызванного моделированием у крыс метаболического синдрома, проведено сравнительное исследование эффектов препаратов с разным механизмом действия — пептида глипролинового ряда KRRKPGP, производного диоксикумарина — варфарина и ацетилсалициловой кислоты. Выявлены изменения параметров гемостаза в сторону гипокоагуляции и тенденция к нормализации уровня глюкозы крови даже при продолжающемся высококалорийном питании. Наибольший эффект на параметры гемостаза выявлен у пептидного препарата и по уровню глюкозы крови, т.е. пептид проявлял высокие антикоагулянтно-фибринолитические и гипогликемические свойства. Поскольку и через 7 сут после отмены всех препаратов на фоне продолжающегося высококалорийного питания показан подобный эффект всех исследуемых препаратов, то можно говорить о пролонгированном действии в организме указанных препаратов. В отличие от варфарина и ацетилсалициловой кислоты, регуляторный пептид проявлял самый максимальный эффект, так как влиял положительно на каждый из исследуемых параметров — агрегацию тромбоцитов, временные интервалы свертывания, фибринолиз, факторы свертывания, уровень глюкозы). Отмечено максимальное увеличение активности тканевого активатора плазминогена, что свидетельствует об активации функции эндотелия под влиянием регуляторного пептида. Варфарин при этом влиял только

на временные интервалы свертывания крови, эффективно снижал уровень глюкозы только в первые часы после прекращения введения. АСК в основном влияла на снижение агрегации тромбоцитов и в меньшей степени на уровень глюкозы.

Таким образом, поскольку пептид оказывал выраженные эффекты на жировой и углеводный обмен, сосудисто-эндотелиальную функцию организма и систему гемостаза при развитии метаболического синдрома у крыс, защищая организм животных от прогрессирования нарушений обмена веществ и препятствуя процессам тромбообразования, то он является наиболее перспективным средством от тромбозов, атеросклероза и сопутствующих им осложнений — инсультов и инфарктов.

Литература

(п.п. 1-10; 12-17 см. References)

1. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови*. М.: Адвансес Солюшнз; 2012.

References

1. Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigoryeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A., et al. Mechanism for glyproline protection in hypercholesterolemia. *Pathophysiol.* 2016; 23(1): 27–33.
2. Czuprynska J., Patel J.P., Arya R. Current challenges and future prospects in oral anticoagulant therapy. *Br. J. Haematol.* 2017; 178(6): 838–51. doi: 10.1111/bjh.14714
3. Capodanno D., Angiolillo D. Aspirin for Primary Cardiovascular Risk Prevention and Beyond in Diabetes Mellitus. *Circulation.* 2016; 134(20): 1579–94.
4. Milatová E., Milata V. Warfarin — its synthesis and properties in a twenty-year retrospective. *Ceska. Slov. Farm.* 2013; 62(3): 111–19.
5. Kimmel S.E. Warfarin pharmacogenomics: current best evidence. *J. Thromb. Haemost.* 2015; 13.Suppl.1: S266–71. doi: 10.1111/jth.12978
6. Mohammad I., Korkis B., Garwood C.L. Incorporating Comprehensive Management of Direct Oral Anticoagulants into Anticoagulation Clinics. *Pharmacol. therapy.* 2017; 37(10): 1284–97. doi: 10.1002/phar.1991
7. Lichtenberger L.M., Vijayan K.V. Are Platelets the Primary Target of Aspirin's Remarkable Anticancer Activity? *Cancer Res.* 2019; 79(15): 3820–23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0762
8. <https://medbe.ru/materials/lekarstva-v-revmatologii/atsetilsalitsilovaya-kislota/>
9. Kina-Tanada M., Sakanashi M., Arasaki A., Tsutsui M. Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and cardiovascular death in mice. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2018; 151(4): 148–54. doi: 10.1254/fpj.151.148
10. Kostapanos M.S., Florentin M., Elisaf M.S., Mikhailidis D.P. Hemostatic factors and the metabolic syndrome. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2013; 11(6): 880–905.
11. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the functional state of the anticoagulant blood system. [Teoreticheskie i prakticheskie voprosy*

- izucheniya funktsional'nogo sostoyaniya protivoversyuyayushchey sistemy krovi]. Moscow: Advanced Solutions; 2012. (in Russian)*
12. Kaji H. Adipose Tissue-Derived Plasminogen Activator Inhibitor-1 Function and Regulation. *Compr. Physiol.* 2016; 6(4): 1873-96. doi: 10.1002/cphy.c160004
 13. Wu G., Bazer F.W., Burghardt R.C., Johnson G.A., Kim S.W., Knabe D.A., et al. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids.* 2011; 40(4): 1053-63. doi: 10.1007/s00726-010-0715-Z
 14. Leite P.M., Martins M.A.P., Castilho R.O. Review on mechanisms and interactions in concomitant use of herbs and warfarin therapy. *Biomed. Pharmacother.* 2016; 83: 14-21. doi: 10.1016/j.biopha.2016.06.012
 15. Michalčová J., Buliková A., Závřelová J., Prudková M., Penka M. The current role of warfarin. *Vnitř. Lek. Winter.* 2018; 63(12): 957-66.
 16. Yamagishi S.I. Concerns about clinical efficacy and safety of warfarin in diabetic patients with atrial fibrillation. *Cardiovasc. Diabetol.* 2019; 18(1): 12. doi: 10.1186/s12933-019-0818-0
 17. Vouillarmet J., Aboyans V. Aspirin in people with diabetes: Time to clean up the prescription list? *Diabetes Res Clin Pract.* 2019; 149: 208-09. doi: 10.1016/j.diabres.2019.02.005

Сведения об авторах:

Ляпина Людмила Анисимовна, проф., доктор биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: lyapinal@mail.ru;

Мясоедов Николай Федорович, акад. РАН, зав. отделом химии физиологически активных веществ НИЦ «Курчатowski институт» – ИМГ, доктор хим. наук, проф.; e-mail: nfm@img.ras.ru;

Шубина Татьяна Александровна, ст. науч. сотр., канд. биол. наук, лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: shubina.74@mail.ru;

Андреева Людмила Александровна, зав. сектором регуляторных пептидов НИЦ «Курчатowski институт» – ИМГ; e-mail: landr@img.ras.ru;

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

Григорьева Марина Евгеньевна, вед. науч. сотр., канд. биол. наук лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.127-005.8

Лебедева А.И.^{1,2}, Муслимов С.А.^{1,2}, Гареев Е.М.¹, Попов С.В.³, Афанасьев С.А.³, Кондратьева Д.С.³

Аллогенный биоматериал – индуктор регенерации ишемически поврежденного миокарда в эксперименте

¹ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России, 450075, Уфа, Россия, ул. Р. Зорге, д. 67/1;

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450000, Уфа, Россия, ул. Ленина, д. 3;

³ФГБНУ НИИ кардиологии «Томский национальный исследовательский медицинский центр», 634012, Томск, Россия, ул. Киевская, д. 111а

Введение. Современные технологии восстановления поврежденного миокарда после инфаркта недостаточно эффективны и не отвечают требованиям полноценной реабилитации больных. Аллогенный биоматериал является стимулятором регенерации мягких тканей и применяется в различных областях медицины: в хирургии, травматологии, офтальмологии, и др.

Цель работы – исследование стимуляции регенерации ишемически поврежденного миокарда с помощью биоматериала Аллоплант (БМА) в эксперименте.

Методика. Экспериментальные исследования были проведены на 100 крысах-самцах Вистар массой 0,18 – 0,25 кг. Всем животным была проведена коронароокклюзия путем лигирования коронарной артерии. В опытной группе одновременно с стенозированием сосуда интрамиокардиально в бассейн стенозированной артерии вводили суспензию аллогенного биоматериала в количестве 12 мг в физиологическом растворе. В контрольной группе животным вводили физиологический раствор. Взятие материала для исследования проводили через 3, 7, 14, 30 и 45 сут. В работе использовали гистологические, электронно микроскопические, морфометрические и статистические методы исследования.

Результаты. После интрамиокардиального введения БМА в ишемизированный миокард площадь рубца была меньше в 2,74 раза по сравнению с контрольной группой, где биоматериал не применялся. В опытной группе на фоне некротически поврежденных кардиомиоцитов формировался регенерат, состоящий из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Отмечалась высокая степень васкуляризации на протяжении всего эксперимента, частицы БМА фагоцитировались макрофагами, продукты биodeградации БМА способствовали ингибированию фиброгенеза, а БМА оказывал кардиопротекторный эффект и индуцировал клеточную регенерацию в ишемически поврежденном миокарде. В периинфарктной зоне зафиксированы разрозненные малодифференцированные клетки с признаками кардиомиогенной дифференциации, наряду с юными кардиомиоцитами выявлены в большом количестве клетки Аничкова.

Заключение. Интрамиокардиальное введение БМА уменьшает площадь рубца при инфаркте. Продукты биodeградации БМА снижают скорость рубцевания, оказывают кардиопротективный эффект и индуцируют клеточную регенерацию ишемически поврежденного миокарда.

Ключевые слова: миокард; ишемия; регенерация; интрамиокардиальное введение; аллогенный биоматериал; ангиогенез; ингибирование фиброза; крысы; юные кардиомиоциты

Для цитирования: Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М., Попов С.В., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С. Аллогенный биоматериал – индуктор регенерации ишемически поврежденного миокарда в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 60-69.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.60-69

Участие авторов: концепция и дизайн исследования; сбор и обработка материала; написание текста – Лебедева А.И.; концепция и дизайн исследования – Муслимов С.А.; сбор и обработка материала – Кондратьева Д.С.; сбор и обработка материала; редактирование – Афанасьев С.А.; статистическая обработка материалов – Гареев Е.М.; редактирование – Попов С.А.

Для корреспонденции: Лебедева Анна Ивановна, e-mail: Jeol02@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания: регистрационный номер НИОКР № 056-00110-18-00.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.12.2019

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Lebedeva A.I.^{1,2}, Muslimov S.A.^{1,2}, Gareev E.M.¹, Popov S.V.³, Afanasiev S.A.³, Kondratieva D.S.³

Allogeneic biomaterial as an inductor of regeneration in the myocardium injured by experimental ischemia

¹Russian Eye and Plastic Surgery Centre, R. Zorge Str. 67/1, Ufa 450075, Russian Federation;

²Bashkir State Medical University, Lenina Str. 3, Ufa 450000, Russian Federation;

³Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Kievskaya Str. 111a, Tomsk 634012, Russian Federation

Introduction. Modern technologies for recovery of injured myocardium after a heart attack are not sufficiently effective and do not meet requirements for full rehabilitation of patients. Allogeneic biomaterial is a stimulator of soft tissue regeneration and has been used in various fields of medicine, including surgery, traumatology, ophthalmology, etc.

The aim of this work was to study stimulation of regeneration with a biomaterial Alloplast (BMA) in the myocardium injured by experimental ischemia.

Methods. This experimental study was conducted on 100 Wistar male rats weighing 0.18-0.25 kg. All animals underwent coronary occlusion by ligation of the coronary artery. In the experimental group, a saline suspension of allogeneic biomaterial (12 mg) was injected intramyocardially into the territory of the stenosed artery simultaneously with the artery ligation. In the control group of animals, a physiological solution was administered. Histological methods used in the study included light-optical microscopy for hematoxylin and eosin staining, Mallory staining, electron microscopy, and morphometry. Hearts were taken for the study at 3, 7, 14, 30, and 45 days.

Results. After the BMA intramyocardial injection into the ischemic myocardium, the scar area was 68.5% smaller than in the control group, where the biomaterial was not used. In the experimental myocardium with necrotic cardiomyocytes, an area of regeneration formed, which consisted of loose fibrous connective tissue. Extensive vascularization was observed throughout the experiment. BMA particles were phagocytized by macrophages, and products of BMA biodegradation facilitated fibrogenesis. BMA exerted a cardioprotective effect and induced cell regeneration in the ischemic myocardium. In the periinfarction zone, isolated low-differentiated cells with signs of cardiomyogenic differentiation were observed. Along with young cardiomyocytes, a large amount of Anichkov cells was found.

Conclusion. Intramyocardial administration of BMA reduced the scar size in myocardial infarction. Products of BMA biodegradation slowed the scar formation, exerted a cardioprotective effect, and induced cell regeneration in the myocardium injured by ischemia.

Keywords: myocardium; ischemia; regeneration; intramyocardial administration; allogeneic biomaterial; angiogenesis; fibrosis inhibition; rats; young cardiomyocytes

For citation: Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Popov S.V., Afanasiev S.A., Kondratieva D.S. Allogeneic biomaterial as an inductor of regeneration in the myocardium injured by experimental ischemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 60-69. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.60-69

For correspondence: *Anna I. Lebedeva*, doctor of Biological Sciences, PhD, senior research assistant of the Department of morphology, «Eye and Plastic Surgery Centre» of the Russian Federation Health Ministry, 67/1, Zorge str., Ufa, Russia, 450075; «Bashkir State Medical University» of the Russian Federation Health Ministry, 3, Lenin str., Ufa, Russia, 450000, e-mail: Jeol02@mail.ru

Contribution: research concept and design; collection and processing of the material; writing the text – Lebedeva A.I.; research concept and design – Muslimov S.A.; collection and processing of the material – Kondratieva D.S.; collection and processing of the material, editing – Afanasiev S.A.; statistical processing – Gareev E.M., editing – Popov S.A.

Acknowledgment. The work was supported by state task: registration number NIOCR № 056-00110-18-00.

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

Information about the authors:

Lebedeva A.I., <https://orcid.org/0000-0002-9170-2600>

Muslimov S.A., <https://orcid.org/0000-0002-9076-0251>

Popov S.V., <https://orcid.org/0000-0002-9050-4493>

Afanasiev S.A., <https://orcid.org/0000-0001-6066-3998>

Kondratieva D. S., <https://orcid.org/0000-0002-4004-2497>

Received 24.12.2019

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

До настоящего времени не существует адекватных и эффективных методов стимуляции регенерации миокарда. Клеточный кардиогенный пул сердца существенно ограничен и не может компенсировать зону обширных повреждений миокарда. До сих пор широ-

ко используется метод органной трансплантации. Применение данной манипуляции связано с риском иммунного отторжения органа и ограничивается морально-этическими, религиозными и законодательными аспектами. Менее радикальными являются методы

клеточной терапии, кардиомиопластика стволовыми клетками различного происхождения: фетальными клетками, клетками пуповинной крови, скелетными миоцитами и т.д. [1]. Однако восполнение кардиомиоцитарного пула не может служить полноценным методом восстановления миокарда, так как не решается проблема ремоделирования постинфарктного фиброза. Как правило, формированию рубца в мышечной ткани способствует стремительное накопление стромальных элементов и низкая скорость или отсутствие репликации мышечных клеток [2]. В этом аспекте перспективным представляется применение диспергированного аллогенного биоматериала. Продукты биодеградации биоматериала ингибируют профиброгенную клеточную активность и снижают скорость коллагенообразования, тем самым стимулируют клеточные элементы тканевого ложа [3, 4]. Цель работы – исследование регенеративных возможностей биоматериала Аллоплант (БМА) в ишемически поврежденном миокарде в эксперименте.

Методика

Экспериментальные исследования с применением биоматериала Аллоплант были проведены на 100 крысах-самцах Вистар 0,18 – 0,25 кг. Все животные были разделены на 2 группы – контрольную ($n = 50$) и опытную ($n = 50$). Моделирование инфаркта миокарда осуществляли путем перевязки г. *interventricularis paragonalis a. coronarii sin.* левого желудочка наложением шва «викрил» при левосторонней торакотомии под внутримышечным наркозом (раствор зоветила). Сердце выводили за пределы грудной клетки и накладывали лигатуру на коронарную артерию. Рану засыпали антибиотиком и, удалив воздух из грудной полости, послойно зашивали. В опытной группе лигирование артерии сопровождали введением суспензии БМА в бассейн стенозированной артерии в количестве 12 мг. Биоматериал предварительно разводили физиологическим раствором. Объем вводимой суспензии составлял 600 мкл для одного животного. Доза биоматериала взята произвольно. Размер частиц БМА составлял 50–80 мкм. Животных выводили из опыта путем инсуффляции летальной дозы паров эфира на 3-и, 7-е, 14-е, 30-е и 45-е сут. На каждый срок исследования использовали по 10 животных. Исследования выполнялись согласно правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Strasburg, 1986), в соответствии с руководством по лабораторным животным

и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [5]. Аллогенный биоматериал разработан в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ г. Уфы. Биоматериал изготавливается согласно ТУ 42-2-537-87, сертифицирован и разрешен к применению в клинической практике приказом МЗ СССР №87 901-87 от 22.07.1987 г. Для настоящего исследования аллогенный биоматериал был изготовлен из сухожилий крыс, диспергирован. Сердца животных, выведенных из эксперимента подвергали стандартным гистологическим процедурам Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Маллори. Для электронномикроскопического исследования из сердечной ткани вырезали кусочки размером 1–2 мм³ и обрабатывали по общепринятой методике. Предварительно готовили полутонкие срезы на ультратоме EM UC 7 (Leica, Германия) и окрашивали их раствором толуидинового синего на 2,5%-ном растворе безводной соды. На данных срезах выбирали участки для электронномикроскопического исследования. Ультратонкие контрастировали 2%-м водным раствором уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в трансмиссионном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония). Для определения размера постинфарктного рубца миокарда каждое сердце поперечными разрезами делили на 5 секторов. Из них изготавливали гистологические препараты и подвергали морфометрической обработке. Всего было использовано 500 срезов. Индекс площади рубца (ИПР) сердец крыс измеряли на препаратах, окрашенных по Маллори, с использованием программы ITEM (Olympus) следующим образом: отношение площади рубца к площади стенки левого желудочка умножали на 100%. Суммарную площадь просвета капилляров (СППК) измеряли в 20 полях зрения для каждого среза при увеличении $\times 200$.

Анализ изменений параметров СППК и ИПР был проведен с применением непараметрических (ранговых) методов – однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллесу и сравнения некоррелированных выборок по критерию Манна-Уитни [6]. Значения выражали в виде медианы и квартилей (Q25% и Q75%). Все расчеты производили в пакете прикладных программ Statistica 6.

Результаты

Через 3 сут после проведенной коронароокклюзии как в опытной, так и в контрольной группах выявлялись признаки ишемического повреждения миокарда в виде крупноочагового трансмурального некроза мышечной стенки левого желудочка. В кардиомиоцитах

выявлялись признаки восковидного некроза, зернистой дистрофии, утрата клетками поперечной исчерченности, пикноз ядер (**рис. 1, а**). В строме перифокальной области наблюдались признаки отека, очаги кровоизлияний, геморрагическое пропитывание. Демаркационная зона была представлена клетками воспалительного экссудата – нейтрофилами, макрофагами, лимфоцитами. В кровеносных сосудах отмечалось краевое стояние и эмиграция лейкоцитов. Кардиомиоциты субэндокардиальной и субэпикардиальной зон подвергались лизису и фагоцитозу макрофагами, формировавшими клеточный вал. В миокарде левого желудочка после окклюзии коронарной артерии определялись признаки коагуляционного некроза. Признаки формирования рубца на данном сроке отсутствовали.

В опытной группе через 3-е сут после коронароокклюзии и применения БМА зона некроза была ограничена от неповрежденного миокарда клеточным валом, представлявшем демаркационную зону. На месте ишемически поврежденных кардиомиоцитов выявлялись признаки формирования грануляционной ткани. Определялись тонкие коллагеновые волокна, инфильтрированные макрофагами, мезенхимными клетками и юными фибробластами. Сеть тонких новообразованных гемокапилляров со свободными просветами пронизывала провизорную ткань (**рис. 1, б**). Частицы аллогенного биоматериала были окружены макрофагальными клетками, признаки активной иммунной

реакции отсутствовали (**рис. 1, в**). Признаков формирования рубца через 3-е сут после введения аллогенного биоматериала также не наблюдалось.

Таким образом, после введения аллогенного биоматериала через 3-е сут после лигирования коронарной артерии острая фаза воспалительной реакции (альтерация, экссудация) трансформировалась в пролиферативную стадию – начиналось замещение грануляционной тканью с привлечением клеток фибробластического ряда, что указывало на более раннее начало процесса заживления. Признаки ишемического повреждения миокарда сохранялись как в контрольной, так и в опытной группах.

Через 7 сут в контрольной группе на месте поврежденных кардиомиоцитов выявлялась волокнистая соединительная ткань в виде плотных параллельных пучков коллагеновых волокон. Фрагменты некротизированных сердечных мышечных волокон на данном сроке продолжали визуализироваться (**рис. 1, г**). Клеточная инфильтрация сохраняла признаки воспалительного экссудата, отмечались признаки разрушения кровеносных сосудов и прогрессирования ишемии. Развивающаяся ткань отличалась высокой клеточной плотностью, с низким содержанием кровеносных сосудов. Интерстициальные пространства были сужены.

После применения БМА спустя 7 сут частицы введенного аллогенного биоматериала не визуализировались вследствие их фагоцитоза макрофагами. Вокруг сохранившихся некротизированных сердечных мышеч-

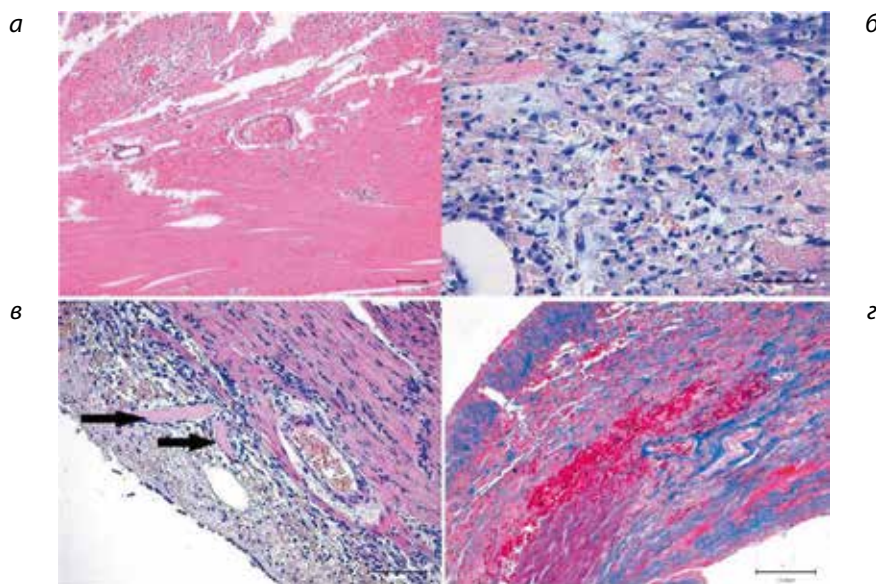


Рис. 1. Ишемическая дистрофия миокарда. а – тромбоз кровеносных сосудов через 3 сут после коронароокклюзии крысы, $\times 100$. б – формирование грануляционной ткани, инфильтрация макрофагами, мезенхимными клетками, фибробластами в миокарде крысы через 3 сут после коронароокклюзии и введения БМА, $\times 400$. в – инфильтрация макрофагами частиц БМА (\uparrow). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$. г – замещение поврежденных кардиомиоцитов плотной волокнистой соединительной тканью через 7 сут после коронароокклюзии. Окраска по Маллори, $\times 200$.

ных волокон формировалась грануляционная ткань, представленная коллагеновыми волокнами и соединительнотканью клетками различных популяций. Определялась макрофагально – фибробластическая и лимфоцитарная инфильтрация. В регенерате определялись тяжи эндотелиальных клеток – почки роста и сформированные гемокapилляры с свободными, расширенными просветами. Возле кровеносных сосудов определялись группы разрозненных кардиомиоцитов, вероятно сохранившихся. Цитоплазма клеток имела эозинофильную гомогенную окраску, ядра, с хорошо развитым ядрышковым аппаратом, имели округлую форму с четкой кариолеммой (рис. 2, а). В перинфарктной зоне на границе соединительнотканного регенерата и сердечной мышечной ткани наблюдались клетки с характерными для клеток Аничкова ядрами. Ядерный гетерохроматин этих клеток был конденсирован в виде «гусеницы» при продольном сечении и «глаза филина» при поперечном. В перинфарктной зоне при окраске по Маллори определялись тонкие хаотично расположенные коллагеновые волокна.

Через 7 сут после начала эксперимента волокнистая соединительная ткань, замещавшая некротизированные мышечные волокна в контроле и опыте имела различные морфологические характеристики: в контрольной группе она была плотной аваскулярной волокнистой оформленной соединительной тканью, а после применения аллогенного биоматериала – рыхлой, обильно васкуляризированной неоформленной волокнистой соединительной тканью.

Через 14 сут продолжали происходить гистопластические процессы. Некротическая масса разрушенных мышечных волокон значительно уменьшалась в объеме за счет фагоцитоза макрофагами. В контрольной группе вокруг детрита выявлялась инфильтрация различными макрофагальными клетками: фагоцитами, эпителиоидными клетками, гигантскими клетками инородных тел и клетками Пирогова – Лангханса в присутствии лимфоцитов. Происходили реакции гиперчувствительности замедленного типа, сопровождающиеся разрастанием плотной волокнистой соединительной тканью – рубцом. Макрофагальная реакция постепенно менялась на фибробластическую. Происходило накопление коллагеновых волокон, которые представляли собой плотный стромально-клеточный массив. Сердечные мышечные волокна со стороны интактного миокарда перинфарктной зоны ограничивались плотной волокнистой соединительной тканью. Культы сердечных мышечных волокон «запечатывались» коллагеновыми волокнами. В данном сроке происходило формирование грубоволокнистого руб-

ца и образование аневризмы за счет высокой гидродинамической нагрузки. После применения аллогенного биоматериала спустя 14 сут в центральной зоне инфарктированного участка сердечной мышцы – левого желудочка на месте утраченной мышцы развивалась рыхлая волокнистая соединительная ткань. Тонкие, коллагеновые волокна имели неупорядоченное разновекторное расположение с расширенными свободными межволоконными промежутками. Волокна были инфильтрированы макрофагами, фибробластами, лимфоцитами. Была развита обильная сеть кровеносных сосудов. Эндотелиоциты имели уплощенную форму, просветы сосудов расширенные, свободные, в некоторых из них определялись форменные элементы крови. Кровеносные сосуды были новообразованные, не дифференцированные, относились к капиллярному типу (рис. 2, б). В перинфарктной зоне возле сохранившихся зрелых кардиомиоцитов обнаруживалась инфильтрация малодифференцированными клетками. Также, наблюдались массивные скопления клеток Аничкова. Грубоволокнистых пучков коллагеновых волокон не было обнаружено, кровеносные сосуды присутствовали в большом количестве (рис. 2, в).

Спустя 30 сут после начала эксперимента в контрольной группе поврежденный миокард замещался рубцом, как в центральной, так и в перинфарктной зонах. В перинфарктной зоне происходило формирование плотных прослоек коллагеновых волокон в межмышечных пространствах и «запечатывание» сердечных мышечных волокон. Выявлялись преимущественно фибробласты и фиброциты. В центральном районе инфарктной зоны происходило формирование плотного аваскулярного рубца, состоящего из плотной оформленной волокнистой соединительной ткани с наличием фиброцитов, фибробластов и миофибробластов в большом количестве. Коронарных кровеносных сосудов было мало, что позволяло судить о продолжающейся гипоксии в тканях.

Через 30 сут после применения БМА гистопластические процессы активно протекали в данном сроке. Регенерат характеризовался клеточным гетероморфизмом, как в перинфарктной зоне, так и в центральном районе ишемизированного миокарда левого желудочка. В центральной зоне наблюдалась макрофагально – фибробластическая, лимфоидная инфильтрация и признаки формирования рыхлой волокнистой соединительной ткани с большим количеством новообразованных тонкостенных недифференцированных кровеносных сосудов. В перинфарктной зоне определялся соединительнотканно-мышечный регенерат, представленный мышечными волокнами, единичными мышеч-

ными клетками с характерными ядрами Аничкова и невысокой долей соединительнотканых клеток – фибробластов. На электронномикроскопическом уровне данная зона была зафиксирована. Ультраструктурный анализ показал, что изучаемые клетки были кардиомиогенные и классифицировались как юные кардиомиоциты. Ядерно-цитоплазматическое отношение было ≥ 1 в сторону ядра. Крупные овальные ядра содержали эухроматин. В цитоплазме определялись рибосомы и гранулы гликогена в большом количестве, разрозненные единичные тонкие и толстые миофиламенты, собранные в саркомеры короткие миофибриллы в различной степени дифференциации. Между клетками вставочных дисков не наблюдалось (рис. 2, з).

При анализе степени васкуляризации периинфарктной зоны выявлено, что в контрольной группе изменения СППК на протяжении эксперимента в целом оказались статистически незначимы ($\chi^2=6,6$; $p>0,08$), однако сравнение по критерию Манна-Уитни показало, что значения СППК на 14-е сут значимо ($p<0,01$) меньше, чем в прочие сроки наблюдения, различия между которыми, в свою очередь, статистически незначимы ($p>0,35$ - $p>0,87$). В опытной группе зависимость уровня СППК от сроков наблюдения оказалась статистиче-

ски значимой ($\chi^2=10,8$; $p<0,02$) за счет того, что, начиная с 7-х сут уровень СППК значимо ($p<0,001$) снижался. Межгрупповые сравнения показали, что в опытной группе уровень СППК на всех сроках наблюдения оказался значимо икратно выше, чем в контрольной. Через 3 сут в опытной группе медиана распределения составляла 1074 мкм² (75% >780 мкм²) против 306 мкм² (75% <620 мкм²) в контрольной, через 7 сут - 506 мкм² (75% <800 мкм²) против 201 мкм² (75% <350 мкм²), через 14 сут - 453 мкм² (75% <700 мкм²) против 120 мкм² (75% <160 мкм²), спустя 30 сут - 471 мкм² (75% <850 мкм²) против 212 мкм² (75% <420 мкм²) (рис. 3).

В результате исследования, спустя 45 сут в контрольной группе выявлялся сформированный аваскулярный рубец. Между грубыми коллагеновыми волокнами определялись деструктивно измененные сердечные мышечные волокна. В период 30–45 сут в контрольной группе наблюдались признаки вторичной волны некроза. Она вызывала увеличение зоны некроза за счет механического сдавливания сердечных мышечных волокон окружающей ткани грубыми, толстыми пучками коллагеновых волокон.

После применения БМА через 45 сут регенерат характеризовался высокой клеточной плотностью, как в

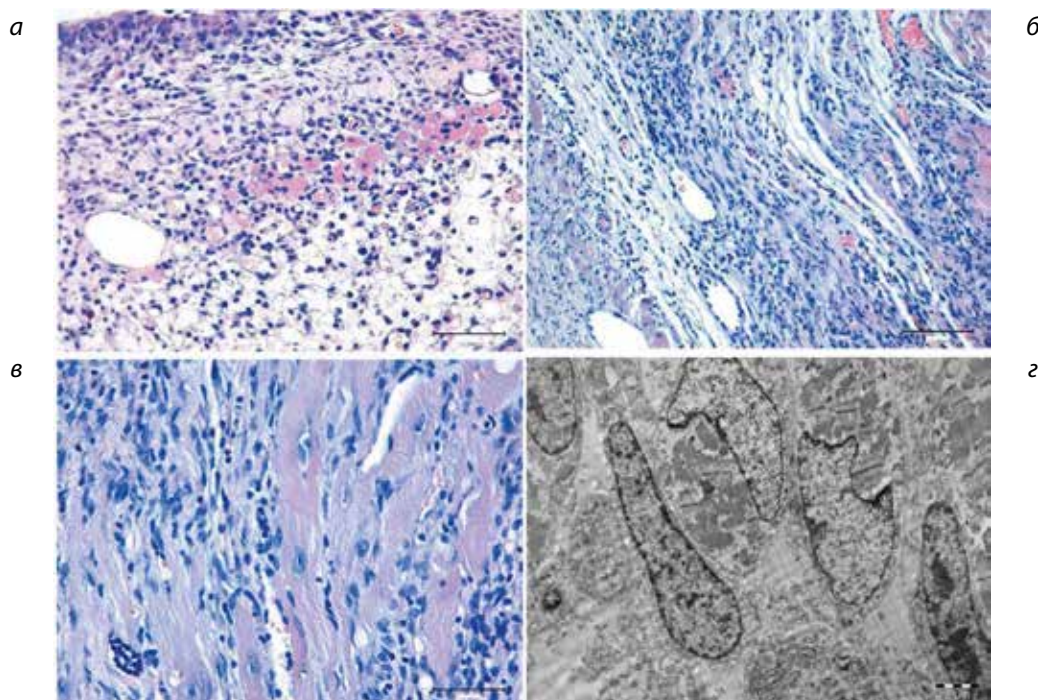


Рис. 2. Миокард после коронароокклюзии и введения БМА. а-сохранившиеся кардиомиоциты в периваскулярной зоне через 7 сут. $\times 200$. б – разрастание рыхлой, васкуляризированной волокнистой соединительной ткани через 14 сут. $\times 200$. в – скопление малодифференцированных клеток и клеток Аничкова в перифокальной зоне через 14 сут. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$. з - кардиомиобласты и юные кардиомиоциты в периинфарктной зоне через 30 сут. Электронограмма. $\times 5000$.

центральной зоне поврежденного миокарда, так и в периферической. В центральной зоне преобладала волокнистая соединительная ткань, интенсивно инфильтрированная фибробластами, макрофагами, клетками Аничкова. Данная область была обильно васкуляризирована. Периинфарктная зона представляла собой соединительнотканно-мышечный регенерат, в котором продолжали происходить гистопластические процессы замещения. Это выражалось в наличии скоплений клеток Аничкова на фоне рыхлой волокнистой соединительной ткани, а также малодифференцированных кардиомиоцитарных клеток с разновекторным направлением, еще не образующих плотных клеточных контактов — десмосом.

На рис. 4 представлены поперечные срезы сердец контрольной и опытной групп в различные сроки исследования.

В контрольной группе ИПР статистически значимо не зависел от сроков наблюдения ($\chi^2=6,3$, $p>0,09$). Однако через 30 сут ИПР оказались значимо меньше, чем через 7-14 сут после начала эксперимента ($p<0,02$ и $p<0,005$ соответственно). Через 45 сут не было значимых отличий от всех предшествующих сроков наблюдения ($p>0,45$). Медианы распределения ИПР в контрольной группе на всем протяжении наблюдений имели значения не ниже 20%. После применения БМА значения ИПР также незначимо зависели от сроков наблюдения ($\chi^2=5,7$, $p>0,12$).

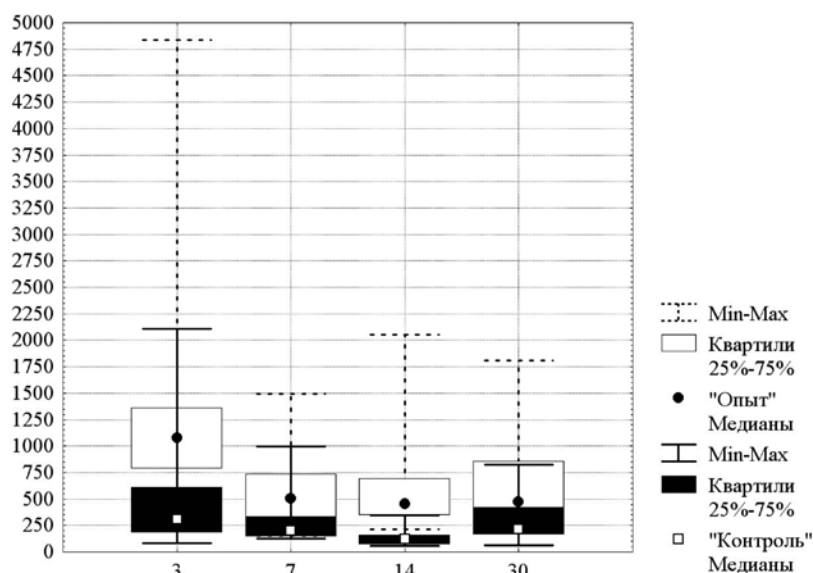


Рис. 3. Изменения СПК реактивной зоны в контрольной и опытной группах. По оси абсцисс – «сут». По оси ординат – СПК (мкм²). ГДИ – границы доверительных интервалов для средних значений площади, $\pm CO$ – стандартная ошибка среднего значения.

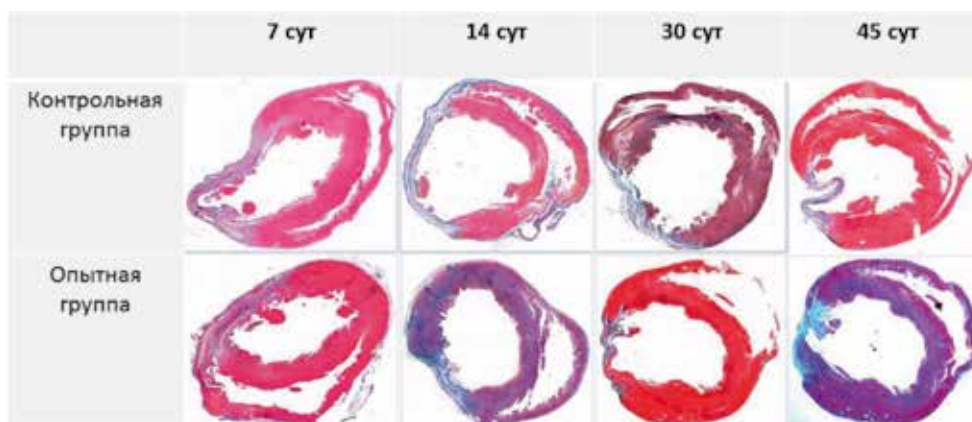


Рис. 4. Поперечные срезы миокарда. Окраска по Маллори. $\times 40$.

Однако, значения этого параметра постепенно снижались от начала к концу наблюдений. Медиана распределения через 7 сут составляли 22,7%, на 14-е сут значительно снижалась до 13,4% ($p < 0,02$), а на 30-й и 45-й до 16% и 5,2%. ($p > 0,14$ и $p < 0,02$ соответственно). Выявлено, что нулевые значения ИПР имели место уже на 7-е сут после коронароокклюзии. Межгрупповые сравнения по срокам наблюдений показали также, что в опытной группе ИПР статистически значимо был меньше, чем в контроле ($p = 0,01 - < 0,0001$). На 45-е сут медиана распределения значений ИПР в опытной группе оказалась в 2,74 ниже, чем в контрольной группе, причем в опытной группе 50% значений ИПР оказались не ниже 5,3%, а в контрольной 75% значений выше 18%, т.е. в опытной группе имело место перераспределение площади рубца в область более низких значений (рис. 5).

Обсуждение

Использованная модель воспроизведения острой ишемии миокарда путем перевязки передней нисходящей артерии соответствует практическим ситуациям и последующим структурным изменениям миокарда. Лигирование коронарного сосуда привело к выраженным ишемическим повреждениям в ткани необратимого характера. Патоморфологическая картина контрольной группы характеризовалась признаками развития выраженного коагуляционного некроза. В зоне ишемии происходили гистопластические процессы, заканчивающиеся развитием трансмурального инфаркта миокарда с формированием рубца и аневризмы. Аневризма

формировалась во всех экспериментальных группах, что позволяло использовать стандартизированные методы морфометрического исследования. А в опытной группе в стадии острой ишемии миокарда частицы трансплантата вызывали слабо выраженную реакцию окружающих тканей, выражающуюся в инфильтрации небольшим количеством макрофагов. Гигантских форм макрофагальных клеток не обнаруживалось. Частицы БМА полностью резорбировались и спустя 7 сут на светооптическом уровне не определялись. Тем не менее, исходя из морфологических данных выявлено, что БМА оказывает положительное влияние на заживление постишемического инфаркта миокарда и достоверно снижает объем рубца. Этому способствует ряд причин, направленных на оптимизацию процесса заживления и течение воспалительного ответа. В сроке 3 сут рубец в опытной и контрольной группе еще не сформировался и выявлялись признаки острого воспаления. Спустя 7 сут некротизированные мышечные волокна замещались волокнистой соединительной тканью и при окраске по Маллори хорошо визуализировались для измерения.

В контрольной группе площадь повреждения миокарда, зафиксированная в ранние сроки существенно не отличалась от конечных сроков наблюдения. Следовательно, вся некротически измененная сердечная мышца замещалась плотным аваскулярным рубцом с образованием аневризмы без признаков замещения органотипичным регенератом (рис. 4). В период 30–45 сут наблюдалось прогрессирование повреждения органа за счет вторичной волны некроза и расширения зоны рубца.

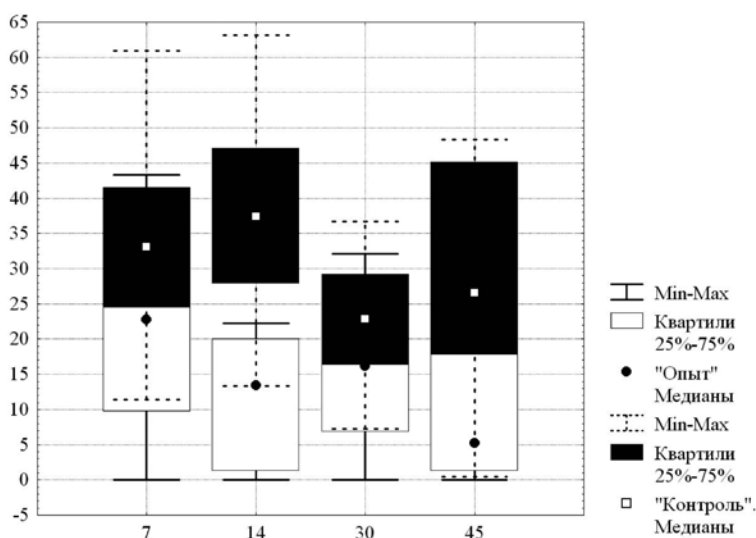


Рис. 5. Изменения ИПР в контрольной и в опытной группах.

По оси абсцисс – сроки наблюдения (сутки). По оси ординат ИПР (%).

После применения БМА процессы замещения некротизированной сердечной мышцы происходили более пролонгировано. Несмотря на раннюю манифестацию фибробластических клеток (7 сут) и начала пролиферативной фазы воспаления, по истечении 45 сут гистопластические процессы в тканях продолжались, что сопровождалось выраженной клеточной гетероморфией. Заживление происходило так же, как и в контрольной группе: ишемия кардиомиоцитов – некроз – острое воспаление – пролиферативное воспаление – замещение волокнистой соединительной тканью. Отличия опытной и контрольной групп состояло в различной площади и качестве рубца. В условиях применения БМА отмечалось формирование регенерата, состоящего из рыхлой соединительной ткани с высокой долей кровеносных сосудов. Исходя из полученных данных, представленных на **рис. 3** можно заключить, что уровень ангиогенеза в несколько раз превышал значения контрольной группы и удерживался на всем протяжении постишемического ремоделирования миокарда.

Известно, что продукты биодеградации БМА ингибируют миграцию фибробластических клеток и их активность в зоне замещения на клеточном и цитокиновом уровнях, которое осуществляется опосредованно через макрофагальное звено [7, 8]. Выявлено, что значения ИПР постепенно снижались в процессе наблюдения. ИПР в опытной группе был в 2,74 раза ниже по сравнению с контрольной, следовательно, происходило замещение зоны повреждения сердечной мышечной тканью. А также, продукты биодеградации БМА, вероятно, способствовали кардиопротекторному эффекту. Через 14 сут в опытной группе было зафиксировано появление большого количества клеток Аничкова в периваскулярном пространстве, а также в составе эндотелиальной выстилки кровеносных сосудов – интрамурально. Идентичная локализация была и у перичитов. Сам Аничков Н.Н. причислял выявленные им клетки к миогенным, однако независимые исследования не смогли это подтвердить [9, 10]. Известно, конфигурацию хроматина, характерную для клеток Аничкова, могут приобретать ядра различных типов клеток, независимо от их тканевой принадлежности и участия в процессах репарации [11]. Через 30, 45 сут в опытной группе наблюдалось наличие массивных инфильтратов клетками Аничкова в периинфарктной зоне. Не отрицается их влияние на кардиомиогенез в качестве клеточных источников в регенерации миокарда, что подтверждает данное исследование. Эти результаты согласуются с мнением Банина В.В. (2017) о причислении перичитов к мезенхимальным стволовым клеткам [12]. Строение ядра отражает, по-видимому, функциональное состоя-

ние клетки, поэтому многие исследователи советуют, что более правильно было бы употреблять термин «ядра Аничкова» [13, 14]. Признано, что подобное строение ядра является свидетельством недифференцированного состояния клетки [14]. В данном исследовании в зоне регенерации электронномикроскопически показано, что наряду с юными кардиомиоцитами присутствуют и клетки с «ядрами Аничкова». По мере накопления миофибрилл в цитоплазме, в ядре гетерохроматин трансформировался в эухроматин. То-есть, ядерный гетерохроматин терял черты изрезанности (гусеницы/глаза филина) и становился равномерно распределенным в кариоплазме, что могло способствовать активации биосинтетических процессов в клетке, направленных на производство сократительных элементов. Выявленные на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях кардиомиогенные клетки находились в различной степени дифференциации. Вероятность их участия в миогенезе высокая. Несмотря на то, что БМА был имплантирован по всей площади левого желудочка и интрамиокардиально, регенерация миокарда происходила только в периинфарктной зоне, а не в центральном районе ишемизированной мышцы. Малодифференцированные кардиомиоциты также присутствовали в районах, граничащих с сохранившимся миокардом. В центральной зоне ишемически поврежденной мышечной стенки левого желудочка явлений кардиомиогенеза зафиксировано не было. Следовательно, прогениторные миогенные клетки только в присутствии предсуществующих мышечных волокон становились на путь миогенеза. Поэтому основным стимулирующим агентом явилось миогенное окружение – морфогенетическое поле (экзосомы, микро-РНК и т.д.).

Выводы

После интрамиокардиального введения БМА в количестве 12 мг/крыса в ишемизированный миокард площадь рубца была ниже в 2,74 раза по сравнению с контрольной группой, где биоматериал не применялся. В опытной группе формировался регенерат, представленный рыхлой соединительной тканью с высокой степенью васкуляризации. Продукты биодеградации БМА снижали скорость рубцевания, оказывали кардиопротективный эффект и индуцировали клеточную регенерацию ишемически поврежденного миокарда.

Литература

(п.п. 4; 9; 10; 13-15 см. References)

1. Деев Р.В. Отечественный опыт изучения эффективности метода «клеточной кардиомиопластики» в эксперименте. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2005; 1(1): 17–8.

2. Непомнящих Л.М. *Патологическая анатомия и ультраструктура сердца: Комплексное морфологическое исследование общепатологического процесса в миокарде*. Новосибирск: Наука. Сиб. Отделение; 1981.
3. Лебедева А.И. Аллогенный губчатый биоматериал – ингибитор фиброза поврежденной скелетной мышечной ткани. *Российский биотерапевтический журнал*. 2014; 13(4): 37-44.
5. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева М. Профиль-2с. 2010.
6. Реброва О.Ю. *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA*. М: МедиаСфера. 2002.
7. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А., Гареев Е.М. Роль макрофагов в регенерации скелетной мышечной ткани, индуцированной биоматериалом Аллоплант. *Биомедицина*. 2014; 2: 43-50.
8. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М., Шербаков Д.А. Морфологические особенности макрофагов и их цитокинового профиля в регенерации скелетной мышечной ткани при пластике аллогенным губчатым биоматериалом. *Цитокины и воспаление*. 2015; 14(1): 27-33.
11. Большакова Г.Б. Особенности появления клеток Аничкова в миокарде. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1984; 97(3): 358-60.
12. Банин В.В. Перicyты – это стволовые клетки мезенхимально происхождения. *Морфология*. 2017; 3: 58.
3. Lebedeva A.I. Allogeneic spongiform biomaterial – fibrosis inhibitor of the damaged skeletal muscular tissue. *Rossiyskiy bioterapevicheskiy zhurnal*. 2014; 13(4): 37-44. (in Russian)
4. Muldashev E.R., Muslimov S.A., Musina L.A. et al. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials. *Cell Tissue Bank*. 2005; 6(2): 99-107.
5. *Guidance on laboratory animals and alternative models in biomedical research Rukovodstvo po laboratornym zivotnym i alternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh* / Ed. N.N. Karkishchenko, S.V. Gracheva. Moscow: Profil'-2s. 2010. (in Russian)
6. Rebrova O.Y. *Statistical analysis of medical data. Application software package STATISTICA*. Moscow: [MediaSfera. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA. Moscow: MediaSfera. 2002. (in Russian)
7. Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Musina L.A., Gareev E.M. The role of macrophages in the regeneration of skeletal muscle tissue laboratory animals, induced by the Alloplant biomaterial. *Biomeditsina*. 2014; 2: 43-50. (in Russian)
8. Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Shcherbakov D.A. Morphological characteristics of macrophages and their cytokine profile in the regeneration of skeletal muscle plastic surgery allogenic spongy biomaterial. *Tsitokiny I Vospaleniye*. 2015; 14(1): 27-33. (in Russian)
9. Anitschkow N. Experimentelle Untersuchungen iüber die Neubildung des Granulationsgewebes im Herzmuskel. *Beiträge zur Pathologie*. 1912; 13(55): 373-415.
10. Anitschkow N. Über die Rückbildungsvorgänge bei der experimentellen Atherosklerose. *Verb. Dtsch. path. Ges.* 1928; 23: 473-8.
11. Bolshakova G.B. Features of the appearance of the Anichkov cells in the myocardium. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. 1984; 97(3): 358-60. (in Russian)
12. Banin V.V. Pericytes – these are stem cells of mesenchymal origin. *Morfologiya*. 2017; 3: 58. (in Russian)
13. Pienaar J.G., Price H.M. Ultrastructure and origin of the Anitschkow cell. *Am J Pathol*. 1967; 51(6): 1063-91.
14. Molina C.P., Schnadig V.J. Anitschkow nuclear changes in postmortem pericardial scrapings. *Acta Cytol*. 2001; 45(2): 197-200.
15. Stehbins W.E., Zuccollo J.M. Anitschkow myocytes or cardiac histiocytes in human hearts. *Pathology*. 1999; 31(2): 98-101.

References

1. Deev R.V. Domestic experience of studying the effectiveness of the method of “cellular cardiomyoplasty” in the experiment. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2005; 1(1): 17-8. (in Russian)
2. Nepomnyashchikh L.M. *Pathological anatomy and ultrastructure of the heart: a Comprehensive morphological study of General pathological process in the myocardium. [Patologicheskaya anatomiya i ultrastruktura serdtsa: Kompleksnoye morfologicheskoye issledovanie obshchepatologicheskogo protsessa v miokarde*. Novosibirsk: Nauka. Sibirskoe otdelenie. 1981. (in Russian)

Сведения об авторах:

Лебедева Анна Ивановна, доктор биол. наук, ст. науч. сотр. отдела морфологии ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России; доцент каф. анатомии, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, e-mail: Jeol02@mail.ru;

Муслимов Сагит Ахатович, доктор мед. наук, вед. науч. сотр., зав. отделом морфологии ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России; доцент каф. анатомии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, e-mail: msagit@mail.ru;

Гареев Евгений Мусинович, канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр. лаб. нейрофизиологии ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России; Уфа, e-mail: gem46@list.ru;

Попов Сергей Валентинович, акад. РАН, заслуженный деятель науки РФ, директор ФГБНУ НИИ кардиологии «Томский НИМЦ», e-mail: psv@cardio-tomsk.ru;

Афанасьев Сергей Александрович, доктор мед. наук, зав. лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики ФГБНУ НИИ кардиологии «Томский НИМЦ», e-mail: cardio@cardio-tomsk.ru;

Кондратова Дина Степановна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики ФГБНУ НИИ кардиологии «Томский НИМЦ», e-mail: dina@cardio-tomsk.ru

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.18

Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Мухамадияров Р.А., Великанова Е.А.

Детекция окислительного стресса в артериальных эндотелиальных клетках человека при воздействии кальций-фосфатных бионов

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Кемерово, Россия, Сосновый бульвар, д. 6

Введение. Кальций-фосфатные бионы (КФБ) формируются в организме человека при перенасыщении сыворотки ионами кальция и фосфора и вызывают дисфункцию эндотелия, однако молекулярные механизмы нарушения функционирования эндотелия при воздействии КФБ не ясны. Цель исследования – выяснение роли кальций-фосфатных бионов различной формы в развитии окислительного стресса в артериальных эндотелиальных клетках (ЭК) человека.

Методика. Для детекции окислительного стресса к конфлюэнтным культурам первичных ЭК коронарной и внутренней грудной артерии человека добавляли равные концентрации КФБ сферической или игольчатой формы (СКФБ и ИКФБ соответственно) с последующим культивированием в течение 1 и 4 ч, добавлением флуоресцентных индикаторов окислительного стресса MitoSOX Red и CellROX Green и конфокальной микроскопией. Измеряли концентрацию продуктов перекисного окисления липидов в культуральной жидкости через 24 ч экспозиции эндотелиальных клеток КФБ. Анализ нейтрализации цитотоксических эффектов перекисного окисления липидов проводили путем добавления к ЭК супероксиддисмутазы и каталазы на 4 или 24 ч (одновременно с КФБ). Для сравнения механизмов клеточной гибели при воздействии СКФБ и ИКФБ анализировали цитотоксичность обоих типов бионов при одновременном воздействии лизосомального ингибитора бафиломицина А1.

Результаты. Значимого увеличения генерации активных форм кислорода (АФК) в результате экспозиции СКФБ (независимо от линии ЭК и продолжительности экспозиции) не было выявлено. В то же время наблюдалось повышение генерации супероксида через 4 ч, а иных свободных радикалов через 1 ч после добавления ИКФБ к ЭК. Предварительная нейтрализация АФК супероксиддисмутазой и каталазой частично защищала ЭК от индуцируемой ИКФБ гибели. При этом добавление бафиломицина А1 к ЭК частично защищало их от гибели только при воздействии СКФБ, но не ИКФБ.

Заключение. Гибель ЭК при воздействии СКФБ происходит в результате первичного повреждения лизосом, а при воздействии ИКФБ – в первую очередь вследствие окислительного стресса.

Ключевые слова: атеросклероз; бионы; гидроксипатит; эндотелиальные клетки; активные формы кислорода; супероксид; свободные радикалы; супероксиддисмутазы

Для цитирования: Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Мухамадияров Р.А., Великанова Е.А. Детекция окислительного стресса в артериальных эндотелиальных клетках человека при воздействии кальций-фосфатных бионов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 70-78.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.70-78

Для корреспонденции: Кутихин Антон Геннадьевич, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Кутихин А.Г., Шишкова Д.К.; сбор и обработка материала – Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Мухамадияров Р.А., Великанова Е.А.; подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка, написание текста, редактирование – Кутихин А.Г.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.02.2020

Принята в печать 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Mukhamadiyarov R.A., Velikanova E.A.

Detection of oxidative stress induced by calcium phosphate bions in human arterial endothelial cells

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
Sosnoviy Blvd. 6, Kemerovo 650002, Russian Federation

Background. Calcium phosphate bions (CPB) form in the human blood upon its supersaturation with calcium and phosphate and provoke endothelial dysfunction; however, the molecular mechanisms of these pathological processes remain unclear.

Aim. To elucidate the role of differently shaped CPBs in induction of oxidative stress in human arterial endothelial cells (ECs).

Methods. For detection of oxidative stress, equal concentrations of spherical CPB (CPB-S) or needle-shaped CPB (CPB-N) were added to confluent cultures of primary human coronary artery and internal thoracic artery ECs for 1 and 4 h; this was followed by MitoSOX Red and CellROX Green staining and subsequent confocal microscopy. Concentration of thiobarbituric acid-reactive substances was measured in the EC culture supernatant at 24 h of the CPB exposure. The lipid peroxidation cytotoxicity was neutralized by adding superoxide dismutase and catalase to ECs for 4 or 24 h. To compare cell death subroutines induced by CPB-S and CPB-N, the effect of bafilomycin A1, a lysosomal inhibitor, on CRB cytotoxicity was studied.

Results. No increase in reactive oxygen species generation was observed in the CPB-S exposure, regardless of the EC line and exposure duration. However, addition of CPB-N to ECs increased the production of superoxide and other free radicals after four- and one-hour exposure, respectively. Prior neutralization of reactive oxygen species with superoxide dismutase and catalase partially protected ECs from CPB-N- but not CPB-S-induced death while bafilomycin A1, *vice versa*, protected ECs from CPB-S- but not CPB-N-induced death.

Conclusion. CPB-S cause cell death due to primary damage of lysosomes whereas CPB-N induce apoptosis due to oxidative stress.

Keywords: atherosclerosis; bions; hydroxyapatite; endothelial cells; reactive oxygen species; superoxide; free radicals; superoxide dismutase

For citation: Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Mukhamadiyarov R.A., Velikanova E.A. Detection of oxidative stress induced by calcium phosphate bions in human arterial endothelial cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 70-78. (in Russian).
DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.70-78

For correspondence: Anton G. Kutikhin, Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory for Vascular Biology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6 Sosnovyy Bulevar, Kemerovo 650025, Russian Federation, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

Contribution: research concept and design – Kutikhin A.G., Shishkova D.K.; material collecting and processing – Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Mukhamadiyarov R.A., Velikanova E.A.; statistical processing, writing text, text editing – Kutikhin A.G. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgment. This study was supported by the Integrated Program of Basic Research of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences as a part of the Basic Research Topic of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases # 0546-2019-0002 «Pathogenetic justification for development of cardiovascular implants from biocompatible materials using a patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors».

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

Information about the authors:

Kutikhin A.G., <https://orcid.org/0000-0001-8679-4857>

Shishkova D.K., <https://orcid.org/0000-0002-1518-3888>

Mukhamadiyarov R.A., <https://orcid.org/0000-0002-5558-3229>

Received 23.02.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Известно, что выраженные нарушения минерального гомеостаза, характерные для хронической болезни почек, и «высокий нормальный» уровень ионов кальция и фосфора в крови ассоциирован с атеросклерозом и его клиническими проявлениями (ишемическим инсультом, ишемической болезнью сердца и заболеваниями периферических артерий) [1, 2]. Одним из механизмов поддержания минерального гомеостаза является формирование кальций-фосфат-

ных бионов (КФБ) – кристаллических наночастиц губчатой структуры, состоящих из гидроксипатита, карбонат-гидроксипатита и адсорбирующих различные белки сыворотки [3, 4].

Ранее было показано, что КФБ интернализируются эндотелиальными клетками (ЭК) [4] и оказываются в лизосомах, растворяясь в их кислой среде с последующим выделением в цитозоль опосредованно активирующей каспазы ионов кальция [5]. Последнее

способствует выделению ЭК провоспалительных цитокинов (интерлейкина-6 и интерлейкина-8) [4] и лизосомально-опосредованной гибели ЭК [5, 6], индуцируя формирование неointимы [4] и воспаление адвентиции аорты крыс Wistar.

В то же время, несмотря на продемонстрированные в экспериментах патогенные и специфичные эффекты КФБ для ЭК [4-6], остается неясным, способствует ли экспозиция КФБ (наряду с запуском эффекторных каспаз) параллельному процессу окислительного стресса в ЭК, являющегося неспецифичным молекулярным последствием воздействия цитотоксических факторов. Цель исследования – оценить роль КФБ в развитии окислительного стресса в артериальных ЭК человека.

Методика

Искусственный синтез магний-фосфатных бионов (МФБ), сферических КФБ (СКФБ) и игольчатых КФБ (ИКФБ) соответствовал ранее разработанным оригинальным протоколам [7, 8].

Культивирование эндотелиальных клеток. Для экспериментов были использованы коммерческие культуры первичных ЭК коронарной артерии (human coronary artery endothelial cells, HCAEC, Cell Applications, 300K-05a) и внутренней грудной артерии человека (human internal thoracic endothelial cells, HITAEC, 308K-05a), которые размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя в среде MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, 212-500). После 4-5 пассажей ЭК рассеивали в 8-луночные культуральные камеры (Ibidi, 80841) для проведения экспериментов.

Детекция КФБ в эндотелиальных клетках. С целью последующей визуализации КФБ в ЭК проводили конъюгирование осадка КФБ с раствором бычьего сыровоточного альбумина, меченного флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ-БСА, 5 мг/мл, Invitrogen, A23015). КФБ с ФИТЦ-БСА инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, после чего проводили повторное ультрацентрифугирование при 200,000 g в течение 1 ч с дальнейшей однократной отмывкой в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). К конфлюэнтным культурам HCAEC и HITAEC, культивируемым в 8-луночных культуральных камерах (Ibidi, 80841), добавляли 25 мкл суспензии ФИТЦ-КФБ (мутность суспензии 0,5 стандарта МакФарланда, что эквивалентно $OP_{650} = 0,08-0,10$) либо аналогичный объем ФИТЦ-БСА (2 ммоль/л, в качестве контроля) на 1 или 4 ч после чего добавляли лизосомальный краситель LysoTracker Red (Invitrogen, L7528, 500 нмоль/л) на 30 мин, ядерный краситель Hoechst 33342 (Invitrogen, H3570, 2 мкл/мл) на 15 мин

с последующей конфокальной микроскопией (LSM 700, Carl Zeiss).

Детекция супероксида в эндотелиальных клетках. Чтобы определить, вызывают ли бионы окислительный стресс в ЭК, к конфлюэнтным культурам HCAEC добавляли 25 мкл суспензии МФБ, СКФБ или ИКФБ (мутность суспензии 0,5 МкФ) на лунку 8-луночной культуральной камеры для конфокальной микроскопии (Ibidi, 80841). Далее проводили культивирование в течение 1 и 4 ч, добавляли на 15 мин флюоресцентный индикатор супероксида MitoSOX Red (Invitrogen, M36008, 5 мкмоль/л) и ядерный краситель Hoechst 33342 (Invitrogen, H3570, 2 мкл/мл) с последующей конфокальной микроскопией. Либо после 1 и 4 ч культивирования добавляли флюоресцентный индикатор свободных радикалов CellROX Green (Invitrogen, C10444, 5 мкмоль/л) на 30 мин и ядерный краситель Hoechst 33342 (Invitrogen, H3570, 2 мкл/мл) на 15 мин с дальнейшей конфокальной микроскопией. Здесь и далее в качестве контрольной группы использовали те же линии ЭК, к которым вместо бионов в аналогичном объеме добавляли стерильный ФСБ с последующим аналогичным временем культивирования.

Измерение концентрации продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой. Для определения уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) к конфлюэнтным культурам HCAEC и HITAEC (культивирование в течение 24 ч, 11 лунок на экспериментальную группу) добавляли суспензию МФБ, СКФБ или ИКФБ (100 мкл на лунку, мутность суспензии 0,5 МкФ). После инкубации из лунок забирали культуральную жидкость.

Концентрацию продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (ПР-ТБК) в культуральной жидкости измеряли путем добавления 1 мл ТБК (Sigma-Aldrich) и 3 мл H_3PO_4 (Sigma-Aldrich) к 250 мкл образца. После 1 ч инкубации при 100 °С и охлаждения при 8 °С в течение 5 мин для обогащения фракции ПР-ТБК добавляли 1 мл н-бутанола. После 10 мин центрифугирования при 3000 об/мин надосадок помещали в 96-луночные планшеты (100 мкл на лунку, каждый образец в 3 повторах) с последующим измерением при длине волны 450 нм (OP_{450}). Концентрацию ПР-ТБК в каждом образце далее рассчитывали путем деления показателя OP_{450} на коэффициент молярной экстинкции малонового диальдегида (0,156) и последующего умножения на фактор разведения образца (16).

Оценка эффективности нейтрализации активных форм кислорода. С целью анализа эффективности предотвращения цитотоксических эффектов ПОЛ к конфлюэнтным культурам HCAEC (культивирование в те-

чение 4 или 24 ч с добавлением или без добавления антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (250 ЕД/мл) или 500 ЕД/мл каталазы (12 лунок на экспериментальную группу)) добавляли суспензию МФБ, СКФБ или ИКФБ (10 мкл на лунку, мутность суспензии 0,5 МкФ). Супероксиддисмутазу и каталазу добавляли за 3 ч до экспозиции для обеспечения проникновения ферментов через плазматическую мембрану. Пролиферацию и жизнеспособность клеток оценивали колориметрически, добавляя реактив ab112118 (Abcam) на 4 ч, с последующими измерениями и расчетами по протоколу производителя.

Анализ проницаемости лизосом. Для анализа влияния ацидификации лизосом на цитотоксичность бионов к конфлюэнтным культурам НСАЕС в 96-луночных планшетах добавляли суспензию МФБ, СКФБ или ИКФБ либо аналогичный объем ФСБ (10 мкл, мутность суспензии 0,5 МкФ) на 4 или 24 ч с добавлением или без добавления бафиломицина А1 специфического ингибитора вакуолярной H^+ -АТФазы (Abcam, ab120497, 0,1 или 1 микромоляр). Пролиферацию и жизнеспособность клеток оценивали колориметрически путем добавления реактива ab112118 (Abcam) на 4 ч с последующими измерениями и расчетами по протоколу производителя.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных выполняли при помощи программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Межгрупповое сравнение проводили по критерию Краскела-Уоллиса или критерию Манна-Уитни в зависимости от числа групп. В случае выявления статистически значимых

межгрупповых различий осуществляли попарное сравнение групп посредством метода средней доли ложных отклонений гипотез. Различия между группами признавали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

При конфокальной микроскопии через 1 ч после добавления конъюгированных с ФИТЦ-БСА КФБ в значительной доле артериальных ЭК было обнаружено желтое свечение, отображающее начало процесса интернализации ФИТЦ-КФБ (зеленое свечение) в лизосомы (LysoTracker Red, красное свечение). Однако также было выражено и чисто зеленое свечение, свидетельствующее либо о локализации ФИТЦ-КФБ в цитозоле ЭК после их поглощения, либо о высвобождении ФИТЦ из лизосом после дезинтеграции КФБ в кислой лизосомальной среде (рис. 1). Через 4 ч после добавления ФИТЦ-КФБ к ЭК детектировалось исключительно зеленое свечение ФИТЦ-БСА, что указывает в пользу интернализации и растворения за 4 ч основной массы КФБ в лизосомах (рис. 1). Данная картина наблюдалась в обеих линиях ЭК, что свидетельствует о типовом клеточном ответе на воздействие КФБ и об отсутствии выраженных различий в интернализации КФБ различными типами ЭК.

Далее для анализа патогенного действия бионов на артериальные ЭК были взяты только культуры НСАЕС. В результате окрашивания митохондриальным красителем и детектором супероксида MitoSOX Red было визуализировано интенсивное красное свечение в ЭК, подвергшихся 4-часовому воздействию СКФБ и

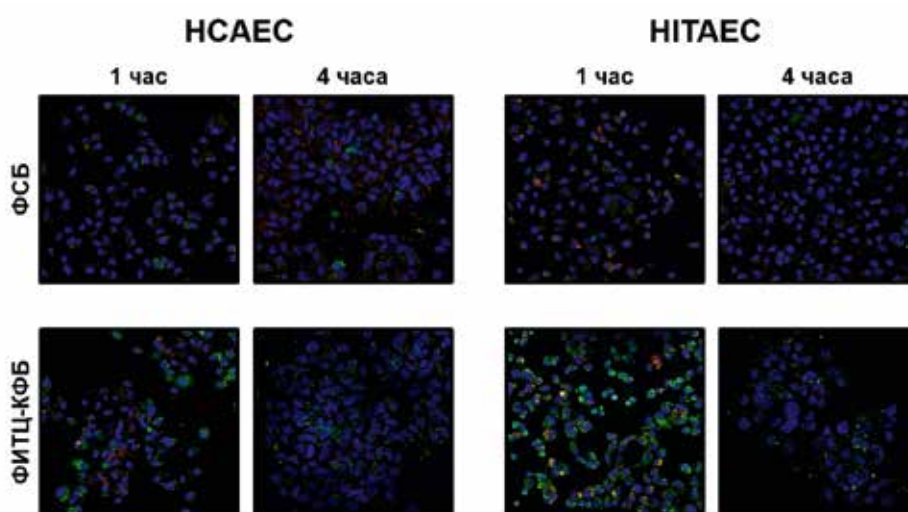


Рис. 1. Конфокальная микроскопия НСАЕС и НИТАЕС, подвергшихся воздействию ФИТЦ-КФБ в течение 1 или 4 ч и окрашенных лизосомальным красителем LysoTracker Red и ядерным красителем Hoechst 33342. $\times 200$. (Описание в тексте).

ИКФБ, что отражает повышенную генерацию супероксида в митохондриях при экспозиции бионами в сравнении с контрольными и инкубированными с безвредными МФБ ЭК (рис. 2).

При окрашивании ЭК флуоресцентным детектором свободных радикалов CellROX Green характерное яркое зеленое свечение было отмечено в ЭК, инкубированных с ИКФБ спустя 1 ч, но через 4 ч данный эффект не обнаруживался, как и в остальных группах (рис. 3).

Определение уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПР-ТБК), образующихся в результате окислительного стресса в культуральной жидкости, не выявило статистически значимых различий между

контрольными ЭК и ЭК, подвергшимися воздействию бионов, что указывало на отсутствие выраженных признаков окислительного стресса при воздействии КФБ (рис. 4).

Добавление антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы не препятствовало индуцируемой СКФБ клеточной гибели независимо от используемой дозы и продолжительности экспозиции бионами, хотя в отношении ИКФБ на временной точке 4 ч данное фармакологическое воздействие повышало количество жизнеспособных ЭК (рис. 5). В целом это согласуется с данными, полученными в результате выявления флуоресцентными метками суперокси-

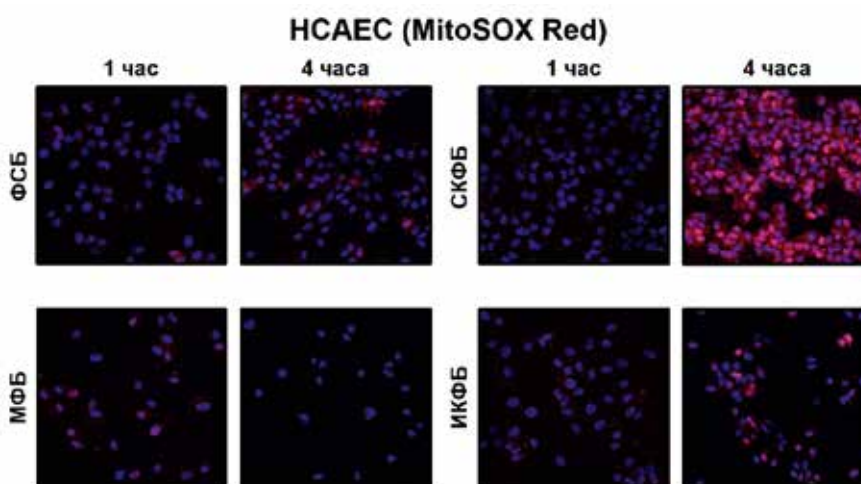


Рис. 2. Конфокальная микроскопия HCAEC, подвергшихся воздействию ФСБ, МФБ, СКФБ и ИКФБ в течение 1 или 4 ч и окрашенных митохондриальным красителем и индикатором супероксида MitoSOX Red и ядерным красителем Hoechst 33342. $\times 200$. (Описание в тексте).

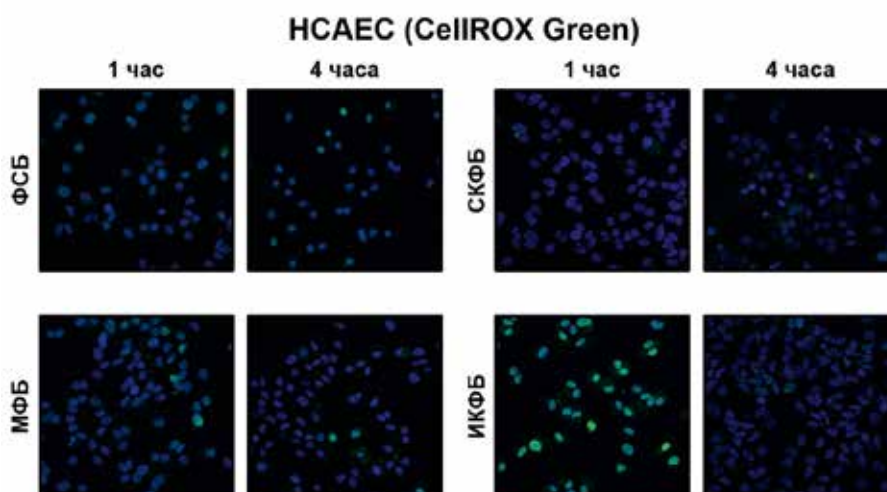


Рис. 3. Конфокальная микроскопия культур HCAEC, подвергшихся ФСБ, МФБ, СКФБ и ИКФБ в течение 1 или 4 ч и окрашенных флуоресцентным детектором свободных радикалов в клетке CellROX Green и ядерным красителем Hoechst 33342. $\times 200$. (Описание в тексте).

да и иных свободных радикалов (повышение генерации супероксида и уровня свободных радикалов при воздействии ИКФБ в течение 4 ч и 1 ч соответственно). Таким образом, можно заключить, что ИКФБ, в отличие от СКФБ, провоцируют развитие окислительного стресса в ЭК.

Поскольку СКФБ и ИКФБ различаются по способности вызывать окислительный стресс в ЭК, было выдвинуто предположение о различных механизмах их цитотоксического действия. В частности, ранее

нашей группой было показано, что при растворении СКФБ в лизосомах происходит выделение ионов кальция в цитозоль, приводящее к повышению проницаемости внешней мембраны митохондрий и опосредованной активации каспазы-9 и каспазы-3 [5]. Воздействие специфического блокатора вакуолярной Н⁺-АТФазы бафиломицина А1, нейтрализующего кислую среду лизосом, частично спасало клетки от лизосомально-опосредованной клеточной гибели вследствие снижения растворимости СКФБ и,

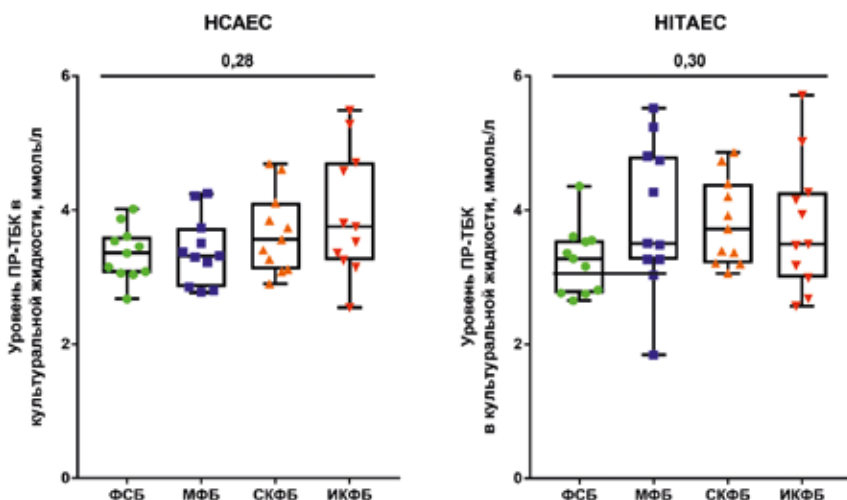


Рис. 4. Измерение уровня продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой, отражающих активность ПОЛ в культурах HCAEC и HITAEC, подвергшихся воздействию ФСБ, МФБ, СКФБ и ИКФБ в течение 24 ч.

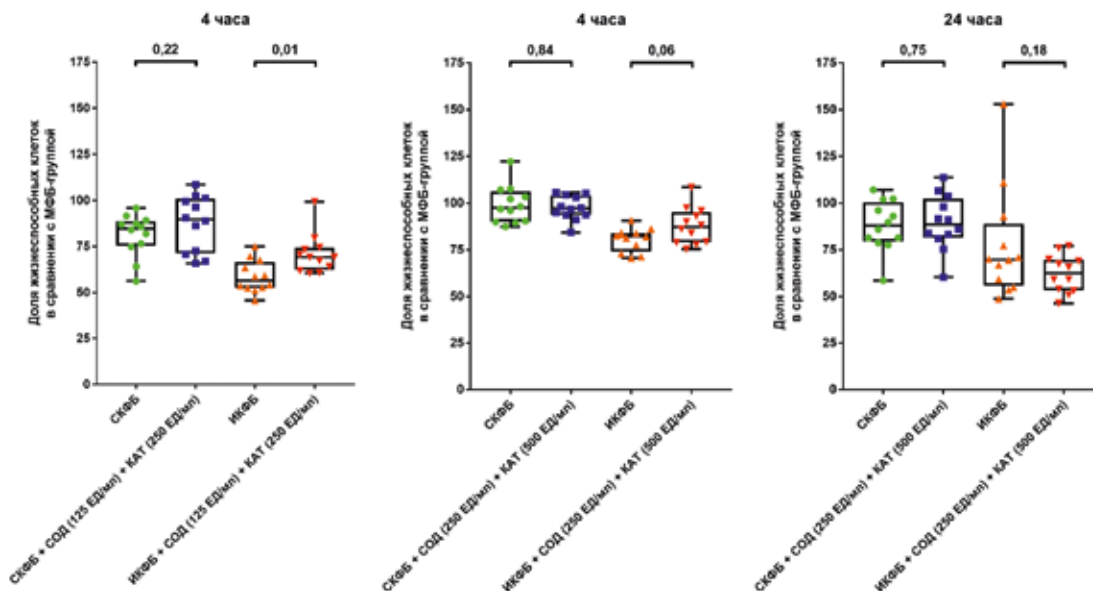


Рис 5. Оценка цитотоксичности СКФБ и ИКФБ для культур HCAEC, в том числе при добавлении супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ) в различных дозах и в различных временных точках.

соответственно, уменьшения выхода ионов кальция и цитозоль [5].

Было решено проанализировать, работает ли этот механизм аналогично по отношению к ИКФБ. В отличие от описанного выше релевантного для СКФБ сценария воздействие бафиломицина А1 повышало долю жизнеспособных ЭК лишь в одном эксперименте из трех (рис. 6). Таким образом, если при воздействии СКФБ на ЭК ведущим механизмом цитотоксического действия было первичное повреждение лизосом при ограниченном нарушении функционирования митохондрий, то при экспозиции ЭК ИКФБ наблюдалась противоположная картина.

Обсуждение

Наряду с лизосомально-опосредованной клеточной гибелью, сопровождающейся первичным повреждением (включая пермеабиллизацию) лизосом, выделением ионов кальция и/или катепсинов в цитозоль и последующим повышением проницаемости внешней мембраны митохондрий с дальнейшей конвергенцией с внутренним путем апоптоза [9], важным связанным с митохондриями молекулярным механизмом клеточной гибели является окислительный стресс (так называемый «кислородный взрыв») [10]. Это является классическим следствием интернализации наночастиц

вследствие обильной продукции активных форм кислорода (АФК) в митохондриях, эндоплазматической сети, пероксисомах, фагосомальной и плазматической мембране [10]. Относительный вклад каждого из этих источников в общий пул генерируемых АФК существенно варьирует между различными типами клеток и тканей и технически сложно измерим [11]. Стоит подчеркнуть, что, несмотря на вовлеченность митохондрий в оба указанных механизма нарушения клеточного функционирования, при лизосомально-опосредованной клеточной гибели их патология является строго вторичной, в то время как при окислительном стрессе АФК сразу же воздействуют на митохондрии напрямую, поскольку АФК в значительном количестве образуются в этих органеллах. Поэтому, учитывая последние рекомендации Комитета по номенклатуре механизмов клеточной гибели [9], правомерно говорить о том, что лизосомально-опосредованная клеточная гибель и запускаемый АФК внутренний путь апоптоза (несмотря на их молекулярную конвергенцию на стадии повышения проницаемости внешней мембраны митохондрий) патогенетически являются принципиально разными путями гибели клетки. Следует отметить, что некоторые АФК, в особенности гидроксил-радикалы образующиеся при реакции Фентона из пероксида водорода, способны дестабилизировать ли-

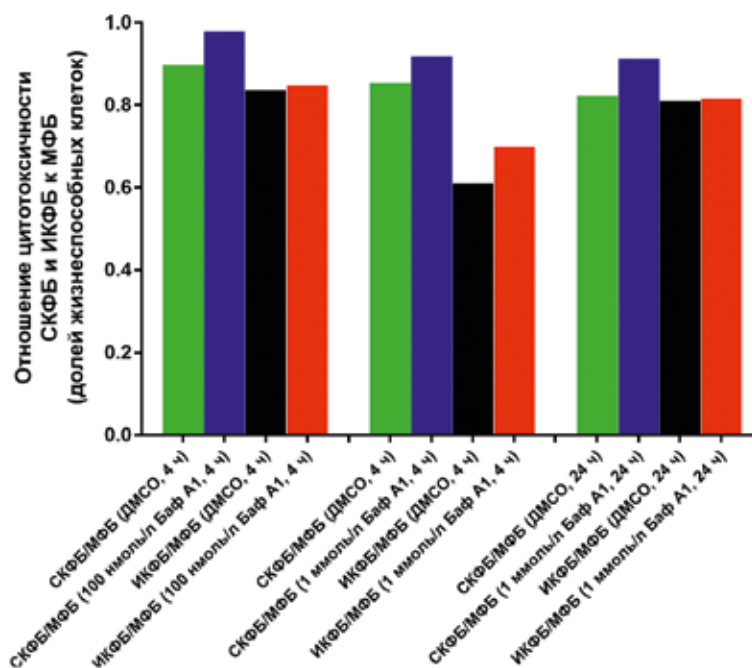


Рис. 6. Сравнительный анализ эффективности блокатора вакуолярной H^+ -АТФазы (лизосомального ингибитора) бафиломицина А1 в снижении цитотоксичности СКФБ и ИКФБ.

зосомальную мембрану, а также открывать лизосомальные кальциевые каналы [9]; таким образом, справедливо говорить и о частичной пересекаемости данных путей нарушения внутриклеточного гомеостаза.

В одном из выполненных исследований с использованием аналогичного метода (окрашивание флуоресцентным индикатором супероксида MitoSOX) было выявлено, что экспозиция КФБ повышала выделение АФК иммортализованными макрофагами человека [12]. В другой работе данные результаты были воспроизведены на иммортализованных макрофагах мыши посредством измерения внутриклеточного 8-изопростагландина F_{2α} [13] – суррогатного маркера свободнорадикального окисления. В нашем исследовании были получены противоречивые результаты. С одной стороны, воздействие СКФБ определенно не сопровождалось развитием выраженного окислительного стресса независимо от метода его детекции. В то же время добавление ИКФБ к культурам ЭК стимулировало генерацию супероксида и свободных радикалов, хотя и с разной временной динамикой; кроме того, предварительная инкубация с супероксиддисмутазой и каталазой независимо от дозы частично спасала ЭК от индуцируемой ИКФБ клеточной гибели.

Это позволяет предположить, что генерация АФК не играет критически важной роли в клеточной гибели после интернализации СКФБ (в отличие от первичного повреждения лизосом), однако может вносить вклад в патогенные эффекты ИКФБ, по крайней мере для ЭК. Приоритет первичного повреждения лизосом над окислительным стрессом для опосредованной СКФБ клеточной гибели и обратная ситуация для ИКФБ свидетельствуют о различных механизмах клеточной гибели при воздействии КФБ различной формы на клетку, что частично подтверждается данными литературы, в которых ИКФБ преимущественно способствовали выделению фактора некроза опухоли альфа, а СКФБ – интерлейкина-1β, что может быть связано с более высокой растворимостью СКФБ в лизосомах и более выраженной активацией инфламмасом, зависимой от уровня кальция в цитозоле [14].

Стоит отметить, что образование АФК активно вовлечено в процесс клеточной гибели, вызываемой воздействием стандартной неорганической наноразмерной фракции фосфата кальция [15], что в любом случае не позволяет однозначно исключить окислительный стресс из механизмов цитотоксичности КФБ. Тем не менее, бионы принципиально отличаются от чистых неорганических кристаллов фосфата кальция наличием белковой составляющей, снижающей их цитоток-

сичность, так как они изначально формируются исключительно в биологических жидкостях (к примеру, сыворотке крови) [3, 4]. Вследствие этого их эффекты, в частности, для ЭК, могут отличаться.

Заключение

Предполагается, что патогенность СКФБ для ЭК определяется в первую очередь лизосомально-опосредованной гибелью, а ИКФБ – окислительным стрессом.

Литература

(п.п. 1-4; 9-15 см. References)

1. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Мухамадияров Р.А., Южалин А.Е., Кудрявцева Ю.А., Попова А.Н. и др. Изучение механизма специфичной эндотелиотоксичности кальций-фосфатных бионов. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39(4): 12-21.
2. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Кутихин А.Г. Специфичная токсичность кальций-фосфатных бионов для культур венозных и артериальных эндотелиальных клеток человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(1): 53-61.
3. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Малышева В.Ю., Колмыков Р.П. и др. Морфологическая и химическая характеристика магний-фосфатных и кальций-фосфатных бионов. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019; 4(2): 6-16.
4. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Малышева В.Ю., Колмыков Р.П. и др. Сравнение морфологических и химических свойств сферических и игольчатых кальций-фосфатных бионов. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2019; 8(1): 59-69.

References

1. Foley R.N., Collins A.J., Ishani A., Kalra P.A. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J*. 2008; 156(3): 556-63.
2. Larsson T.E., Olauson H., Hagström E., Ingelsson E., Arnlöv J., Lind L., et al. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30(2): 333-9.
3. Wu C.Y., Young L., Young D., Martel J., Young J.D. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One*. 2013; 8(9): e75501.
4. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., et al. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci Rep*. 2016; 6: 27255.
5. Shishkova D.K., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Yuzhalin A.E., Kudryavtseva Yu.A., Popova A.N., et al. Lysosome-dependent cell death defines specific endothelial toxicity of calcium phosphate bions. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*. 2019; 39(4): 12-21. (in Russian)
6. Shishkova D.K., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G. Specific toxicity of calcium phosphate bions for human venous and arterial endothelial cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya Terapiya*. 2019; 1(63): 53-6. (in Russian)

7. Shishkova D.K., Glushkova T.V., Efimova O.S., Popova A.N., Malyshova V.Y., Kolmykov R.P., et al. Morphological and chemical characterization of magnesium phosphate and calcium phosphate bions. *Fundamentalnaya i klinicheskaya meditsina*. 2019; 2(4): 6-16. (in Russian)
8. Shishkova D.K., Glushkova T.V., Efimova O.S., Popova A.N., Malyshova V.Yu., Kolmykov R.P., et al. Morphological and chemical properties of spherical and needle calcium phosphate bions. *Kompleksnye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy*. 2019; 1(8): 59-69. (in Russian)
9. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018; 25(3): 486-541.
10. Dupre-Crochet S., Erard M., Nüsse O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol*. 2013; 94(4): 657-70.
11. Brown G.C., Borutaite V. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion*. 2012; 12(1): 1-4.
12. Peng H.H., Wu C.Y., Young D., Martel J., Young A., Ojcius D.M. et al. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. *Small*. 2013; 9(13): 2297-307.
13. Smith E.R., Hanssen E., McMahon L.P., Holt S.G. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One*. 2013; 8(4): e60904.
14. Koppert S., Büscher A., Babler A., Ghallab A., Buhl E.M., Latz E. et al. Cellular Clearance and Biological Activity of Calciprotein Particles Depend on Their Maturation State and Crystallinity. *Front Immunol*. 2018; 9: 1991.
15. Pujari-Palmer S., Chen S., Rubino S., Weng H., Xia W., Engqvist H., et al. In vivo and in vitro evaluation of hydroxyapatite nanoparticle morphology on the acute inflammatory response. *Biomaterials*. 2016; 90: 1-11.

Сведения об авторах:

Кутихин Антон Геннадьевич, канд. мед. наук, зав. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отд. экспериментальной медицины, e-mail: antonkutikhin@gmail.com;

Шишкова Дарья Кирилловна, канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отд. экспериментальной медицины, e-mail: shishkovadk@gmail.com;

Мухамадияров Ринат Авхадиевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отд. экспериментальной медицины, e-mail: rem57@rambler.ru;

Великанова Елена Анатольевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий отд. экспериментальной медицины, e-mail: velikanova_ea@mail.ru

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.718.4-001-097-085.834

Абрамов К.С., Давыдова Е.В., Осиков М.В., Огнева О.И., Сеницкий А.И.

Динамика изменений показателей свободно-радикального окисления при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 545092, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64

Введение. Изолированные переломы бедренной кости (ИПБК) составляют более 10% от числа всех дорожных травм. Реакция организма в ответ на травму сопровождается нарушением гомеостаза, активацией процессов свободно-радикального окисления. Одним из перспективных направлений коррекции метаболических нарушений при хирургической патологии является озонотерапия.

Цель исследования – оценка в динамике показателей свободно-радикального окисления в плазме крови у пациентов с изолированным переломом бедренной кости в условиях применения системной озонотерапии.

Методика. Исследование выполнено на 36 пациентах с ИПБК и 20 условно здоровых лицах. Содержание изопропанол- и гептан-растворимых первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме оценивали на 5-7-е сут после травмы до начала хирургического лечения, а также на 18-е сут после травмы, хирургического лечения и стандартного курса терапии, в том числе дополненного курсом малой аутогемотерапии (МАГТ), – 7-9 инъекций с озонированием крови (концентрация озона 20 мг/л).

Результаты. Ранний посттравматический период у пациентов с ИПБК до оперативного лечения сопровождается накоплением первичных (диеновые конъюгаты), вторичных (ацилгидроперекиси, кетодиены и сопряженные триены) и конечных (основания Шиффа) продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта плазмы, а также вторичных и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы. У пациентов с ИПБК после оперативного лечения на фоне стандартной консервативной терапии сохраняется высокий уровень продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта плазмы, что свидетельствует об эскалации окислительного стресса. Применение процедуры МАГТ с озонированием крови приводит к снижению и полному восстановлению уровня продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе, снижению и частичному восстановлению продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта плазмы.

Заключение. Применение МАГТ с озонированием крови оптимизирует состояние про- и антиоксидантных систем крови и ограничивает эскалацию окислительного стресса.

Ключевые слова: изолированный перелом бедренной кости; свободно-радикальное окисление; озонотерапия

Для цитирования: Абрамов К.С., Давыдова Е.В., Осиков М.В., Огнева О.И., Сеницкий А.И. Динамика изменений показателей свободно-радикального окисления при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 79-85.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.79-85

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Осиков М.В., Давыдова Е.В., Абрамов К.С.; сбор и обработка материала – Абрамов К.С., Давыдова Е.В., Сеницкий А.И.; статистическая обработка – Давыдова Е.В., Абрамов К.С.; написание текста – Осиков М.В., Давыдова Е.В., Абрамов К.С., Огнева О.И.; редактирование – Давыдова Е.В., Огнева О.И.;

Для корреспонденции: *Огнева Ольга Игоревна*, ognevaolga2@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.05.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Abramov K.S., Davydova E.V., Osikov M.V., Ogneva O.I., Sinickij A.I.

Changes in free-radical oxidation in isolated femoral fracture during the systemic ozone therapy

South Ural State Medical University,
Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk 545092, Russia

Introduction. Isolated femoral fractures (IFF) account for more than 10% of all road injuries. The body responds to trauma with homeostatic disorders and activation of free radical oxidation. The ozone therapy is one of promising directions for correction of metabolic disorders in surgical pathology due to the pleiotropic effects of reactive oxygen species.

The aim of the study was to evaluate changes in indexes of free radical oxidation in plasma of patients with isolated femoral fracture during the systemic ozone therapy.

Methods. The study included 36 patients with IFF and 20 healthy individuals. Plasma concentrations of isopropanol and heptane-soluble primary, secondary, and end products of lipid peroxidation (LPO) were measured at 5-7 days after the injury, prior to the surgical treatment, and at 18 days after the injury following the surgical treatment and a standard therapy, including a course of minor autohemotherapy (7-9 injections of ozonated blood with ozone concentration of 20 mg/l).

Results. The early post-traumatic period preceding the surgical treatment was associated with accumulation of LPO primary (conjugated dienes), secondary (ketodienes, and conjugated trienes) and end (Schiff bases) products in the heptane phase of plasma lipid extract, as well as LPO secondary and end products in the isopropanol phase of plasma lipid extract. In patients with IFF after the surgical treatment in combination with a standard, conservative therapy, high levels of LPO products remained in the heptane and isopropanol phases of plasma lipid extract, which indicated escalation of oxidative stress. The use of minor autohemotherapy with blood ozonation resulted in a decrease and complete restoration of the level of LPO products in the isopropanol phase and a decrease and partial return to the normal level of LPO products in the heptane phase of plasma lipid extract.

Conclusions. The use of minor autohemotherapy with blood ozonation improved the condition of pro- and antioxidant blood systems and restricted the escalation of oxidative stress.

Keywords: isolated femoral fracture; free radical oxidation; ozone therapy

For citation: Abramov K.S., Davydova E.V., Osikov M.V., Ogneva O.I., Sinitskij A.I. Changes in free-radical oxidation in isolated femoral fracture during the systemic ozone therapy. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 79-85. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.79-85

Contribution: study concept and design – Osikov M.V., Abramov K.S., Davydova E.V.; material collection and processing – Abramov M.V., Davydova E.V., Sinickij A.I.; statistical analysis – Osikov M.V., Davydova E.V., Abramov K.S.; text writing – Osikov M.V., Davydova E.V., Abramov K.S., Ogneva O.I.; editing – Ogneva O.I., Davydova E.V.

For correspondence: *Olga I. Ogneva*, South-Ural State Medical University Ministry of Health of the Russian Federation, Department of Pathophysiology, Assistant Professor (docent), Candidate of Medical Sciences, e-mail ognevaolga2@mail.ru

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

Abramov K.S., <https://orcid.org/0000-0002-7419-2987>

Davydova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-9293-1691>

Osikov M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6487-9083>

Ogneva O.I., <https://orcid.org/0000-0002-9309-2076>

Sinickij A.I., <https://orcid.org/0000-0001-5687-3976>

Received 13.05.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

На долю переломов бедренной кости приходится более 10% от всех дорожных травм, частота таких переломов от 1 до 3 млн человек в год [1]. Реакция организма в ответ на травму заключается в немедленной активации нейро-иммуно-эндокринного комплекса и сопровождается нарушением гомеостаза, развитием воспаления, нарушением тканевой перфузии, метаболическими нарушениями и активацией процессов СРО

[2]. Нейтрофилы первыми мигрируют в очаг травматического повреждения, генерируют активные формы кислорода (АФК) запускают активацию комплемента, кининов и коагуляционного каскада [3]. Повышение уровня продуктов свободно-радикального окисления липидов и белков приводит к развитию окислительного стресса и вторичному повреждению тканей. Экспериментальные результаты показали, что озон и его ак-

тивные дериваты *ex vivo* или *in vivo* могут активировать мишень – ядерный эритроидный фактор (Nrf2) и индуцировать протеомный ответ клетки в виде синтеза антиоксидантных ферментов, например, супероксиддисмутазы, каталазы, гемоксигеназы-1 [4]. Активизация антиоксидантных ферментов обеспечивает защиту клеток и тканей от повреждения, способствует ограничению зоны вторичной альтерации и индуцирует репаративные реакции со стороны костной ткани. Обсуждается роль альдегид 4–гидроксиноненаля, образующегося под влиянием молекулы озона и являющегося неклассическим вторичным мессенджером, способным модулировать основные метаболические внутриклеточные сигналы (регуляция пролиферации и дифференцировки, синтез Nrf2 и антиоксидантных ферментов) [5].

Цель исследования – оценка динамики показателей свободно-радикального окисления в плазме у пациентов с изолированным переломом бедренной кости в условиях применения системной озонотерапии.

Методика

В исследовании приняли участие 36 пациентов мужского пола с изолированным переломом бедренной кости (ИПБК), средний возраст $45,5 \pm 3,4$ года, находящихся на лечении в отделении травматологии и ортопедии №2 ГБУЗ Челябинская областная клиническая больница на основании добровольного информированного согласия. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол №3 от 15.03.2019г). Контрольную группу составили условно здоровые мужчины, средний возраст $47,5 \pm 4,2$ года (группа 1, $n=20$). У всех пациентов на 5–7-е сут после травмы до начала хирургического лечения брали кровь для биохимического исследования (группа 2, $n=36$). Сразу после хирургического лечения (7-е сут после травмы) методом простой рандомизации пациенты 2-й группы были разделены на 2 подгруппы: 2-а подгруппа пациентов ($n=18$) получала стандартный курс послеоперационной терапии, включающий нестероидные противовоспалительные препараты и антибиотики; 2-б подгруппа ($n=18$) в дополнение к стандартному послеоперационному лечению получала озонотерапию в виде процедуры малой аутогемотерапии (МАГТ) на озонотерапевтической автоматической установке с деструктором озона УОТА-60-01 «Медозон» (ООО «Медозон», Москва). Концентрация озона в озонкислородной смеси составляла 20 мг/л в 10 мл венозной крови, которую вводили внутримышечно, в ягодичную или бедренную область [6]. Курс озонотерапии составил 7–9 инъекций через сутки. Сра-

зу после окончания курса МАГТ (18-е сут после травмы) в обеих подгруппах осуществляли забор венозной крови для биохимического исследования. Содержание изопропанол- и гептан-растворимых первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме оценивали по методике И.А. Волчегорского и соавт. с использованием экстрационно-спектрофотометрического метода [7, 8]. К 0,5 мл субстрата добавляли 5 мл смеси гептан – изопропанол, встряхивали в закрытых пробирках 15 мин, центрифугировали 15 мин при 3 000 об/мин, липидные экстракты сливали и разбавляли 5 мл смеси гептан – изопропанол (3:7 по объему). К разбавленным липидным экстрактам добавляли водный раствор соляной кислоты (рН 2,0) в объеме 2 мл для разделения фаз и отмывки от нелипидных примесей. После отделения водной фазы изопропанольную фазу экстракта переносили в отдельную пробирку. Измеряли оптическую плотность каждой фазы против соответствующего контроля при 220 нм (в диапазоне 186 – 225 нм поглощение отражает изолированные двойные связи), 232 нм (поглощение отражает содержание диеновых конъюгатов – первичные продукты), 278 нм (поглощение зависит от содержания кетодиенов и сопряженных триенов – вторичные продукты). Конечные продукты ПОЛ (основания Шиффа) определяли путем дополнительного замера оптической плотности экстракта при 400 нм. Результаты выражали в единицах абсолютных значений E_{220} , E_{232} , E_{278} , E_{400} на мл субстрата и в единицах индексов окисления (е.и.о.): E_{232}/E_{220} – относительное содержание диеновых конъюгатов (ДК), E_{278}/E_{220} – уровень кетодиенов и сопряженных триенов (КД и СТ) и E_{400}/E_{220} – уровень оснований Шиффа (ШО).

Статистическая обработка материала проводилась с применением пакета прикладных программ IBMSPSS Statistics 19. Все показатели представлены в формате «Me (Q25 – Q75)», где Me – медиана, Q25 и Q75 – значения нижнего и верхнего квартиля соответственно. Сравнение групп проводили с помощью критерия Вилкоксона для связанных групп, критериев Краскела-Уоллиса, Манна–Уитни.

Результаты

На 7-е сут после травматического повреждения бедренной кости (группа 2) в гептановой фазе липидного экстракта плазмы, концентрирующей большую часть резервных липидов (триацилглицеридов), выявлено в абсолютных величинах снижение вторичных и конечных, накопление первичных продуктов ПОЛ (табл. 1). В пересчете на более информативный (с учетом содержания общих липидов) показатель – индекс

окисления — обнаружено значимое увеличение содержания первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта плазмы.

Оценка содержания продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе плазмы крови, аккумулирующей в основном мембранные фосфолипиды, показала увеличение вторичных и конечных продуктов ПОЛ в абсолютных величинах (табл. 2). В пересчете на индексы окисления уровень кетодиенов и сопряженных триенов (вторичных продуктов) и оснований Шиффа (конечных продуктов) на фоне травмы также был значимо выше показателей контрольной группы.

После оперативного лечения и курса стандартной терапии (подгруппа 2-а) на 18-е сут после перелома обнаружены изменения параметров ПОЛ в плазме, аналогичные таковым в группе 2 (табл. 1, 2). В гептановой фазе липидного экстракта плазмы в пересчете на индексы окисления увеличивалось содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ, в изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы значи-

мо возростал уровень вторичных и конечных продуктов ПОЛ по сравнению с контрольной группой. Статистически значимых отличий содержания продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта плазмы в группах 2 и 2а не обнаружено ($p>0,05$). Таким образом, после оперативного вмешательства на фоне стандартного консервативного лечения в плазме сохраняется высокий уровень продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта, что свидетельствует об эскалации окислительного стресса у пациентов с изолированным переломом бедренной кости.

Применение курса МАГТ с озонированием крови (подгруппа 2-б) у пациентов с изолированным переломом бедренной кости после оперативного вмешательства привело в гептановой фазе липидного экстракта плазмы к снижению абсолютного содержания диеновых конъюгатов, оснований Шиффа, в пересчете на индексы окисления — к снижению диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов, а также фракции

Таблица 1

Содержание продуктов ПОЛ в гептановой фазе плазмы пациентов с ИПБК (Ме (Q_{25} - Q_{75}))

Показатели	Группа 1 (n=20)	Группа 2 (n=36) 7-е сут ИПБК	Подгруппа 2-а (n=18) 18-е сут ИПБК	Подгруппа 2-б (n=18) 18-е сут ИПБК
E220, у.е./мл	0,60 (0,58-0,60)	0,39 (0,34-0,43)	0,42 (0,38-0,46)	0,40 (0,39-0,42)
$p_{1-2}<0,01; p_{1-2a}<0,01; p_{1-2b}<0,01$				
E232, у.е./мл	0,12 (0,11-0,13)	0,29 (0,25-0,33)	0,31 (0,30-0,36)	0,14 (0,10-0,15)
$p_{1-2}<0,01; p_{2-2b}<0,01; p_{2a-2b}<0,01$				
E278, у.е./мл	0,09 (0,06-0,11)	0,04 (0,03-0,06)	0,04 (0,03-0,07)	0,06 (0,04-0,07)
$p_{1-2}<0,01; p_{1-2a}<0,01$				
E400, у.е./мл	0,006 (0,001-0,010)	0,03 (0,01-0,06)	0,04 (0,01-0,09)	0,010 (0,001-0,010)
$p_{1-2}<0,01; p_{1-2a}<0,01; p_{2-2b}<0,01; p_{2a-2b}<0,01$				
ДК, е.и.о.	0,19 (0,17-0,25)	0,78 (0,75-0,82)	0,82 (0,78-0,85)	0,34 (0,25-0,36)
$p_{1-2}<0,01; p_{1-2a}<0,01; p_{1-2b}<0,01; p_{2-2b}<0,01; p_{2a-2b}<0,01$				
КД и СТ, е.и.о.	0,11 (0,09-0,13)	0,16 (0,09-0,20)	0,18 (0,08-0,21)	0,12 (0,01-0,15)
$p_{1-2}<0,01; p_{1-2a}<0,01; p_{2-2b}<0,01; p_{2a-2b}<0,01$				
ШО, е.и.о.	0,010 (0,001-0,01)	0,09 (0,02-0,13)	0,10 (0,05-0,14)	0,02 (0,02-0,03)
$p_{1-2}<0,01; p_{1-2a}<0,01; p_{1-2b}<0,01; p_{2-2b}<0,01; p_{2a-2b}<0,01$				

Примечание. p — показатель значимости различий между группами.

оснований Шиффа при сравнении с группой пациентов с изолированным переломом бедренной кости после оперативного вмешательства, находящихся на стандартной терапии (табл. 1). В изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы применение курса МАГТ с озонированием крови приводит к снижению абсолютного содержания и в пересчете на индексы окисления кетодиенов и сопряженных триенов, а также оснований Шиффа (табл. 2). Отметим, что после применения курса МАГТ с озонированием крови снижалось содержание продуктов ПОЛ в плазме и по сравнению с группой 2 - пациентов с изолированным переломом бедренной кости до начала хирургического и консервативного лечения: первичных, вторичных, конечных продуктов в гептановой фазе, вторичных продуктов в изопропанольной фазе в пересчете на индексы окисления. И так, включение в комплекс консервативных мероприятий в послеоперационном периоде курса МАГТ с озонированием крови приводит к снижению содержания продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта плазмы и ограничению эскалации окислительного стресса в крови. При сравнении показателей ПОЛ в плазме в группе 2-б с контрольной группой условно здоровых лиц выявлены статистически зна-

чимые отличия только в отношении первичных и конечных продуктов в гептановой фазе липидного экстракта в пересчете на индексы окисления, остальные показатели не имели значимых отличий, что позволяет говорить о полном восстановлении уровня продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе и частичном восстановлении в гептановой фазе липидного экстракта плазмы после применения курса МАГТ с озонированием крови.

Обсуждение

Известно, что в первые минуты и часы после травмы в очаг травматического повреждения мигрируют нейтрофилы и вызывают повышение концентрации провоспалительных цитокинов и НАДФН-зависимую генерацию АФК [9]. Именно нейтрофилы претендуют на роль основных источников АФК, избыточная продукция которых индуцирует окислительный стресс, способствуя расширению зоны вторичной альтерации в зоне перелома бедра [10]. Кроме негативных последствий окислительного стресса следует учитывать и регуляторную функцию АФК, заключающуюся в активации MAP-киназ: экстрацеллюлярных сигнал-регулируемых (ERK), Jun – киназ (JNKs), p38 MAPK,

Таблица 2

Содержание продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе плазмы пациентов с ИПБК (Ме (Q₂₅-Q₇₅))

Показатели	Группа 1 (n=20)	Группа 2 (n=36) 7-е сут ИПБК	Группа 2-а (n=18) 18-е сут ИПБК	Группа 2-б (n=18) 18-е сут ИПБК
E220, у.е./мл	0,39 (0,34-0,43)	0,48 (0,27-0,70)	0,45 (0,29-0,68)	0,46 (0,35-0,55)
E232, у.е./мл	0,22 (0,22-0,23)	0,26 (0,16-0,37)	0,26 (0,16-0,39)	0,24 (0,1-0,32)
E278, у.е./мл	0,02 (0,01-0,03)	0,12 (0,08-0,17)	0,13 (0,08-0,18)	0,04 (0,02-0,05)
$p_{1-2} < 0,01; p_{1-2a} < 0,01; p_{2-26} < 0,01; p_{2a-26} < 0,01$				
E400, у.е./мл	0,004 (0,001-0,006)	0,01 (0,01-0,02)	0,008 (0,004-0,009)	0,002 (0,001-0,003)
$p_{1-2} < 0,01; p_{1-2a} < 0,01; p_{2-26} < 0,01; p_{2a-26} < 0,01$				
ДК, е.и.о.	0,48 (0,28-0,60)	0,53 (0,25-0,69)	0,52 (0,23-0,62)	0,51 (0,23-0,58)
КД и СТ, е.и.о.	0,07 (0,02-0,08)	0,23 (0,20-0,29)	0,21 (0,10-0,28)	0,10 (0,07-0,11)
$p_{1-2} < 0,01; p_{1-2a} < 0,01; p_{2-26} < 0,01; p_{2a-26} < 0,01$				
ШО, е.и.о.	0,01 (0,01-0,02)	0,04 (0,02-0,07)	0,06 (0,02-0,08)	0,02 (0,01-0,03)
$p_{1-2} < 0,01; p_{1-2a} < 0,01; p_{2a-26} = 0,01$				

Примечание. p – показатель значимости различий между группами.

регуляции образования внеклеточных нейтрофильных ловушек [11]. Известно, что интермедиаты ПОЛ являются продуктами биодеструктивных процессов, обладая цитоповреждающими свойствами. Так, диеновые конъюгаты, образующиеся на ранней стадии окисления, являются токсическими метаболитами для белков, липопротеинов, ферментов, нуклеиновых кислот, в то же время основания Шиффа могут принимать участие в процессах гликолиза, биосинтезе некоторых аминокислот (триптофана). Активация ПОЛ приводит к образованию таких прямых продуктов, как малоновый диальдегид (МДА), изопростаны и 4-гидроксиноненаль.

Озон в низких концентрациях, несмотря на высокий окислительный потенциал, обладает высочайшей селективностью, что обусловлено полярным строением молекулы: с озоном мгновенно реагируют соединения, содержащие свободные двойные связи (C=C). В результате чувствительными к озону оказываются в первую очередь ненасыщенные жирные кислоты, ароматические аминокислоты и пептиды с SH-группами. При МАГТ с озонированием крови с насыщающей концентрацией озона 3-10 мг/л в газовой фазе, целевыми мишенями являются клеточные мембраны форменных элементов крови (эритроцитов, лимфоцитов, тромбоцитов), клетки сосудистой стенки и плазменные метаболиты. В литературе представлены сведения о том, что воздействие на образцы крови озонированного физиологического раствора с насыщающей концентрацией озона 3-10 мг/мл газовой фазе вызывает умеренную интенсификацию липопероксидации в сочетании с превалирующим увеличением антиоксидантных резервов [12]. Кроме этого, показано статистически значимое снижение концентрации малонового диальдегида (10-20%; при использовании низких доз озона (3-10 мг/л в газовой фазе) в то время как применение высокой концентрации озона (40 мг/л) приводит к статистически значимому нарастанию уровня МДА (на 35,1%) относительно интактного образца, что является признаком окислительного стресса [13]. В литературе отмечено, что мощная антиоксидантная способность крови, подвергаемая воздействию небольшой и точно рассчитанной дозы озона, всего за несколько минут способна мобилизовать эндогенные факторы антиоксидантной защиты [14]. Генерируемые с помощью молекулы озона гидрокси-гидропероксид (перекись озона) и альдегид - 4-гидроксиноненаль (4-HNE), могут проникать в цитоплазму фагоцитирующих клеток и модулировать активность ядерного фактора каппа В (NF- κ B), низкие дозы озона полностью блокируют его активность, способствуя уменьшению воспале-

ния путем модуляции синтеза провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухолей- α , интерферон- γ , интерлейкин-1 β , интерлейкин-6, интерлейкин-8). Кроме этого, низкие дозы озона, действуя как через фактор Nrf2, способны индуцировать активацию антиоксидантных ферментов: γ -глутамилтрансферазы, γ -глутамилтранспептидазы, каталазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [15-18].

Выводы:

Ранний посттравматический период у пациентов с изолированным переломом бедренной кости до оперативного лечения сопровождается накоплением первичных (диеновые конъюгаты), вторичных (ацилгидроперекиси и кетодиены и сопряженные триены) и конечных (основания Шиффа) продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта плазмы, а также вторичных и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы.

У пациентов с изолированным переломом бедренной кости после оперативного лечения на фоне стандартной консервативной терапии сохраняется высокий уровень продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта плазмы, что свидетельствует об эскалации окислительного стресса.

Применение процедуры малой аутогемотерапии с озонированием крови низкими терапевтическими дозами озона приводит к снижению и полному восстановлению уровня продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе, снижению и частичному восстановлению продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта плазмы, что может рассматриваться как оптимизация состояния про- и антиоксидантных систем крови и ограничение эскалации окислительного стресса.

Литература

(п.п. 1-5; 9-11; 14-18 см. References)

- Масленников О.В., Конторщикова К.Н., Грибкова И.А. *Руководство по озонотерапии*. Н. Новгород; Вектор-Тис; 2008.
- Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*. Челябинск; Челябинский государственный педагогический университет; 2000.
- Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов. *Вопросы медицинской химии*. 1991; 37(4): 92-3.
- Соловьёва А.Г., Перетягин С.П., Мартусевич А.А., Мартусевич А.К. Сравнительный анализ действия газообразного и растворенного озона на состояние про- и антиоксидантных систем крови *in vitro*. *Вестник физиотерапии и курортологии*. 2016; 22(2): 12-3.

13. Перетягин С.П., Мартусевич А.К., Соловьева А.Г. Зимин Ю.В. Ферментативная оценка гепатотропного действия озона в субхроническом эксперименте. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013; 154(6): 789-91.
10. Sauaia A., Moore F.A., Moore E.E. Postinjury Inflammation and Organ Dysfunction. *Crit Care Clin*. 2017; 33(1): 167-91.
11. Clavo B., Rodriguez-Esparrago, Rodriguez-Abreu D., Martínez-Sánchez G., Llontop P., Aguiar-Bujanda D., et al. Modulation of Oxidative Stress by Ozone Therapy in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Toxicity: Review and Prospects. *Antioxidants (Basel)* (2019). Available at: doi: 10.3390/antiox8120588 (Accessed 22 April 2020).
12. Solov'yova A.G., Peretyagin S.P., Martusevich A.A., Martusevich A.K. Comparative analysis of the effect of gaseous and dissolved ozone on the state of blood Pro- and antioxidant systems *in vitro*. *Vestnik fizioterapii i kurortologii*. 2016; 22(2): 12-3. (in Russian)
13. Peretyagin S.P., Martusevich A.K., Solov'yeva A.G., et al. Enzymological evaluation of hepatotropic effect of ozone in a subchronic experiment. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny*. 2013; 154(6): 789-91. (in Russian)
14. Clavo B., Santana-Rodríguez N., Llontop P., Gutiérrez D., Suárez G., López L., Rovira G., et al. Ozone Therapy as Adjuvant for Cancer Treatment: Is Further Research Warranted? *Evid Based Complement Alternat Med*. (2018). Available at: doi: 10.1155/2018/7931849 (Accessed 29 April 2020).
15. Ahmed S.M., Luo L., Namani A. Wang X.J., Tang X.N. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. 2017; 1863 (2): 585-597.
16. Bocci V.A., Zanardi I., Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship *Journal of translational medicine* (2011). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3125221/> (Accessed 26 April 2020)
17. Siniscalco D., Trotta M.C., Brigida A.L. Intraperitoneal Administration of Oxygen/Ozone to Rats Reduces the Pancreatic Damage Induced by Streptozotocin. *Biology (Basel)*. (2018). Available at: doi: 10.3390/biology7010010. (Accessed 29 April 2020).
18. Wang L., Chen Z., Liu Y., Du Y., Liu X.H. Ozone oxidative post-conditioning inhibits oxidative stress and apoptosis in renal ischemia and reperfusion injury through inhibition of MAPK signaling pathway. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018; 12: 1293-301.

References

1. Agarwal-Harding K.J., Meara J.G., Greenberg S.L. Zurakowski D., Dyer G.S. Estimating the global incidence of femoral fracture from road traffic collisions: a literature review. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2015; 97(6): doi: 10.2106/JBJS.N.00314
2. Lord J.M., Midwinter M.J., Chen Y.F., Belli A., Brohi K., Kovacs E.J., et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet*. 2014; 384(9952): 1455-65.
3. Huber-Lang M., Lambris J.D., Ward P.A. Innate immune responses to trauma. *Nature Immunology*. 2018; 19(4): 327-41.
4. Re L., Martínez-Sánchez G., Bordicchia M., Malcangi G. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway *in vivo*? A preliminary result. *European Journal of Pharmacology*. 2014; 742: 158-62.
5. Milkovic L., Gasparovic A.C., Zarkovic N. Overview on Major Lipid Peroxidation Bioactive Factor 4-hydroxynonenal as Pluripotent Growth-Regulating Factor. *Free Radic Res*. 2015; 49(7): 850-60.
6. Maslennikov O.V., Kontorshchikova K.N., Gribkova I.A. *Ozone therapy guide [Rukovodstvo po ozonoterapii]*. Nizhniy Novgorod; Vektor-TiS; 2008. (in Russian)
7. Volchegorskiy I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Tseylikman V.E. *Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive responses of the body. [Eksperimental'noe modelirovanie I laboratornaya otsenka adaptivnykh reaktsiy organizma]*. Chelyabinsk: CHelGPU, 2000. (in Russian)
8. Lvovskaya E.I., Volchegorskiy I.A., Shemyakov S.E. Spectrophotometric determination of the final products of lipid peroxidation. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1991; 37(4): 92-3. (in Russian)
9. Billiar T.R., Vodovotz Y. Time for trauma immunology. *PLoS Medicine*. (2017). Available at: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1002342> (Accessed 22 April 2020).

Сведения об авторах:

Осиков Михаил Владимирович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, e-mail: prof.osikov@yandex.ru;

Абрамов Кирилл Сергеевич, ст. лаб. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, e-mail: kirill-abramov86@mail;

Давыдова Евгения Валерьевна, доктор мед. наук, доцент, проф. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, e-mail: dav-zhenya@yandex.ru;

Огнева Ольга Игоревна, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, e-mail: ognevaolga2@mail.ru;

Синицкий А.И., доктор мед. наук, доцент, зав. каф. биохимии им. Р.И. Лифшица ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, e-mail: sinitskiyai@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.341-005.1-089.5-031.81

Ефремов А.В., Храмых Т.П., Говорова Н.В., Ермолаев П.А.

Динамика хемилюминесценции в тонкой кишке на фоне анестетического прекондиционирования при геморрагической гипотензии

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

Введение. Ведущим патогенетическим фактором массивной кровопотери является гипоксия, инициирующая активацию процессов свободнорадикального окисления (СРО) в органах и тканях и системный воспалительный ответ. Показано, что одним из универсальных звеньев формирования множественной органной дисфункции при кровопотере является изменение проницаемости кишечной стенки с транслокацией микрофлоры и токсинов в системный кровоток на фоне реперфузии. В последнее время внимание исследователей привлекает эффект анестетического прекондиционирования, в том числе при операциях, сопровождающихся геморрагической гипотензией (ГГ).

Цель исследования – оценка в эксперименте динамики процессов СРО в тонкой кишке при геморрагической гипотензии на фоне применения анестетика севофлурана, обладающего эффектом анестетического прекондиционирования.

Методика. Эксперименты проведены на 105 белых крысах-самцах. ГГ моделировали, используя в 1-й группе в качестве анестетика эфир во 2-й – анестетик севофлуран. Контролем служили 2 группы интактных животных: одна – с эфиром, другая – с севофлураном. Для оценки процессов СРО через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч ГГ забирали фрагменты тонкой кишки. Исследование хемилюминесценции (ХЛ) гомогенатов тонкой кишки проводили по методу Р.Р. Фархутдинова, используя хемилюминомер «Флюорат АБЛФ-2Т». Регистрировались показатели СРО: спонтанная светимость (СС), вспышка (В), светосумма (C_x).

Результаты. Через 15 мин ГГ (2-я группа, севофлуран) обнаружено повышение показателя СС в тощей кишке на 33%; снижение показателя В в 12-пк в 2 раза, в тощей и подвздошной кишке – на 24 и 36% соответственно. Показатель C_x снижался в 12-пк на 36%, в тощей и подвздошной кишке – на 45% и 52% соответственно по сравнению с 1-й группой (эфир). На 30-й мин показатель СС в тощей кишке повышался на 80%. На фоне ГГ при применении севофлурана отмечено снижение показателя В в 12-пк на 38%, в тощей кишке на 22%, а в подвздошной в 3 раза. Через 1 ч ГГ при использовании севофлурана наблюдалось повышение СС в тощей кишке в 2 раза, в 12-пк и подвздошной – на 38% и 15% соответственно. Показатель В снижался в 12-пк на 67, в тощей – на 43%; Показатель C_x в 12-пк и тощей кишке снижался в 2,6 и 2,5 раза, в подвздошной – на 70% по сравнению с группой «эфир». Через 2 ч ГГ в группе «севофлуран» обнаружено увеличение СС в тощей и подвздошной кишках на 80% и в 3 раза, соответственно, по сравнению с эфирным наркозом. При этом наблюдалось уменьшение C_x в 12-п и тощей кишке – на 24% и 15% соответственно.

Заключение. На фоне ГГ наблюдается активация процессов СРО в тонкой кишке при использовании эфира; прекондиционирование анестетиком севофлураном способствовало значительному ограничению окислительного стресса в тонкой кишке крыс возможно за счет активации антиоксидантной системы.

Ключевые слова: тонкая кишка; геморрагическая гипотензия; севофлуран; прекондиционирование

Для цитирования: Ефремов А.В., Храмых Т.П., Говорова Н.В., Ермолаев П.А. Динамика хемилюминесценции в тонкой кишке на фоне анестетического прекондиционирования при геморрагической гипотензии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 86-93.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.86-93

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Храмых Т.П., Говорова Н.В.; сбор и обработка материала – Ефремов А.В.; подготовка иллюстративного материала – Ермолаев П.А.; статистическая обработка – Ермолаев П.А., Ефремов А.В.; написания текста – Ермолаев П.А., Храмых Т.П.; редактирование – Храмых Т.П.

Для корреспонденции: *Ефремов Анатолий Владимирович*, e-mail: efremov.anatoly.55@gmail.com

Финансирование. Работа не имеет финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки

Поступила 01.08.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2020

Efremov A.V., Khramykh T.P., Govorova N.V., Ermolaev P.A.

Dynamics of chemiluminescence in the small intestine during anesthetic preconditioning in hemorrhagic hypotension

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

Introduction. The major pathogenetic factor of massive blood loss is hypoxia, which triggers activation of free-radical oxidation (FRO) processes in organs and tissues and the systemic inflammatory response. A universal factor of multiple organ dysfunction in blood loss is altered intestinal wall permeability with translocation of microflora and toxins into the systemic circulation during reperfusion. Recently, much of the attention has been focused on effects of anesthetic preconditioning, including during operations associated with hemorrhagic hypotension (HH).

The aim of this study was to evaluate in experiment the dynamics of small intestinal FRO in HH during the use of the anesthetic sevoflurane, which has an effect of anesthetic preconditioning.

Methods. Experiments were performed on 105 white male rats divided into two groups; groups 1 and 2 were exposed to HH with ether or sevoflurane as the anesthetic, respectively. Two groups of intact animals treated with ether or sevoflurane were used as the controls. Five animals died during the experiment. To evaluate FRO processes, samples of the duodenum, jejunum, and ileum were taken at 15 min, 30 min, 1 h, and 2 h of HH. The chemiluminescence (CL) study of small intestine homogenates was performed according to the Farukhtudinov method on a Fluorate ABLF-2T chemiluminometer. The following FRO indexes were recorded: spontaneous luminosity (*SL*), flash (*F*), and light sum (*LΣ*). Significance of differences was determined with the Mann-Whitney test.

Results. In the sevoflurane group 2 compared to the ether group after 15 min of HH, *SL* was increased in the jejunum by 33%; *F* was decreased in the duodenum by 50%, in the jejunum by 24%, and in the ileum by 36%; *LΣ* was decreased in the duodenum by 36%, in the jejunum by 45%, and in the ileum by 52%. At 30 min, *SL* in the jejunum was increased by 80%. In the HH+sevoflurane group, *F* was decreased in the duodenum by 38%, in the jejunum by 22%, and in the ileum by 27%; *LΣ* in the duodenum was decreased by 44%, in the jejunum by 45%, and in the ileum by 67%. After 1 h of HH+sevoflurane, *SL* was increased in the jejunum twofold, in the duodenum by 38% and in the ileum by 15%; *F* was decreased in the duodenum by 67% and in the jejunum by 43%; *LΣ* in the duodenum was decreased by 62%, in the jejunum by 60%, and in the ileum by 70% compared to the ether group. After 2 h of HH+sevoflurane, *SL* was increased in the jejunum and ileum by 80% and 67%, respectively, compared to the ether group. In this process, *LΣ* in the duodenum was decreased by 24% and in the jejunum by 15%.

Conclusion. The HH+diethyl ether exposure was associated with activation of FRO processes in the small intestine. The sevoflurane preconditioning provided a significant restriction of oxidative stress in the rat small intestine due to activation of the antioxidant system in the duodenum, jejunum, and ileum at 1 h, 15 min, and 30 min of HH, respectively.

Keywords: small intestine; hemorrhagic hypotension; sevoflurane; preconditioning

For citation: Efremov A.V., Khramykh T.P., Govorova N.V., Ermolaev P.A. Dynamics of chemiluminescence in the small intestine during anesthetic preconditioning in hemorrhagic hypotension. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1) 86-93. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.86-93

Contribution of authors: concept and design of the study – T.P. Khramykh, N.V. Govorova; –T.P. Khramykh; collection and processing of material – A.V. Efremov; preparation of illustrative material – Ermolaev P.A.; statistical processing – Ermolaev P.A.; editing – Khramykh T.P.; writing the text – Ermolaev P.A., Khramykh T.P.

For correspondence: **Anatoly V. Efremov**, assistant of the department, «Federal State Budgetary Institution «Omsk State Medical University»; 12 Lenin's Str., Omsk 644099, Russian Federation, e-mail: efremov.anatoly.55@gmail.com

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

Khramykh T.P., <https://orcid.org/0000-0002-5508-6979>

Govorova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-0495-902X>

Received 01.08.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Известно, что ведущим патогенетическим фактором массивной кровопотери является гипоксия, которая развивается как за счет значительного снижения

объема циркулирующей крови и венозного возврата к сердцу, так и за счет формирования микроциркуляторных нарушений и энергодефицита в тканях [1]. В свою очередь, нарушение транспорта кислорода к тканям

инициирует активацию процессов свободнорадикального окисления (СРО) в органах и тканях и системный воспалительный ответ [2-3].

Показано, что одним из универсальных звеньев формирования множественной органной дисфункции при кровопотере является изменение проницаемости кишечной стенки, сопровождающееся транслокацией микрофлоры и токсинов из просвета кишки в системный кровоток на фоне реперфузии [4]. Учитывая глобальную проблему роста числа катастроф и массового травматизма [5], представляется актуальным поиск фармакологических препаратов, обладающих мембраностабилизирующим действием, уменьшающим тяжесть кишечной недостаточности.

В настоящее время одним из перспективных направлений в решении этой проблемы является изучение прекодиционирующего эффекта ингаляционных анестетиков при циркуляторных нарушениях на фоне массивной кровопотери [3, 6]. В литературе имеется достаточно ограниченное число исследований, посвященных изучению терапевтического воздействия ингаляционных агентов на функциональное состояние непарных органов брюшной полости при критических состояниях, а имеющиеся данные весьма противоречивы [3, 7]. Необходимо констатировать и тот факт, что в публикациях, рассматривающих роль прекодиционирующих стимулов, основное внимание уделено поиску молекулярных механизмов устойчивости сердца и головного мозга к повреждающим факторам и в значительно меньшей степени других органов [8-10, 11].

Цель исследования – оценка в эксперименте динамики процессов СРО в тонкой кишке при геморрагической гипотензии на фоне применения севофлурана, обладающего эффектом анестетического прекодиционирования.

Методика

Эксперименты проведены на 105 белых беспородных крысах-самца соблюдением требований «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986). Протокол исследования (№ 51 от 10.10.2018 г.) одобрен этическим комитетом ОмГМУ, Экспериментальные животные были разделены на 2 группы: у 40 животных геморрагическую гипотензию моделировали на фоне анестезии диэтиловым эфиром (ОАО «Медхимпром», Россия), у 40-ка в качестве анестетика применяли севофлуран («Abbott laboratories»). Контролем служили 2 группы интактных животных: одна группа ($n=10$) была наркотизирована

диэтиловым эфиром; другая ($n=10$) – севофлураном. При использовании эфирного наркоза 5 животных погибли ко второму часу ГГ. При анестезии использовали масочный наркоз.

После достижения требуемого уровня анестезии производили интубацию трахеи катетером 22G («B Braun», Германия) и подключали дыхательный контур к оригинальному устройству для проведения ингаляционной анестезии выбранным препаратом [12]. На этапе вводного наркоза использовали анестетик в дозе 2 МАК в течение 15 мин, тем самым моделировали анестетическое прекодиционирование. Для поддержания анестезии анестетик использовали в дозе 1 МАК.

В хирургической стадии наркоза катетеризировали левую общую сонную артерию катетером 26 G («Bbraun», Германия). Для предупреждения свертывания крови за 15 мин до кровопускания вводили через катетер гепарин-натрий («Биохеми», Австрия, 500 МЕ/кг). Геморрагическую гипотензию (ГГ) моделировали острым кровопусканием из катетеризованного сосуда с использованием оригинального устройства [13]. Систолическое артериальное давление в ходе эксперимента поддерживали на уровне 40 мм рт. ст.

Для оценки интенсивности процессов СРО через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч геморрагической гипотензии проводили срединную лапаротомию, забирали и гомогенизировали фрагменты из 3 отделов тонкой кишки: двенадцатиперстной (12-пк), тощей и подвздошной. Исследование хемилюминесценции (ХЛ) гомогенатов тонкой кишки проводили по методу Р.Р. Фархутдинова, используя хемилюминомер «Флюорат АБЛФ-2Т» (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия) [14]. Регистрировали значение таких показателей как спонтанная светимость (СС), вспышка (В), светосумма (C_{Σ}). СС косвенно характеризует активность ферментов антиоксидантной системы; В – наличие в гомогенате тонкой кишки продуктов перекисного окисления липидов; C_{Σ} – количество и способность липидов подвергаться окислению [15].

Статистическая обработка проведена с использованием программы Statistica 10.0. Для оценки значимости различий в двух совокупностях применялся критерий Манна-Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты исследования

Результаты исследования суммированы в табл. 1, 2 и 3. Первым этапом был анализ показателей ХЛ в подгруппе животных с анестезией диэтиловым эфи-

ром. Так, на 15-й мин ГГ амплитуда B была увеличена в 12-пк в 3 раза, в тощей – в 2,4 раза, а в подвздошной кишке – на 24% по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Показатель C_2 был увеличен в 12-пк на 67%, в тощей кишке в 3,3 раза, в подвздошной – в 3,1 раза относительно контрольного уровня ($p < 0,05$). На 30-й мин ГГ

сохранялись высокие показатели CC в подвздошной кишке: на 76% выше по сравнению с контролем и на 52% выше по сравнению с показателем, полученным на 15-й мин ГГ ($p < 0,05$). Амплитуда B понижалась в 12-пк примерно в 2 раза, оставаясь выше контрольных значений на 54%, в тощей кишке амплитуда снижалась

Таблица 1

Спонтанная светимость (усл. ед.) гомогенатов тонкой кишки при геморрагической гипотензии у животных в зависимости от выбранного анестетика

Подгруппы животных	Отдел тонкой кишки	Этапы эксперимента				
		Контроль	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч
Диэтиловый эфир	12-перстная кишка	0,32 [0,21; 0,45]	0,36 [0,28; 0,63]	0,52 [0,42; 0,57]	0,67 [0,52; 1,42]*	0,51 [0,47; 0,68]*
	тощая кишка	0,81 [0,59; 1,12]	0,87 [0,53; 1,32]	0,62 [0,19; 0,80]	0,32 [0,29; 0,72]*	0,25 [0,22; 0,29]*
	подвздошная кишка	0,50 [0,42; 1,56]	0,58 [0,41; 0,69]	0,88 [0,33; 1,09]*	0,47 [0,13; 1,35]	0,13 [0,08; 0,38]*
Севофлуран	12-перстная кишка	0,32 [0,18; 0,43]	0,38 [0,18; 0,49]	0,42 [0,12; 0,78]	1,09 [0,92; 1,26]*^	0,48 [0,24; 0,61]*
	тощая кишка	0,73 [0,50; 1,07]^	1,30 [1,13; 1,54]*^	1,06 [0,79; 1,50]*^	0,68 [0,39; 1,12]^	0,45 [0,34; 0,61]*^
	подвздошная кишка	0,53 [0,32; 1,06]	0,58 [0,41; 0,69]	0,68 [0,44; 0,89]*	0,55 [0,23; 1,35]^	0,39 [0,18; 0,64]*^

Примечание. Здесь и в таблицах 2 и 3 данные представлены как Ме [LQ; HQ].

* – различия статистически значимы по сравнению с соответствующим контролем,

^ – различия статистически значимы по сравнению с анестезией диэтиловым эфиром на соответствующем сроке.

Таблица 2

Амплитуда быстрой вспышки (усл. ед.) гомогенатов тонкой кишки при геморрагической гипотензии у животных в зависимости от выбранного анестетика

Подгруппы животных	Отдел тонкой кишки	Этапы эксперимента				
		Контроль	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч
Диэтиловый эфир	12-перстная кишка	0,45 [0,34; 0,57]	1,37 [1,22; 1,52]*	0,69 [0,64; 0,71]*	1,37 [1,21; 1,47]*	0,52 [0,39; 0,67]
	тощая кишка	0,70 [0,41; 1,17]	1,68 [1,49; 1,79]*	0,67 [0,31; 1,52]	1,15 [0,94; 1,18]	0,27 [0,21; 0,32]*
	подвздошная кишка	0,79 [0,43; 2,46]	0,98 [0,79; 1,13]*	0,81 [0,65; 1,38]	1,03 [0,92; 1,11]*	0,46 [0,29; 0,49]*
Севофлуран	12-перстная кишка	0,34 [0,24; 0,47]	0,81 [0,62; 1,24]*^	0,43 [0,24; 0,62]*^	0,77 [0,29; 1,21]*^	0,51 [0,37; 0,69]
	тощая кишка	0,50 [0,41; 1,09]	1,28 [1,09; 1,56]*^	0,52 [0,41; 1,16]^	0,65 [0,35; 1,21]^	0,21 [0,11; 0,31]*
	подвздошная кишка	0,79 [0,29; 1,16]	0,63 [0,49; 1,19]^	0,69 [0,37; 1,18]*^	0,83 [0,32; 1,47]	0,41 [0,27; 0,65]*

Примечание. данные представлены как Ме [LQ; HQ]

* – различия статистически значимы по сравнению с соответствующим контролем,

^ – различия статистически значимы по сравнению с анестезией диэтиловым эфиром на соответствующем сроке.

в 2 раза, в подвздошной – на 17% по сравнению с показателем на 15-й мин ГГ. ($p < 0,05$). Показатель C_{Σ} снижался в тощей кишке на 33%, в остальных отделах тонкой кишки значимо не изменялся по сравнению с показателем на 15-й мин ГГ. При этом, во всех отделах тонкой кишки показатель C_{Σ} оказался выше контрольных значений: в 12-пк на 77%, в тощей кишке – в 2,2 раза, в подвздошной – в 3 раза ($p < 0,05$). Через 1 ч ГГ обнаружено увеличение CC в 12-пк в 2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). CC в тощей кишке оказалась ниже контрольных значений в 2,5 раза. Значения амплитуды B были увеличены в 12-пк в 2 раза, в тощей кишке – на 60%, в подвздошной – на 30% по сравнению с контролем ($p < 0,05$) и, соответственно, в 2 раза, в 1,9 и на 27%, по сравнению с показателями, полученными на 30-й мин ГГ. Было зарегистрировано увеличение C_{Σ} в 12-пк в 2,4 раза, в тощей кишке – в 3,1 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$) и, соответственно, на 37% и 36% выше по сравнению с показателями, полученными на 30-й мин ГГ. В подвздошной кишке C_{Σ} также была увеличена (в 2,2 раза) по сравнению с контролем ($p > 0,05$). Через 2 ч ГГ наблюдалось снижение всех показателей ХЛ по сравнению со значениями, зарегистрированными через 1 ч ГГ. Примечательно, что величины CC и B в тощей и подвздошной кишке оказались ниже контрольных значений ($p < 0,05$), однако

в 12-пк CC оставалась увеличенной на 60% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Вторым этапом был анализ показателей ХЛ у животных с анестезией севофлураном. На 15-й мин ГГ показатели CC в тощей кишке были повышены на 85% относительно контрольного уровня. Амплитуда B была увеличена в 12-пк 2,4 раза ($p < 0,05$), в тощей – в 2,6 раза ($p < 0,05$), а в подвздошной кишке амплитуда оказалась сниженной на 20% по сравнению с контролем. Обнаружено увеличение C_{Σ} в 12-пк на 24% ($p < 0,05$), в тощей и в подвздошной кишке на 83% и 24% соответственно ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. На 30-й мин ГГ высокие значения CC регистрировались в гомогенатах тощей в подвздошной кишки – на 50 и 28% соответственно выше, чем в контроле ($p < 0,05$) и на 17% выше, чем показатель на 15-й мин ГГ. Наблюдалось незначительное (на 7%) снижение показателя C_{Σ} в 12-пк по сравнению с показателем на 15-й мин ГГ, но по сравнению с контролем он оставался выше на 15% ($p < 0,05$). Через 1 ч ГГ обнаружено увеличение CC в 12-пк в 3,2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$) и на 60% выше по сравнению с показателем, полученным на 30-й мин ГГ. Наблюдалось высокие показатели амплитуды B в 12-пк – в 2,3 раза выше, чем в контроле ($p < 0,05$) и на 80% выше по сравнению с показателем, полученным на 30-й мин ГГ. Было зарегистрировано

Таблица 3

Светосумма свечения медленной вспышки (усл.ед. х мин) гомогенатов тонкой кишки при геморрагической гипотензии у животных в зависимости от выбранного анестетика

Подгруппы животных	Отдел тонкой кишки	Этапы эксперимента				
		Контроль	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч
Диэтиловый эфир	12-перстная кишка	1,30 [1,17; 1,36]	2,17 [2,09; 2,37]*	2,30 [2,11; 2,41]*	3,15 [2,75; 3,41]*	1,62 [1,23; 1,74]
	тощая кишка	1,02 [0,62; 1,33]	3,37 [2,79; 3,72]*	2,24 [2,17; 3,29]*	3,04 [2,58; 3,38]*	1,23 [1,18; 1,31]
	подвздошная кишка	0,93 [0,83; 2,22]	2,87 [2,22; 3,10]*	2,81 [2,18; 4,23]*	2,09 [1,87; 3,39]*	1,17 [0,49; 2,44]
Севофлуран	12-перстная кишка	1,12 [0,77; 1,36]	1,39 [1,09; 1,55]*^	1,29 [1,13; 2,01]*^	1,34 [0,79; 1,68]^	1,23 [0,76; 1,59]^
	тощая кишка	1,02 [0,52; 1,13]	1,87 [1,23; 2,02]*^	1,24 [1,04; 1,52]^	1,34 [0,74; 1,47]*^	1,05 [0,84; 1,13]^
	подвздошная кишка	1,10 [0,91; 1,82]	1,37 [1,02; 1,76]^	1,11 [0,78; 1,73]^	1,26 [0,82; 1,73]^	1,17 [0,46; 1,74]

Примечание. Данные представлены как Ме [LQ; HQ]

* – различия статистически значимы по сравнению с соответствующим контролем,

^ – различия статистически значимы по сравнению с анестезией диэтиловым эфиром на соответствующем сроке.

увеличение C_{Σ} в тощей кишке на 30% по сравнению с контролем ($p < 0,05$) и на 8% по сравнению с 30-й мин ГГ. Через 2 ч ГГ CC в 12-пк была увеличена на 30% от контрольного уровня, а в тощей и подвздошной кишке, напротив, была снижена на 44% и 26% соответственно по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Схожая динамика была отмечена и по показателю амплитуды B : ее величина в 12-пк повышалась на 50%, а в тощей и подвздошной кишке снижалась соответственно на 58% и 48% по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

На заключительном этапе был проведен сравнительный анализ показателей ХЛ гомогенатов тонкой кишки при ГГ у животных обеих подгрупп. У контрольных животных при использовании севофлурана было выявлено снижение амплитуды B в тощей кишке на 28% ($p < 0,05$) по сравнению с анестезией диэтиловым эфиром, по другим показателям в контроле различий выявлено не было. На 15-й мин ГГ при применении севофлурана было обнаружено повышение уровня CC в тощей кишке на 33%. Амплитуда B на этом сроке снизилась в 12-пк практически в 2 раза, в тощей кишке снижение составило 24%, в подвздошной амплитуда снизилась на 36%. Показатель C_{Σ} в 12-пк снизился на 36%, в тощей – на 45%, в подвздошной кишке – на 52% (во всех случаях $p < 0,05$), по сравнению с анестезией диэтиловым эфиром. На 30-й мин CC в гомогенатах тощей кишки повышалась на 80% относительно показателей, полученных при анестезии эфирным наркозом. На фоне ГГ при применении севофлурана отмечено уменьшение амплитуды B в 12-пк на 38%, в тощей кишке – на 22%, в подвздошной – на 27%. Показатель C_{Σ} в 12-пк снижался на 44%, в тощей кишке – на 45%, в подвздошной кишке – практически в 3 раза (по всем показателям $p < 0,05$) по сравнению с анестезией диэтиловым эфиром. Через 1 ч ГГ при применении севофлурана наблюдалось повышение значений CC в 12-пк на 38%, в тощей кишке CC повышалась в 2 раза, в подвздошной – на 15%. Амплитуда B снижалась в 12-пк на 67%, в тощей кишке – на 43%, показатель C_{Σ} снижался в 12-пк – в 2,6 раза, в тощей кишке – в 2,5 раза, в подвздошной кишке – на 70% (по всем показателям $p < 0,05$) по сравнению с анестезией диэтиловым эфиром. Через 2 ч ГГ при применении севофлурана было обнаружено увеличение показателя CC в тощей и подвздошной кишках на 80% и в 3 раза соответственно, по сравнению с анестезией эфирным наркозом. При этом наблюдалось уменьшение C_{Σ} в 12-пк на 24% ($p < 0,05$), в тощей кишке – на 15% ($p < 0,05$) по сравнению с анестезией диэтиловым эфиром.

В целом, стимуляция СРО в тонкой кишке в постгеморрагическом периоде, по-видимому, определяет-

ся снижением спланхического кровотока в поддиафрагмальном пространстве, что обусловлено развитием синдрома низкого сердечного выброса, показанного нами ранее на представленной экспериментальной модели [16].

При сопоставлении изменения отдельных показателей ХЛ наблюдались следующие закономерности: нарастание C_{Σ} и амплитуды B в гомогенатах носило двухфазный характер и можно было выделить *два критических срока* (15 мин и 1 час ГГ) во всех отделах тонкой кишки у животных обеих групп. Динамика значений CC не имела четкого параллелизма и временного соответствия с другими показателями ХЛ. Кроме того, определялись выраженные различия значений CC между отделами тонкой кишки, но не между группами животных. Так, в 12-пк показатель CC постепенно увеличивался к 1-му часу ГГ (*критический срок*), и оставался повышенным на 2-м ч. В тощей кишке максимальное значение CC регистрировалось на 15-й мин ГГ (*критический срок*) с постепенным снижением ниже контрольных значений к концу наблюдения. В подвздошной кишке показатель CC постепенно нарастал к 30-й мин ГГ (*критический срок*), с постепенным снижением ниже контрольных значений к концу наблюдения. Такая динамика косвенно свидетельствует об активации ферментов антиоксидантной защиты в отделах тонкой кишки на разных сроках кровопотери, что, по всей видимости, связано с различной устойчивостью разных отделов кишки к ишемии из-за особенностей кровоснабжения. Однако уже к 2 ч ГГ наблюдается некоторое истощение этой защитной системы, что согласуется с данными других авторов [15, 17].

Обсуждение

В целом, результаты сравнительного анализа демонстрируют, что в группе с анестезией севофлураном регистрировался более низкий уровень показателей ХЛ гомогенатов тонкой кишки. Данный факт позволяет достаточно обоснованно утверждать, что прекондиционирование севофлураном способствует ограничению интенсивности свободнорадикальных процессов в тонкой кишке в условиях дефицита объема циркулирующей крови, т.е. севофлуран проявляет антиоксидантные свойства. Было обнаружено, что протективные эффекты севофлурана начинают проявляться по отдельным показателям ХЛ уже у контрольных животных, что может быть связано с торможением экскреторной функции поджелудочной железы и активности ферментов в просвете тонкой кишки. В ходе исследования также показан защитный эффект севофлурана при ГГ, в реализации которого значимую роль может иметь стабилизация мембран энтероцитов в условиях

ишемии-реперфузии, что подтверждается данными литературы [8-11, 18-20].

В частности, X. Gan и соавт. на модели окклюзии верхней брыжеечной артерии у крыс установили, что предварительное прекондиционирование севофлураном значительно снижает активность миелопероксидазы, экспрессию молекул межклеточной и клеточной адгезии и концентрацию интерлейкина-6, что указывает на ингибирование системного воспаления [21]. В работе С. Liu и соавт. на той же экспериментальной модели показано, что одним из возможных механизмов реализации прекондиционирующего эффекта севофлурана является активация сигнальных молекул внутриклеточного пути PI3K/AKT, который играет критически важную роль в регуляции апоптоза клеток [6].

Кроме того, в эксперименте на свиньях с применением модели остановки сердца с последующей сердечно-легочной реанимацией показано, что терапевтическая гипотермия и посткондиционирование севофлураном значительно увеличивали экспрессию интестинального гипоксия-индуцируемого фактора 1а (HIF-1а), предполагается, что этот протеин может играть роль в реализации защитного влияния севофлурана [22]. Отдельного внимания заслуживают данные о том, что органопротекция севофлураном может осуществляться за счет сохранения целостности эндотелия сосудов и уменьшения проницаемости сосудистой стенки при ишемии-реперфузии [23, 24].

Преимуществом проведенного экспериментального исследования, явилась возможность изучения прекондиционирующих свойств севофлурана без применения адьювантных препаратов, способных в значительной степени изменять эффективность защитного действия ингаляционного агента; кроме того, в работе использовалась валидная экспериментальная модель ГГ, воспроизводившая доказанную ишемию-реперфузию органов-мишеней, поскольку соблюдение перечисленных условий в клинической практике зачастую затруднено [18]. К ограничениям проведенного исследования можно отнести отсутствие морфологических данных, подтверждающих цитопротекторное действие севофлурана при ГГ, что будет предметом дальнейшего изучения.

Заключение

Таким образом, в ходе исследования показано, что на фоне ГГ наблюдается активация процессов СРО в тонкой кишке при использовании в качестве анестетика диэтилового эфира. Прекондиционирование севофлураном способствовало значительному ограничению окислительного стресса в тонкой кишке крыс, предположительно, за счет активации антиоксидант-

ной системы: в 12-пк на 1-м ч ГГ, в тощей кишке — на 15-й, а в подвздошной — на 30-й минуте.

Представленные результаты могут быть использованы при проведении трансляционных исследований, направленных на изучение механизмов органопротекторного действия ингаляционных анестетиков, поскольку целый ряд вопросов остается открытым.

Литература

1. Печникова Н.А., Торопова Я.Г. Центральная гемодинамика, микроциркуляция и окислительный метаболизм отделов тонкого кишечника при экспериментальном моделировании ишемии-реперфузии. *Смоленский медицинский альманах*. 2018; 4: 120-3.
2. Кантюков С.А., Нестеров М.И., Ермолаева Е.Н. Влияние степени кровопотери на уровень фосфолипидов и свободнорадикальное окисление в крови. *Омский научный вестник*. 2015; 2(144): 50-3.
3. Зыблев С.Л. Применение антиоксидантов при острой ишемии. Обзор литературы. *Рецент*. 2019; 22(5): 752-60.
4. Храмых Т.П., Долгих В.Т. Функциональные изменения слизистой оболочки тонкой кишки при геморрагической гипотензии. *Политравма*. 2007; 3: 55-9.
5. Путанов М.А., Казаринов Д.Н., Ческая К.М., Царионова Д.В., Соколова М.М., Сластилин В.Ю. и др. Влияние ингаляционной анестезии десфлураном и севофлураном на когнитивную функцию после аортокоронарного шунтирования на работающем сердце. *Анестезиология и реаниматология (Медиа Сфера)*. 2018; 6: 44-527.
6. Молчан Н.С., Полушин Ю.С., Жлоба А.А., Кобак А.Е., Хряпа А.А. Возможно ли усилить защиту миокарда во время искусственного кровообращения введением ингаляционных анестетиков? *Альманах клинической медицины*. 2019; 47 (3): 221-7.
7. Степанчева О.А., Рыбка М.М., Хинчагов Д.Я., Зотов Д.В., Мумладзе К.В., Лосева А.С. и др. Использование севофлурана как кардиопротектора у детей при операциях с искусственным кровообращением. *Детские болезни сердца и сосудов*. 2019; 16 (2): 118-23.
8. Ефремов А. В., Золотов А. Н., Храмых Т. П., Говорова Н. В., Соловьев А. О. *Устройство для проведения анестезиологического пособия мелким лабораторным животным*. [Текст]: пат. 178264 Рос. Федерация: А 61М 16/01
9. Долгих В. Т., Коршунов А. П., Золотов А. Н., Коняева Т. Р., Евапак Е. В. *Устройство для моделирования геморрагической гипотензии у мелких лабораторных животных* [Текст]: пат. 49442 Рос. Федерация: А61В 17/12.
10. Фархутдинов Р.Р. *Хемиллюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине*. Уфа, 1998.
11. Фархутдинов У.Р., Фархутдинов Р.Р. Особенности хемиллюминесценции плазмы крови и активность альвеолярных макрофагов при экспериментальной пневмонии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2000; 129(3): 260-4.
12. Храмых Т.П. Динамика параметров про- и антиоксидантной систем некоторых внутренних органов и крови при геморрагической гипотензии. *Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова*. 2007; 8(3): 94-7.
13. Фархутдинов Р.Р., Кантюков С.А., Кривохижина Л.В., Нестеров М.И. Свободнорадикальное окисление в сыворотке крови при острой гемической гипоксии. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2012; 2(39): 47-8.

18. Лихванцев В.В., Гребенчиков О.А., Шмелёва Е.А., Скрипкин Ю.В. Анестетическое прекондиционирование: почему данные, полученные в эксперименте, не всегда подтверждаются в клинике? *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2013; 10 (4): 009-14.
19. Чепурняк Е.Ю., Панов А.В., Локшин Л.С. Применение ингаляционных анестетиков во время искусственного кровообращения. *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2018; 15(4): 70-5.
20. tector in children during operations with cardiopulmonary bypass. *Detskije bolezni serdca i sosudov*. 2019; 16(2): 118-23. (in Russian)
21. Efremov A.V., Zolotov A.N., Hramyh T.P., Govorova N.V., Solov'ev A.O. *Device for conducting anesthesia for small laboratory animals*. Patent 178264, RF; 2018. (in Russian)
22. Dolgikh V.T., Korshunov A.P., Zolotov A.N., Konyaeva T.P., Evpak E.V. *Device for modeling hemorrhagic hypotension in small laboratory animals*. Patent 49442, RF; 2005. (in Russian)
23. Farhutdinov R.R. *Chemiluminescent methods for studying free radical oxidation in biology and medicine*. Ufa. 1998. (in Russian)
24. Farhutdinov U.R., Farhutdinov R.R. Serum free radical oxidation in acute hemic hypoxia. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2000; 129(3): 260-4. (in Russian)
25. Khramyh T.P. Dynamics of parameters of pro- and antioxidant systems of some internal organs and blood with hemorrhagic hypotension. *Vestnik Sankt-Peterburgskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii im. I.I. Mechnikova*. 2007; 8(3): 94-7. (in Russian)
26. Farhutdinov R.R., Kantjukov S.A., Krivohizhina L.V., Nesterov M.I. Serum free radical oxidation in acute hemic hypoxia. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2012; 2(39): 47-8. (in Russian)
27. Lihvancev V.V., Grebenchikov O.A., Shmeljova E.A., Skripkin Ju.V. Anesthetic preconditioning: why the data obtained in the experiment are not always confirmed in the clinic? *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2013; 10 (4): 009-014. (in Russian)
28. Chepurnjak E.Ju., Panov A.V., Lokshin L.S. The use of inhaled anesthetics during cardiopulmonary bypass. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2018; 15(4): 70-5. (in Russian)
29. Luo C., Yuan D., Zhao W., Chen H., Luo G., Su G., et al. Sevoflurane ameliorates intestinal ischemia-reperfusion-induced lung injury by inhibiting the synergistic action between mast cell activation and oxidative stress. *Mol Med Rep*. 2015 Jul; 12(1): 1082-90. DOI: 10.3892/mmr.2015.3527. PMID: 25815524. PMCID: PMC4438974.
30. Xiaoliang Gan, Guangjie Su, Weicheng Zhao, Pinjie Huang, Gangjian Luo, Ziqing Hei. The Mechanism of Sevoflurane Preconditioning-Induced Protections Against Small Intestinal Ischemia Reperfusion Injury Is Independent of Mast Cell in Rats. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:378703.
31. Albrecht M., Gruenewald M., Zitta K., Zacharowski K., Scholz J., Bein B., Meybohm P. Hypothermia and anesthetic postconditioning influence the expression and activity of small intestinal proteins possibly involved in ischemia/reperfusion-mediated events following cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*. 2012; 83(1): 113-8.
32. Chen C., Chappell D., Annecke T., Conzen P., Jacob M., Welsch U., et al. Sevoflurane mitigates shedding of hyaluronan from the coronary endothelium, also during ischemia/reperfusion: an ex vivo animal study. *Hypoxia (Auckl)*. 2016 Apr 15; 4: 81-90. eCollection 2016.
33. Lemoine S., Tritapepe L., Hanouz J.L., Puddu P.E. The mechanisms of cardio-protective effects of desflurane and sevoflurane at the time of reperfusion: anaesthetic post-conditioning potentially translatable to humans? *Br J Anaesth*. 2016 Apr; 116(4): 456-75.

References

1. Pechnikova N.A., Toropova Ja.G. Central hemodynamics, microcirculation and oxidative metabolism of the small intestine during experimental modeling of ischemia-reperfusion. *Smolenskiy meditsinskiy al'manakh*. 2018; 4: 120-3. (in Russian)
2. Kantjukov S.A., Nesterov M.I., Ermolaeva E.N. The effect of degree of blood loss on the level of phospholipids and free radical oxidation in the blood. *Omskiy nauchnyy vestnik*. 2015; 2(144): 50-3. (in Russian)
3. Zyblev S.L. The use of antioxidants in acute ischemia. Literature review. *Recept*. 2019; 22(5): 752-60. (in Russian)
4. Khramyh T.P., Dolgih V.T. Functional changes in the mucous membrane of the small intestine with hemorrhagic hypotension. *Politravma*. 2007; 3: 55-9. (in Russian)
5. Gipson J.S., Wood EM, Cole-Sinclair MF, McQuilten Z, Waters N, Woodford NW. Major haemorrhage fatalities in the Australian national coronial database. *Emerg Med Australas*. 2018 Jun; 30(3): 382-8. DOI: 10.1016/j.ajem.2017.06.025. PMID: 28633905.
6. Liu C, Shen Z, Liu Y, Peng J, Miao L, Zeng W, Li Y. Sevoflurane protects against intestinal ischemia-reperfusion injury partly by phosphatidylinositol 3 kinases/Akt pathway in rats. *Surgery*. 2015; 157(5): 924-33.
7. Liu C, Ding R, Huang W, Miao L, Li J, Li Y. Sevoflurane Protects against Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma/Nuclear Factor- κ B Pathway in Rats. *Pharmacology*. 2020; 105(3-4): 231-42.
8. Putanov M.A., Kazarinov D.N., Checkaya K.M., Carionova D.V., Sokolova M.M., Slastilin V.Yu., et al. The effect of inhalation anesthesia with desflurane and sevoflurane on cognitive function after coronary artery bypass grafting on a working heart. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2018; 6: 44-527. (in Russian)
9. Molchan N.S., Polushin Yu.S., Zhloba A.A., Kobak A.E., Khryapa A.A. Is it possible to strengthen the protection of the myocardium during cardiopulmonary by introducing inhaled anesthetics? *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2019; 47 (3): 221-7. (in Russian)
10. Thomas J Gerber, Valérie C O Fehr, Suellen D S Oliveira, Guochang Hu, Randal Dull, Marcelo G Bonini, et al. Sevoflurane Promotes Bactericidal Properties of Macrophages Through Enhanced Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Male Mice. *Anesthesiology*. 2019; 47(3): 221-7.
11. Stepanicheva O.A., Rybka M.M., Hinchagov D.Ja., Zotov D.V., Mumladze K.V., Loseva A.S., et al. The use of sevoflurane as a cardiopro-

Сведения об авторах:

Ефремов Анатолий Владимирович, ассистент каф. топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБУ ВО ОмГМУ;
Храмых Татьяна Петровна, доктор мед. наук, доцент зав. каф. топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБУ ВО ОмГМУ;

Говорова Наталья Валерьевна, доктор мед. наук, проф зав. каф. анестезиологии и реаниматологии ФГБУ ВО ОмГМУ;

Ермолаев Павел Александрович, канд. мед. наук, ассистент каф. топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБУ ВО ОмГМУ.

© Коллектив авторов, 2021

УДК 617-001.17-74-085.37-05

Осиков М.В., **Симонян Е.В.**, Агеева А.А., Сеницкий А.И., Агеев Ю.И.

Локальный ПОЛ-ограничивающий и ускоряющий заживление эффект мелатонина в составе оригинальной дермальной пленки при экспериментальной термической травме

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

Разработка и патогенетическое обоснование новых подходов к локальной терапии термической травмы (ТТ) является актуальной и востребованной проблемой. В частности, представляет интерес разработка дермальных пленок (ДП), содержащих эндогенные регуляторы гомеостаза мультитропного действия.

Цель исследования – оценка эффекта мелатонина (МТ) в составе оригинальной ДП на процессы репарации и содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в коже очага повреждения при локальной термической травме.

Методика. Эксперимент выполнен на 126 крысах-самцах Wistar. ТТ IIIA степени площадью 3,5% моделировали погружением участка межлопаточной области кожи в очищенную воду с температурой 98-99 °С на 12 с. МТ в составе ДП (0,005 г/г) на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы наносили ежедневно после ТТ в течение 5 сут. На 5-е и 10-е сут после ТТ оценивали макроскопическую картину, площадь и глубину ожоговой раны, скорость ее эпителизации. Содержание продуктов ПОЛ в гомогенате кожи ожоговой раны определяли экстракционно-спектрофотометрическим методом в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта.

Результаты. Установлено, что накопление вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта на 5-е и 10-е сут ассоциировано с площадью ожога. Применение оригинальной ДП с мелатонином приводит к снижению абсолютной и относительной площади ожога, увеличению скорости эпителизации ожоговой поверхности. На 5-е сут обнаружено снижение содержания вторичных и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе, на 10-е сутки – снижение вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе, конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидного экстракта.

Заключение. Полученные результаты демонстрируют ускоряющий репарацию кожи в очаге ТТ эффект МТ в составе дермальной пленки за счет его ПОЛ-ограничивающего действия, расширяют представления о мультитропных эффектах МТ в организме и являются предпосылкой для применения ДП с МТ в клинической практике.

Ключевые слова: термическая травма; мелатонин; дермальная пленка; перекисное окисление липидов; репарация

Для цитирования: Осиков М.В., **Симонян Е.В.**, Агеева А.А., Сеницкий А.И., Агеев Ю.И. Локальный ПОЛ-ограничивающий и ускоряющий заживление эффект мелатонина в составе оригинальной дермальной пленки при экспериментальной термической травме. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 94-101.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.94-101

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, интегральный анализ полученных данных, написание текста, редактирование рукописи – Осиков М.В.; набор экспериментального материала, анализ полученных данных – Симонян Е.В.; набор экспериментального материала, статистическая обработка данных, анализ полученных данных, написание текста – Агеева А.А.; набор экспериментального материала, редактирование рукописи – Сеницкий А.И.; набор экспериментального материала, статистическая обработка данных, анализ полученных данных – Агеев Ю.И.

Для корреспонденции: Осиков Михаил Владимирович, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» по программе У.М.Н.И.К. (договор № 15583ГУ/2020 от 05.07.2020 г.) и финансовой поддержке РФФИ и Челябинской области в рамках научного проекта № 20-415-740016.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.09.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Osikov M.V., [Simonyan E.V.](#), Ageeva A.A., Sinitsky A.I., Ageev Yu.I.**Local effect of melatonin in an original dermal film limiting lipid peroxidation and accelerating healing in experimental thermal trauma**South Ural State Medical University,
Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk 454092, Russian Federation

Background. Development and pathogenetic justification of new approaches for local therapy of thermal trauma (TT) is a relevant and in-demand issue. Of special interest are dermal films (DF) containing endogenous pleiotropic regulators of homeostasis. Melatonin (MT) is one of such regulators that is suggested to be protective in TT.

The aim of this study was to evaluate the effect of MT in the original DF on indexes of repair and concentration of lipid peroxidation (LPO) products in the injured skin after experimental TT.

Methods. Experiments were performed on 126 Wistar male rats. Grade IIIA TT with an area of 3.5% was modeled by immersing a section of interscapular skin in purified water at a temperature of 98–99°C for 12 s. MT formulated into DF (0.005 g/g) based on sodium carboxymethylcellulose was applied after TT daily for 5 days. The macroscopic picture, area and depth of the burn wound, and the wound epithelization rate were evaluated on days 5 and 10 after TT. Concentration of LPO products in the injured skin homogenate was measured by extraction spectrophotometry in heptane and isopropanol phases of the lipid extract.

Results. The accumulation of secondary and final LPO products in the heptane and isopropanol phases of the lipid extract on days 5 and 10 was associated with the burn area. The use of the original DF with MT resulted in a decrease in the absolute and relative areas of the burn and an increase in the rate of burn surface epithelialization. On day 5, a decrease in the content of secondary and final LPO products in the isopropanol phase was observed, and on day 10 decreases in secondary peroxidation products in the heptane phase and end LPO products in the isopropanol phase were detected.

Conclusion. The results of this study demonstrated that MT formulated into DF accelerates skin repair in the TT focus due to its LPO-limiting effect, expands the understanding of MT pleiotropic effect, and represents a prerequisite for the clinical use of DF with MT.

Keywords: thermal trauma; melatonin; dermal film; lipid peroxidation; repair

For citation: Osikov M.V., [Simonyan E.V.](#), Ageeva A.A., Sinitsky A.I., Ageev Yu.I. Local effect of melatonin in the original dermal film limiting lipid peroxidation and accelerating healing in experimental thermal trauma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 94–101. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.94-101

Contribution: Mikhail Vladimirovich Osikov – research concept and design, integral analysis of the data obtained, writing the text, editing the manuscript; Simonyan Elena Vladimirovna – set of experimental material, analysis of the obtained data; Ageeva Anna Alekseevna – set of experimental material, statistical data processing, analysis of the obtained data, text writing; Sinitsky Anton Ivanovich – set of experimental material, editing of the manuscript; Ageev Yuri Ivanovich – set of experimental material, statistical data processing, analysis of the obtained data.

For correspondence: **Michael V. Osikov**, Doctor of Medical Sciences, Professor, head of the Department of pathological physiology; 454092, Chelyabinsk region, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Acknowledgments. The study was supported by the UMNK Program of the Foundation for Assistance to Innovations (Agreement # 15583GU Анатолий Владимирович /2020 of 05.07.2020) and by RFBR and the Chelyabinsk Region, project # 20-415-740016.

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

Information about the authors:Ageev Yu.I., <https://orcid.org/0000-0002-9700-3886>Osikov M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6487-9083>[Simonyan E.V.](#), <https://orcid.org/0000-0003-2295-983X>Ageeva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3061-7621>Sinitsky A.I., <https://orcid.org/0000-0001-5687-3976>

Received 09.09.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

По данным ВОЗ, ежегодно около 11 млн человек нуждаются в медицинской помощи после ожогов [1]. На долю термической травмы (ТТ) приходится около 80% всех ожогов. Наиболее частыми причинами ТТ являются горячая жидкость и пламя, у 2/3 больных площадь ожога составляет менее 10% поверхности тела. Изучение

патофизиологии ожоговой раны важно для ограничения ее прогрессирования и разработки новых патогенетически обоснованных методов терапии [2]. Неоспорима роль окислительного стресса в патогенезе ТТ [3]. Мишенями свободных радикалов являются липиды, метаболитами такого взаимодействия выступают продукты пе-

рекисного окисления липидов (ПОЛ). Кожа - самый большой орган с интенсивно протекающими процессами ПОЛ, а окислительный стресс при ожогах реализуется в очаге повреждения и других тканях [4]. Показана роль продуктов ПОЛ в мутагенных и канцерогенных эффектах, модификации мембранных белков, ферментов, сигнальных молекул [5]. Гидроперекиси липидов при ТТ отражают концепцию редокс-регулируемого гомеостаза и в контексте «OxInflammation» выступают универсальными биомаркерами при патологии [6]. Содержание продуктов ПОЛ позволяет оценивать тяжесть ТТ и эффективность проводимой терапии [7]. Большинство исследователей сосредоточены на изучении продуктов окислительного стресса при ТТ в плазме, а не в очаге повреждения. Применение раневых покрытий – основной метод консервативного лечения ожоговых ран. Их преимуществом является создание влажной среды в ране, которая способствует дифференцировке клеток, эффективному межклеточному взаимодействию и сокращению сроков лечения [8]. В состав пленочных покрытий могут входить различные группы фармакологически активных веществ (антимикробные средства, антисептические средства, анальгетики и др.). Особое внимание при поиске новых терапевтических подходов уделяется регуляторам гомеостаза эндогенного происхождения [9–12]. Мелатонин (МТ) участвует в регуляции ритма сна-бодрствования, обладает антиоксидантным, иммуномодулирующим, антиапоптогенным действием, оказывает влияние на механизмы регуляции, пролиферации и дифференцировки клеток. Плейотропные эффекты мелатонина привлекают внимание с фундаментальных позиций регуляции гомеостаза, роли в патогенезе заболеваний и в прикладном аспекте в связи с возможностью применения МТ в лечении различных заболеваний [13]. Клетки кожи синтезируют МТ, его метаболиты обнаружены в кератиноцитах, меланоцитах, дермальных фибробластах [14]. В литературе представлены немногочисленные сведения в основном о системном (пероральном, внутривенном) и реже локальном применении МТ при ожогах, повреждениях кожи ультрафиолетом [15, 16]. В РФ отсутствуют зарегистрированные лекарственные формы в виде раневых покрытий с МТ для применения при ТТ.

Цель работы – оценка эффекта мелатонина в составе оригинальной дермальной пленки (ДП) на показатели репарации и содержание продуктов ПОЛ в коже очага повреждения при экспериментальной термической травме.

Методика

Эксперимент выполнен на 126 половозрелых крысах-самцах Wistar, находящихся в экспериментально-

биологической клинике (виварии) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию, выводу из эксперимента и утилизации [17]. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России на проведение исследования (протокол № 10 от 15.11.2019). Для анестезии использовали препарат «Золетил-100» («Virbac Sante Animale», Франция) в дозе 20 мг/кг. Животные были случайным образом разделены на 3 группы: 1-я группа ($n=20$) – интактный контроль, 2-я ($n=53$) – животные с ТТ и ежедневным наложением асептической повязки, 3-я ($n=53$) – животные с ТТ и наложением на область ожога ДП с МТ. Для моделирования ТТ IIIA степени и относительной площадью 3,5% межлопаточный участок кожи погружали в очищенную воду при 98–99 °С на 12 с. Глубину ожога верифицировали морфологическими методами. Экспериментальная модель с использованием горячей воды и рассматривается исследователями как стандарт ТТ [18]. Пленку с МТ (12 см²) животным 3-й группы наносили сразу после моделирования ТТ, закрепляя асептической повязкой, перевязку осуществляли ежедневно в течение 5 сут. В предварительных исследованиях был разработан состав ДП на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы, в состав которой был включен МТ в концентрации 0,005 г/г и проведена ее оценка в соответствии с фармакотехнологическими параметрами: органолептические показатели (вид, цвет, прозрачность, эластичность, наличие примесей и микротрещин), адгезивная способность, механическая прочность на разрыв, толщина (заявка на патент № 2020118766 от 29.05.2020). Для вычисления площади раны на 5-е и 10-е сут после ТТ методом цифровой планиметрии использовали фотокамеру «Nikon Coolpix S2800» (Китай) и пакет программ «Microsoft Office Visio». Скорость эпителизации (VS) рассчитывали по формуле: $VS = S - S_n / t$, где S – начальная площадь раны до лечения (в дальнейшем, площадь при предыдущем измерении); S_n – площадь при последующем измерении; t – число суток между измерениями [19]. Площадь раны в последующих измерениях определяли в %, принимая за 100% площадь до лечения, результат выражали в % / сутки. Продукты ПОЛ в коже оценивали на 5-е и 10-е сут после ТТ. Для приготовления 10% гомогената кожи ожоговую рану иссекали, 40 мг ткани гомогенизировали в соотношении 1:10 раствора натрия хлорида 0,9 % в течение 3 мин при 4 °С с получением 1 мл гомогената. Содержание продуктов ПОЛ в гомогенате определяли экстракционно-спектрофотометрическим методом на спектрофотометре «СФ-56» («ЛОМО – Спектр», Санкт – Петербург) [20]. В гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта измеряли оп-

тическую плотность при 220 нм (содержание изолированных двойных связей), 232 нм (содержание диеновых конъюгатов – ДК), 278 нм (содержание кетодиенов и сопряженных триенов – КД и СТ), 400 нм (основания Шиффа – ШО). Относительное содержание продуктов ПОЛ выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.): E232/E220 (ДК), E278/E220 (КД и СТ) и E400/E220 (ШО). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics 19. 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, Колмогорова-Смирнова). Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R).

Результаты

Анализ показателей репарации при ТТ выявил, что на 5-е и 10-е сут уменьшается абсолютная площадь и относительная площадь раневого дефекта, в связи с чем увеличивается скорость эпителизации раны и доля уменьшения ее площади (табл. 1). При визуальной оценке кожи в области ТТ на 5-е сут у животных в межлопаточной области определяется плотный струп округлой формы, плотно спаянный с подлежащими тканями. Окружающая кожа отечна, гиперемирована. На 1-е сут ТТ у всех животных сохраняется отек, у 2 животных серозно-гнойное отделяемое из-под струпа. На 5-е сут после термического повреждения кожи в гептановой фазе липидного экстракта гомогената кожи ожоговой раны, концентрирующей большую часть резервных липидов (триацилглицеридов), выявлено накопление вторичных и конечных продуктов ПОЛ-кетодиенов и сопряженных триенов, Шиффовых оснований соответственно (табл. 2). Оценка содержания продуктов ПОЛ

в изопропанольной фазе гомогената кожи ожоговой раны, аккумулирующей в основном мембранные фосфолипиды, показала увеличение вторичных и конечных продуктов ПОЛ относительно показателей группы интактных животных. Исследование содержания продуктов ПОЛ в гомогенате кожи ожоговой раны на 10 сут после ТТ выявило увеличение в гептановой фазе липидного экстракта вторичных и конечных продуктов ПОЛ, в изопропанольной фазе гомогената кожи – только конечных продуктов ПОЛ. Отметим, что содержание диеновых конъюгатов в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта гомогената кожи ожоговой раны статистически значимо не изменялось на 5-е и 10-е сут после ТТ. Кроме этого, содержание в липидном экстракте гомогената кожи ожоговой раны в гептановой фазе конечных продуктов ПОЛ, в изопропанольной фазе вторичных и конечных продуктов ПОЛ на 10-е сут было меньше ($p < 0,01$), чем на 5-е сут ТТ, что свидетельствует о прогрессирующем уменьшении их количества в коже в динамике ТТ.

Применение МТ в составе ДП при экспериментальной ТТ приводит к значимому сокращению площади ожоговой раны в абсолютных величинах на 5-е и 10-е сут, в относительных – на 10-е сут (табл. 1). На 5-е и 10-е сут наблюдения возрастает скорость эпителизации раны и происходит относительное уменьшение площади раны. Максимальные изменения зафиксированы на 10-е сут, когда абсолютная площадь раневого дефекта уменьшилась на 12%, а скорость эпителизации возросла на 246% по медиане относительно группы животных с ТТ без применения ДП с МТ. В условиях применения МТ в составе ДП в липидном экстракте гомогената кожи ожоговой раны зафиксированы изменения содержания продуктов ПОЛ (табл. 2). У животных с ТТ на фоне применения ДП с МТ на 5-е сут в области ожога так же определяется струп округлой формы, плотно спаянный с подлежащими тканями, но более мягкий и с менее выражен-

Таблица 1

Влияние мелатонина в составе дермальной пленки на показатели репарации ожоговой раны при ТТ [Me (Q₂₅-Q₇₅)]

Показатели	Группа 2-я 5-е сутки (n=16)	Группа 2-я 10-е сутки (n=20)	Группа 3-я 5-е сутки (n=16)	Группа 3-я 10-е сутки (n=16)
Площадь ожога, см ²	11,66 (11,50-11,94)	9,48 (9,28-9,93)	10,33 (10,17-10,56) #	8,34 (8,19-8,51) #
Относительная площадь, %	3,34 (3,25-3,39)	3,17 (3,10-3,29)	3,36 (3,23-3,42)	3,02 (2,91-3,13) #
Скорость эпителизации, % / сут	0,89 (0,86-0,89)	1,90 (1,88-1,95)	1,33 (1,29-1,35) #	6,57 (5,92-6,93) #
Уменьшение площади раны, %	2,61 (2,59-2,64)	3,68 (3,53-4,23)	9,80 (9,64-10,08) #	16,10(14,62-17,73) #

Примечание. # – значимые ($p < 0,01$) различия с 2-й группой на соответствующие сутки.

ным отеком окружающей кожи. У животных с ТТ на фоне применения ДП с МТ на 10-е сут струп все еще плотно спаян с подлежащими тканями, но края уже приподняты за счет эпителизации ожоговой поверхности. На 5-е сут значительно уменьшается содержание кетодиенов и сопряженных триенов, а также Шиффовых оснований в изопропанольной фазе, уровень первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой фазе, а также конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе не имеет значимых отличий от группы животных с ТТ без применения МТ. На 10-е сут выявлено снижение кетодиенов и сопряженных триенов в гептановой фазе, оснований Шиффа в изопропанольной фазе липидного экстракта гомогената

кожи ожоговой раны. Максимальный эффект МТ зафиксирован в изопропанольной фазе липидного экстракта гомогената кожи. Содержание в липидном экстракте гомогената кожи ожоговой раны в гептановой фазе конечных продуктов ПОЛ, в изопропанольной фазе вторичных и конечных продуктов ПОЛ на 10-е сут было статистически значимо ниже, чем на 5-е сут ТТ, что соответствует изменению содержания продуктов ПОЛ в динамике ТТ без применения МТ.

Проведен корреляционный анализ показателей характеризующих репарацию ожоговой раны (абсолютную площадь) и содержание продуктов ПОЛ при ТТ и при ТТ в условиях применения МТ (табл. 3). При ТТ на 5-е сут наблюдения выявлена обратная слабая

Таблица 2

Влияние мелатонина в составе дермальной пленки на содержание продуктов ПОЛ в гомогенате кожи ожоговой раны при ТТ [Me (Q₂₅-Q₇₅)]

Показатели	Группа 1-я (n=20)	Группа 2-я 5-е сутки (n=21)	Группа 2-я 10-е сутки (n=32)	Группа 3-я 5-е сутки (n=25)	Группа 3-я 10-е сутки (n=28)
ДК (г), е.и.о.	0,920 (0,863-0,975)	0,889 (0,834-0,966)	0,891 (0,836-0,944)	0,866 (0,808-0,908)	0,889 (0,834-0,942)
КДиСТ (г), е.и.о.	0,049 (0,013-0,088)	0,123 (0,112-0,141) *	0,115 (0,101-0,141) *	0,109 (0,103-0,161) *	0,095 (0,058-0,131) *#
ШО (г), е.и.о.	0 (0-0,011)	0,018 (0,013-0,031) *	0,009 (0,003-0,018) *	0,019 (0,012-0,028) *	0,004 (0,003-0,017) *
ДК (и), е.и.о.	0,601 (0,596-0,622)	0,594 (0,570-0,732)	0,580 (0,568-0,614)	0,587 (0,579-0,613)	0,600 (0,584-0,625)
КДиСТ (и), е.и.о.	0,217 (0,209-0,228)	0,259 (0,200-0,213) *	0,210 (0,169-0,264)	0,214 (0,183-0,219) #	0,195 (0,165-0,239)
ШО (и), е.и.о.	0 (0-0,011)	0,030 (0,015-0,04) *	0,007 (0,004-0,026) *	0,019 (0,016-0,025) *#	0,004 (0,002-0,009) *#

Примечание. * – значимые ($p < 0,01$) различия с показателями 1-й группы, # – 2-й группы на соответствующие сутки. Содержание продуктов ПОЛ в гептановой (г) и изопропанольной (и) фазах липидного экстракта. ДК – диеновые конъюгаты, КДиСТ – кетодиены и сопряженные триены, ШО – Шиффовы основания.

Таблица 3

Корреляция между абсолютной площадью ожоговой раны (см²) и содержанием продуктов ПОЛ в гомогенате кожи ожоговой раны при ТТ

Продукты ПОЛ	Группа 2-я		Группа 3-я	
	5 сутки (n=21)	10 сутки (n=32)	5 сутки (n=25)	10-е сутки (n=28)
ДК (г), е.и.о.	R=0,05	R=0,08	R=0,13	R=0,17
КДиСТ (г), е.и.о.	R= -0,27	R= -0,62	R=0,32	R=0,39
ШО (г), е.и.о.	R= -0,41	R= -0,28	R=0,33	R=0,38
ДК (и), е.и.о.	R= -0,07	R= -0,15	R=0,11	R=0,22
КДиСТ(и), е.и.о.	R= -0,51	R= -0,72	R=0,47	R=0,62
ШО (и), е.и.о.	R= -0,57	R= -0,72	R=0,47	R=0,78

Примечание. Приведены значения коэффициента корреляции Спирмена (R). Полужирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) связи.

связь с содержанием Шиффовых оснований в гептановой фазе липидного экстракта кожи, обратная средней силы связь с уровнем кетодиенов и сопряженных триенов, Шиффовых оснований в изопропанольной фазе. На 10-е сут ТТ зафиксирована обратная средней силы связь с содержанием кетодиенов и сопряженных триенов в гептановой фазе, кетодиенов и сопряженных триенов, оснований Шиффа в изопропанольной фазе липидного экстракта кожи. Итак, площадь ожоговой раны ассоциирована с содержанием в ее липидном экстракте продуктов ПОЛ, преимущественно вторичных и конечных в изопропанольной фазе. При экспериментальной ТТ в условиях применения ДП с МТ сохраняются аналогичные по силе связи абсолютной площади ожоговой раны практически с теми же показателями содержания продуктов ПОЛ, но положительные по своей направленности. Так, на 5-е сут наблюдения установлены прямые слабые связи содержания кетодиенов и сопряженных триенов, оснований Шиффа в изопропанольной фазе липидного экстракта кожи. На 10-е сут эксперимента отмечены прямые слабые связи с уровнем кетодиенов и сопряженных триенов, оснований Шиффа в гептановой фазе, прямая средней силы связь с содержанием кетодиенов и сопряженных триенов, а также сильная связь с содержанием оснований Шиффа в изопропанольной фазе липидного экстракта кожи. Таким образом, уменьшение площади ожога при использовании ДП с МТ ассоциировано со снижением преимущественно вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта кожи очага термического повреждения.

Обсуждение

При ТТ в очаге повреждения кожи накапливаются продукты ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта, что отражает избыточную генерацию активных форм кислорода (АФК). Основные источники АФК и окислительного стресса после ТТ — активированные нейтрофилы, моноциты/макрофаги, эндотелиоциты с известными системами генерации АФК: НАДФН-оксидаза и МПО у фагоцитов, ксантинооксидаза у эндотелиоцитов, NO-синтаза у моноцитов/макрофагов [21]. Ключевую роль в генерации АФК при ТТ отводят нейтрофилам. ТТ вызывает дисфункцию митохондрий, обусловленную активацией комплекса $\text{NIF1}\alpha$ — mTORC1 , что сопряжено с увеличением генерации АФК, особенно в комплексе I [22]. При ТТ повышается продукция эндогенных глюкокортикоидов, которые вызывают окислитель-

ный стресс. Вклад в патогенез окислительного стресса при ТТ вносит снижение уровня в организме цинка и меди, входящих в состав СОД, за счет их потери с мочой и экссудатом в ожоговой ране, а также дефицит селена (компонент ГПО) при низком поступлении через ЖКТ после ожогов [23]. Продукты ПОЛ в очаге ТТ являются не только продуктами и участниками деструкции липидов и дизрегуляции в клетках, они связаны активацией транскрипции генов ферментов антиокислительной защиты, регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, активации Т-лимфоцитов и др. [24]. Взаимодействие электрофильных продуктов ПОЛ с белковыми молекулами (липоксидирование) приводит к модификации последних, которые в свою очередь участвуют в механизмах клеточной сигнализации, регуляции процессов воспаления и репарации в ране.

Продемонстрированный нами в очаге повреждения ПОЛ-ограничивающий и стимулирующий репарацию эффект МТ в составе ДП при экспериментальной ТТ может быть обусловлен несколькими механизмами. Прежде всего, МТ благодаря своим липофильным свойствам быстро распределяется в межклеточном пространстве и внутри клеток посредством пассивной диффузии, а также с использованием транспортеров глюкозы (GLUT1) и олигопептидов (PEPT1/2) [25]. МТ взаимодействует с мембранными рецепторами, ассоциированными с G-белками, — MT1 (Mel1a), MT2 (Mel1b), GPR50 (Mel1c), цитозольным рецептором MT3 , связывается в ядре клетки с $\text{ROR}\alpha$, рецептором витамина D [26]. Рецептор MT1 обнаружен в кератиноцитах и фибробластах кожи, клетках волосяного фолликула, рецептор MT2 — преимущественно в эккринных железах и кровеносных сосудах кожи, меланоцитах [27]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что при повреждении кожи МТ накапливается в эпидермисе, защищая митохондрии и обеспечивая синтез АТФ. Механизмы антиоксидантного действия МТ в коже включают прямое поглощение АФК, стимуляцию синтеза через активацию генов глутатиона, активацию глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы, СОД-1, СОД-2, каталазы, гемоксидазы-1, снижение активности хинонредуктазы-2, NOS-1. Одна молекула МТ способна связывать до четырех и более АФК, а антиоксидантный эффект МТ более выражен, чем у витаминов С и Е в эквивалентной дозе. Антиоксидантный эффект МТ реализуется при поступлении МТ внутрь митохондрий через транспортер PEPT1/2, поддержание потенциала митохондриальной мембраны ($\Delta\psi\text{ m}$) и увеличение окис-

лительного фосфорилирования, продукции АТФ, а не АФК. Противовоспалительное действие МТ связывают с ограничением NF- κ B-зависимых путей внутриклеточной сигнализации. Так, после облучения кератиноцитов ультрафиолетом МТ ингибирует экспрессию многих провоспалительных факторов: iNOS, ЦОГ-2, TNF-альфа [28]. Репарация ДНК в клетках кожи регулируется МТ как опосредованно за счет указанного выше антиоксидантного действия, так и прямо в связи с увеличением экспрессии p53 [29]. Стимулирующий репарацию эффект МТ реализуется на уровне кератиноцитов, меланоцитов, фибробластов, различных популяций лейкоцитов, макрофагов.

Отметим, что натрий карбоксиметилцеллюлоза как базисный компонент ДП способствует созданию влажной среды в ожоговой ране, позволяет исключить болевые ощущения при перевязках по сравнению с «сухими» ведением ожогов, но не обладает собственным ПОЛ-ограничивающими и антиоксидантными свойствами [30, 31].

Выводы:

1. В очаге термического повреждения кожи накопление вторичных (кетодиены и сопряженные триены) и конечных (основания Шиффа) продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта на 5-е и 10-е сут экспериментальной ТТ ассоциировано с площадью ожога.

2. Применение при экспериментальной ТТ оригинальной ДП с МТ на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы приводит в очаге термического повреждения кожи на 5-е и 10-е сут наблюдения к снижению абсолютной и относительной площади ожога, увеличению скорости эпителизации ожоговой поверхности, на 5-е сут – к снижению уровня вторичных и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе, на 10-е сут – к снижению вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе, конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидного экстракта.

3. Установлено, что при экспериментальной ТТ в условиях применения ДП с МТ площадь ожога снижается по мере уменьшения содержания вторичных и конечных продуктов ПОЛ преимущественно в изопропанольной фазе липидного экстракта гомогената кожи из очага термического повреждения.

Литература

(п.п. 1-6; 13-16; 18; 21-29; 31 см. References)

7. Клычникова Е.В., Тазина Е.В., Смирнов С.В., Спиридонова Т.Г., Жиркова Е.А., Борисов В.С. и др. Взаимосвязь биохимических показателей окислительного стресса, эндогенной интоксикации

и регуляции сосудистого тонуса у больных с ожоговой травмой. *Анестезиология и реаниматология*. 2015; 60(1): 45-9.

8. Карякин Н.Н., Клеменова И.А. Технологии лечения ожогов в условиях влажной среды. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 9: 495-9.
9. Осиков М.В. Роль орозомукоида в регуляции активности систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 7: 27-30.
10. Осиков М.В., Григорьев Т.А. Влияние эритропоэтина на активность систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 1: 27-30.
11. Осиков М.В. Влияние эритропоэтина на процессы свободно-радикального окисления и экспрессию гликопротеинов в тромбоцитах при хронической почечной недостаточности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 157(1): 30-3.
12. Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Агеев Ю.И. Влияние эритропоэтина на апоптоз лимфоцитов при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 3: 326-9.
17. *Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях*. Текст: электронный. Страсбург, 1986. CouncilofEurope [сайт]. URL: <https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=090000168007a6a8> (дата обращения 13.04.20).
19. Васютков, В.Я. *Трофические язвы стопы и голени*. М.: Медицина; 1993.
20. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*. Челябинск; Челябинский государственный педагогический университет; 2000.
30. Тишков Т.М., Погребняк А.В., Погребняк Л.В. Современные вспомогательные вещества. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 2(1). Available at: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=22742> (Accessed 10.12.2020).

References

1. WHO Fact Sheet: Burns. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>. (accessed 10 June 2020)
2. Singer A.J., Boyce S.T. Burn Wound Healing and Tissue Engineering. *Journal of Burn Care & Research*. 2017; 38(3): 605-613. doi: 10.1097/BCR.0000000000000538
3. Milkovic L., CipakGasparovic A., Cindric M., Mouthuy PA., Zarkovic N. Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts. *Cells*. 2019; 8(8): 793. <https://doi.org/10.3390/cells8080793>
4. Ke J., Bian X., Liu H, Li B., Huo R. Edaravone reduces oxidative stress and intestinal cell apoptosis after burn through up-regulating miR-320 expression. *Mol Med*. 2019; 25(1): 54. <https://doi.org/10.1186/s10020-019-0122-1>
5. Gegotek A., Skrzydlewska E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chem Phys Lipids*. 2019; 221: 46-52. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2019.03.011
6. Valacchi G., Virgili F., Cervellati C., et al. OxInflammation: From Subclinical Condition to Pathological Biomarker. *Front Physiol*. 2018; 9: 858. doi: 10.3389/fphys.2018.00858
7. Klychnikova E.V., Tazina E.V., Smirnov S.V., Spiridonova T.G., Zhirkova E.A., Borisov V.S., et al. Interrelation of biochemical parameters of oxidative stress, endogenous intoxication and vascular tone regulation in patients with burn injury. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2015; 60(1): 45-9. (in Russian)

8. Karyakin N.N., Klemenova I. A technologies for the treatment of burns in a humid environment. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2015; 9: 495-9. (in Russian)
9. Osikov M.V. The role of orosomucoid in the regulation of the activity of plasma proteolysis systems in experimental renal failure. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2009; 7: 27-30. (in Russian)
10. Osikov M.V., Grigor'ev T.A. Effect of erythropoietin on the activity of plasma proteolysis systems in experimental renal failure. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2012; 1: 27-30. (in Russian)
11. Osikov M.V. The influence of erythropoietin on the processes of free radical oxidation and the expression of glycoproteins in platelets in chronic renal failure. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2014; 157(1): 30-3. (in Russian)
12. Osikov M.V., Telesheva L.F., Ageev Yu.I. Effect of erythropoietin on lymphocyte apoptosis in experimental chronic renal failure. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2015; 3: 326-9. (in Russian)
13. Tordjman S., Chokron S., Delorme R. et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*. 2017; 15(3): 434-44. doi: 10.2174/1570159x146666161228122115
14. Slominski A.T., Semak I., Fischer T.W., Kim T.K., Kleszczyński K., Hardeland R., et al. Metabolism of melatonin in the skin: Why is it important? *Experimental Dermatology*. 2017; 26(7): 563-8. doi: 10.1111/exd.13208
15. Hristova M., Tzaneva M., Bekyarova G. et al. Molecular Mechanisms of Melatonin Protection from Gastric Mucosal Apoptotic Injury in Experimental Burns. *Molecules*. 2018; 23(4): E749. doi: 10.3390/molecules23040749
16. Lee J.H., Moon J.H., Nazim U.M., Lee Y.J., Seol J.W., Eo S.K., et al. Melatonin protects skin keratinocyte from hydrogen peroxide-mediated cell death; the SIRT1 pathway. *Oncotarget*. 2016; 7: 12075-88
17. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental or Other Scientific Purposes*. Available at: URL: <https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=090000168007a6a8> (accessed 13 may 2020). (in Russian)
18. Alexander R.T., Fowler D.R. Modeling the Distribution of Scald Type Burns in a Child. *Acad Forensic Pathology*. 2016; 6(4): 638-56.
19. Vasyutkov V.Ya. *Trophic ulcers of the foot and lower leg. [Troficheskie yazyv stopy i goleni]* Moscow: Meditsina; 1993. (in Russian)
20. Volchegorskiy I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Tseylikman V.E. *Experimental modeling and laboratory assessment of the adaptive reactions of the body. [Eksperimental'noe modelirovanie i laboratornaya otsenka adaptivnykh reaktsiy organizma]*. Chelyabinsk; Chelyabinskii gosudarstvennyy pedagogicheskiy universitet; 2000. (in Russian)
21. Jacob S., Herndon D.N., Hawkins H.K., Enkhbaatar P., Cox R.A. Xanthine oxidase contributes to sustained airway epithelial oxidative stress after scald burn. *International Journal of Burns and Trauma*. 2017; 7(6): 98-106.
22. Nakazawa H., Ikeda K., Shinozaki S., Yasuhara S., Yu Y.M., Martyn J.A.J., et al. Coenzyme Q10 protects against burn-induced mitochondrial dysfunction and impaired insulin signaling in mouse skeletal muscle. *FEBS Open Bio*. 2019; 9(2): 348-63.
23. Lee Y.H., Bang E.S., Lee J.H., Lee J.D., Kang D.R., Hong J., et al. Serum Concentrations of Trace Elements Zinc, Copper, Selenium, and Manganese in Critically Ill Patients. *Biological Trace Element Research*. 2019; 188(2): 316-25.
24. CipakGasparovic A., Zarkovic N, Zarkovic K., et al. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. *British Journal of Pharmacology*. 2017; 174(12): 1771-83.
25. Mayo J.C., Aguado A., Cernuda-Cernuda R., Alvarez-Artime A., Cepas V., Quiros-Gonzalez I., et al. Melatonin uptake by cells: an answer to its relationship with glucose? *Molecules*. 2018; 23: 1999. doi:10.3390/molecules23081999
26. Boutin J.A., Ferry G. Is there sufficient evidence that the melatonin binding Site MT3 is Quinone Reductase 2? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2019; 368: 59-65.
27. Iryna Rusanova, Laura Martínez-Ruiz, Javier Florido, César Rodríguez-Santana, Ana Guerra-Librero, Darío Acuña-Castroviejo, et al. Protective Effects of Melatonin on the Skin: Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(19): 4948. doi: 10.3390/ijms20194948
28. Favero G., Franceschetti L., Bonomini F., et al. Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammation Activation. *International Journal of Endocrinology*. 2017; 2017: 1835195. doi: 10.1155/2017/1835195
29. Galano A., Tan D.X., Reiter R.J. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. *Molecules*. 2018; 23: 530. doi:10.3390/molecules23030530
30. Tishkov T.M., Pogrebnyak A.V., Pogrebnyak L.V. Modern auxiliary substances. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 2(1). Available at: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=22742> (Accessed 10.12.2020). (in Russian)
31. Dwiyana R.F., Yogya Y., Gondokaryono S.P., Diana I.A., Suwarsa O., Ramali L.M., et al. Clinical efficacy of biocellulose, carboxymethyl cellulose and normal saline dressing in epidermolysis bullosa. *J Wound Care*. 2019; 28(10): 4-9. doi: 10.12968/jowc.2019.28.Sup10.S4

Сведения об авторах:

Осиков Михаил Владимирович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии, e-mail: prof.osikov@yandex.ru;

Симоная Елена Владимировна, канд. фарм. наук, доцент;

Агеева Анна Алексеевна, ассистент каф. патологической физиологии, e-mail: anne.ageeva.r@yandex.ru;

Синицкий Антон Иванович, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. биохимии им. П.И. Лифшица, sinitskiyai@yandex.ru;

Агеев Юрий Иванович, канд. мед. наук, ст. преподаватель каф. патологической физиологии, e-mail: doctorageev@mail.ru

ОБЗОРЫ

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092

Хохлова А.В.¹, Бойченко П.К.², Пархомчук Д.С.³, Востриков А.А.³

Течение COVID-19 у лиц с сахарным диабетом и ожирением в кластере метаболического синдрома

¹ГОУ ВО ЛНР «Луганский государственный педагогический университет»,
Луганск, ул. Оборонная, д. 2;

²ГУ ЛНР «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки»,
91045, Луганск, квартал 50-летия Обороны Луганска, д. 1 г;

³ГУ ЛНР «Луганский республиканский Центр экстренной медицинской помощи и медицины катастроф»,
Луганск, ул. Щаденко, д. 10 а

Пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2 является актуальнейшей проблемой как отечественного, так и мирового здравоохранения. На сегодня уже установлено, что при данной вирусной инфекции наиболее уязвимыми с выраженным тяжелым течением и высокой летальностью являются лица, имеющие различные хронические заболевания, в том числе сахарный диабет (СД) и ожирение, которые выступают основными компонентами метаболического синдрома (МС). В статье обсуждаются: эпидемиология, патогенез, наиболее распространенные симптомы заболевания, а также особенности течения COVID-19 у лиц с ожирением и СД.

Ключевые слова: сахарный диабет; ожирение; метаболический синдром; COVID-19; патогенез

Для цитирования: Хохлова А.В., Бойченко П.К., Пархомчук Д.С., Востриков А.А. Течение COVID-19 у лиц с сахарным диабетом и ожирением в кластере метаболического синдрома. 2021; 65(5):- *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 102-106.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.102-106

Участие авторов: Хохлова А.В. внесла существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и анализ данных, подготовила первый вариант статьи; Бойченко П.К. внес вклад в анализ и интерпретацию данных, утвердил присланную в редакцию рукопись; Пархомчук Д.С. участвовал в переработке первого варианта статьи на предмет актуального аналитического содержания; Востриков А.А. участвовал в получении и анализе данных и подготовке первого варианта статьи.

Для корреспонденции: Востриков Алексей Андреевич, e-mail: seruj_strag@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 06.08.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Khokhlova A.V.¹, Boichenko P.K.², Parkhomchuk D.S.³, Vostrikov A.A.³

COVID-19 in persons with diabetes mellitus and obesity in a cluster of metabolic syndrome

¹Luhansk State Pedagogical University,
Oboronnaya Str. 2, Luhansk;

²St. Luka Luhansk State Medical University,
Quarter of the 50th Anniversary of Defense of Luhansk 1, Luhansk 91045;

³Luhansk National Center for Emergency Medicine and Disaster Medicine,
Shchadenko Str. 10a, Luhansk

The new coronavirus COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus is a current issue for both national and international healthcare. It has already been established that those most vulnerable to this viral infection have a pronounced, severe course and high mortality rate. These are patients with various chronic diseases, including diabetes mellitus (DM) and obesity, which are the main components of the metabolic syndrome (MS). This article describes the epidemiology, the pathogenesis, the most common symptoms, and the characteristics of COVID-19 in obese patients with DM.

Keywords: diabetes mellitus; obesity; metabolic syndrome; COVID-19; pathogenesis

For citation: Khokhlova A.V., Boichenko P.K., Parkhomchuk D.S., Vostrikov A.A. COVID-19 in persons with diabetes mellitus and obesity in a cluster of metabolic syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' nayaterapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65 (1): 102-106. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.102-106

Author's contribution: A.V. Khokhlova considerably contributed to the study concept and design and to data obtaining and analysis; also, she prepared the first version of the manuscript. P.K. Boichenko contributed to data analysis and interpretation and approved the manuscript for submission. D.S. Parkhomchuk revised the first version of the manuscript. A.A. Vostrikov contributed to data analysis and interpretation and to preparation of the first version of the manuscript.

For correspondence: *Vostrikov A.A.*, e-mail seruj_strag@mail.ru

Acknowledgment. The authors declare no conflict of interest

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

Information about the authors:

Khokhlova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9569-8928>; SPIN: 6970-0037

Received 06.08.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Кратко об эпидемиологии. 2020 год можно смело охарактеризовать годом великих и печальных событий, который стал нелегким испытанием на прочность для систем здравоохранения всего мира. Каждый из нас столкнулся с неизбежным и беспрецедентным вызовом, связанным с возникновением нового вида коронавируса. 11 февраля 2020 г. Международным комитетом по таксономии вирусов, новому инфекционному заболеванию COVID-19 было присвоено официальное название – SARS-CoV-2 (Severity Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). В связи с развитием пандемии COVID-19, прогнозирование течения заболевания с выделением наиболее уязвимых групп населения приобрело высокую актуальность [1].

По состоянию на 12 мая 2020 г., по данным ВОЗ, было зарегистрировано 4 058 252 подтвержденных случаев SARS-CoV-2, в том числе 281 736 случаев смерти пациентов. Стало очевидным, что тяжесть этой эпидемии усугубляется и в значительной мере объясняется эпидемическим распространением таких заболеваний как ожирение, и сахарный диабет (СД), которые являются проявлениями метаболического синдрома (МС) и отягощают течение инфекционного процесса [1, 2]. Согласно некоторым данным, в первые месяцы пандемии у преимущественного большинства пациентов с тяжелым течением COVID-19 обнаружены ряд сопутствующих патологий: ожирение, СД, артериальная гипертензия (АГ) и др. У данной категории больных были выявлены особенности иммунного ответа на SARS-CoV-2, а именно предельно высокая активность вируса в условиях как гипергликемии, так и ожирения. Так, ожирение напрямую или косвенно значительно усугубляло течение и увеличивало количество летальных исходов при COVID-19 [3]. Также было выявлено, что у пожилых пациентов с СД 2-го типа SARS-CoV-2 был напрямую взаимосвязан с развитием и про-

грессированием гипергликемии [4]. Кроме того установлено, что риск тяжелого течения COVID-19 увеличивается в диапазоне от 1,67 до 3,66 раз ($p \leq 0,001$) при наличии СД [5].

Независимыми группами исследователей в США, Италии и Китае проведен анализ, который продемонстрировал различную частоту встречаемости COVID-19 у больных СД. Так, в Китае по данным центров профилактики и контроля заболеваемости, частота больных COVID-19 с наличием СД составила около 5,2% среди 20 000 больных [6], в США 10,9% из 7162 случаев [7], тогда как в Италии из 355 больных более 35% имели СД [8]. Однако в ряде исследований достоверно доказано, что при наличии СД коронавирусная инфекция протекает гораздо тяжелее, чем у пациентов, не имеющих СД, то же касается и частоты летальных исходов. Так, частота летальных исходов была выше до 4,4 раза у больных с СД и SARS-CoV-2 в сравнении с пациентами с COVID-19 без СД [9].

Был осуществлен масштабный анализ I. Huang и соавт. около 30 исследований, в которых было описаны исходы пневмонии у пациентов с COVID-19. Показано, что у больных СД отмечались более высокие риски отягощенного течения коронавирусной пневмонии, более частое развитие острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), и как следствие, более высокая летальность [10].

Патогенез. В патогенезе COVID-19 условно выделяют 3 механизма, что соответствует клиническим стадиям патологического процесса [11]. Исключительно от активности противовирусного иммунитета и степени выраженности провоспалительных реакций, зависит тяжесть патологических процессов (патоморфологическая картина) при COVID-19 и особенности клинического течения. При попадании на слизистую оболочку SARS-CoV-2 связывается с эпителиальными

клетками посредством рецептора ангиотензинконвертирующего фермента 2 (АПФ2), проникает внутрь клетки, где и начинается репликация вируса. Следует отметить, что первично аффлекторными клетками, чаще всего выступают ресничные клетки дыхательных путей. [12, 13]. Затем в течение нескольких суток происходит локальное персистирование, после чего вирус распространяется, что происходит на фоне бессимптомных или слабовыраженных клинических проявлений, но с частой потерей обоняния (аносмия). На данном этапе, несмотря на незначительную вирусную нагрузку, больные COVID-19 абсолютно контагиозны и вирус легко обнаруживается в назальных мазках [14]. В этом периоде инфицированные вирусом эпителиальные клетки являются основным источником бета- и лямбда-интерферонов, что является основным противовирусным ответом со стороны врожденного иммунитета. Доказано, что дальнейший сценарий развития COVID-19 зависит от выраженности ответа данного звена иммунитета [11, 15].

Персистирование SARS-CoV-2 возможно с локализацией в верхних дыхательных путях и последующей элиминацией, тогда как при другом варианте COVID-19 происходит проникновение вируса в клетки нижних дыхательных путей, что неизбежно приводит к прогрессированию гипериммунных реакций. В случае локализации в верхних дыхательных путях (встречается у 80% больных) наблюдается клинический вариант легкой ОРВИ или болезнь протекает бессимптомно. При втором варианте, который требует госпитализации пациента, а также интенсивной терапии происходит развитие вирусной пневмонии и различных нереспираторных поражений органов и тканей вирусом нового типа [3, 15].

На сегодня в знаниях этиологии и патогенеза SARS-CoV-2 имеются значительные пробелы, которые будут заполняться. Неизвестным остается вопрос о наличии альтернативных рецепторов для проникновения вируса, малоизученными являются механизмы врожденного иммунного ответа, в том числе и особенности гипериммунной реакции, вызванной COVID-19 [11]. SARS-CoV-2 при попадании в альвеолы относительно быстро реплицируется и вызывает гипериммунный воспалительный ответ, вследствие чего возникает гиперцитокинемия с повреждением ткани легкого и других органов. Данное явление гипериммунного ответа при COVID-19 получило название «цитокиновый шторм», для которого характерна неконтролируемая выработка провоспалительных цитокинов и развитие острого респираторного синдрома (ОРДС) на фоне прогрессирования полиорганной недостаточности.

Важно отметить, что наряду с нарушениями иммунной функции у пациентов с COVID-19 происходит частое присоединение вторичной бактериальной инфекции, что в значительной мере утяжеляет дыхательную недостаточность и вызывает дополнительные токсические и воспалительные каскады [16].

При наличии у пациента с COVID-19 исходной коморбидной патологии, в том числе МС (именно ожирения и СД как компонентов синдрома) наблюдается крайне неблагоприятный прогноз: до 33% случаев ОРДС, около 8% острая дыхательная недостаточность, до 20% острая сердечно-сосудистая недостаточность, примерно у 8% больных обнаруживается острая почечная недостаточность, тогда как в 71% случаев выявляется синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром) [17, 18].

Сахарный диабет и COVID-19. С целью более глубокого понимания взаимосвязи COVID-19 с СД необходимо знание некоторых особенностей строения вируса нового типа и его взаимодействия с клетками организма человека. SARS-CoV-2 является РНК-3-содержащим вирусом, его оболочка в своей структуре имеет ряд элементов (гликопротеинов), которые обеспечивают целостность вириона и способствуют проникновению вируса в клетку. SARS-CoV-2 имеет специфический поверхностный гликопротеин, получивший название «шип», с помощью которого он взаимодействует с АПФ2, что необходимо для проникновения внутрь клетки [13]. После того, как происходит соединение вируса со своим АПФ2-рецептором на поверхности клеток-мишеней, при помощи трансмембранной сериновой протеазы (TMPRSS2) происходит «разрезание» АПФ2-рецептора, что приводит к попаданию вируса вместе с рецептором внутрь клетки, где происходит его дальнейшая репликация [19].

В Китае (город Ухань) среди всех случаев летальных исходов при COVID-19 42,3% больных имели СД [20]. Хорошо известным является тот факт, что сахарному диабету сопутствует значительная коморбидность, которая связана как с общностью патогенетических механизмов, (в первую очередь это касается сердечно-сосудистых заболеваний), так и с нарушением всех звеньев метаболизма. В исследованиях Bornstein S.R. и соавт. доказано, что гипергликемия усиливает экспрессию АПФ2, что способствует беспрепятственному проникновению SARS-CoV-2 в клетки, но это касается исключительно острой гипергликемии. У пациентов с хронической гипергликемией, наоборот, отмечается значительное снижение экспрессии АПФ2, что делает клетки-мишени еще более уязвимыми к повреждающему и воспалительному действиям

COVID-19 [21]. Важно отметить, что после эндоцитоза SARS-CoV-2 экспрессия АПФ2 значительно снижается [22], это приводит к ряду патологических последствий. Так, проникновение вируса в ткани поджелудочной железы вызывает усиленное повреждение бета-клеток островков Лангерганса, вырабатывающих инсулин [23], что создаёт предпосылки к развитию острой гипогликемии. Кроме этого, ухудшение секреции инсулина вызвано и тем, что после проникновения вируса внутрь клетки происходит подавление АПФ2, и это приводит к продукции ангиотензина II, от которого зависит кровоснабжение островков Лангерганса [24]

Однако ряд зарубежных исследований демонстрируют, что выраженное ингибирование АПФ2 не единственная причина тяжелого течения коронавирусной инфекции у больных, страдающих СД. На сегодня уже выявлены некоторые дополнительные патофизиологические механизмы, которые способны также выступать причиной более тяжелого течения COVID-19 у больных с СД. Так, у больных всеми типами СД имеется стойкое нарушение как клеточного, так и гуморального иммунитета, что в свою очередь способствует увеличению риска инфицирования, что в том числе обосновывает тяжесть течения COVID-19 [25].

Ожирение и COVID-19. Для пациентов с МС помимо СД 2-го типа характерно наличие абдоминального ожирения, которое вносит свой негативный вклад в риск развития тяжелых форм COVID-19. Известным является то, что пациенты с ожирением имеют более высокие концентрации лептина и низкие концентрации адипонектина, что также приводит к различным нарушениям регуляции иммунного ответа [26].

У пациентов с МС, который включает в себя ожирение и СД, отмечается более высокая концентрация некоторых провоспалительных цитокинов: фактор некроза опухоли альфа, моноцитарный хемотаксический фактор 1, интерлейкин 6 [25]. В 2017 г. W.D. Green было показано, что ожирение способно в значительной мере ослаблять адаптивные иммунные реакции на вирус гриппа, а нарушение регуляции провоспалительного ответа усугубляло тяжесть поражения легких, которая наблюдалась у больных во время эпидемии гриппа [27]. Следует предположить, что в случае с SARS-CoV-2 это тоже имеет место.

Наличие ожирения и СД 2-го типа у пациента с МС способно увеличивать риск тромбоэмболических осложнений. Высокая частота венозных тромбоэмболий и развитие ДВС-синдрома сопровождают тяжелые формы новой коронавирусной инфекции с более высокой частотой наблюдаемая у больных с индексом массы тела более 35 кг/м². Причем, ожирение в значи-

тельной степени затрагивает функцию легких, опосредованно уменьшая объем форсированного выдоха и жизненную емкость легких. Все эти кардиореспираторные, кардиометаболические и тромботические последствия ожирения и СД 2-го типа при МС неизбежно приводят к ослаблению метаболического ответа и отягощают течение COVID-19. Так, в исследовании Simonnet A., проведенном во Франции, риск искусственной вентиляции легких у больных SARS-CoV-2, поступивших в стационар, был выше примерно в 7 раз у людей с ИМТ более 35 кг/м² в сравнении с пациентами без ожирения [28].

Ожирение также способно оказывать опосредованное влияние на коронавирусную инфекцию (через увеличение риска ССЗ, СД). Кроме того, возникают трудности в ведении данной категории больных в условиях стационара, а именно: затруднения при интубации трахеи, сложности размещения пациента на койке с учетом массы тела, проблемы при транспортировке и пр. [29].

Заключение

Таким образом, как СД, так и ожирение, являющиеся проявлениями МС, необходимо учитывать в качестве дополнительного фактора риска заболеваемости и летальности при COVID-19. В условиях пандемии больные МС требуют повышенного внимания со стороны системы здравоохранения. Данная категория пациентов является наиболее уязвимой в отношении отягощенного течения гиперреакции иммунного ответа, инициированного SARS-CoV-2.

Складывается неподдельное ощущение, что природа решила включиться в борьбу с пандемией МС таким неординарным путем, как развитие COVID-19, поставив пациентов перед суровым выбором – либо нормализация массы тела и жесткий контроль гликемии, либо наиболее высокий риск смертности от SARS-CoV-2, что требует более тщательного персонализированного подхода со стороны как лечащего врача, так и здравоохранения в целом.

Литература (п.п. 2-30 см. References)

1. Бабенко А.Ю., Лаевская М.Ю. Сахарный диабет и COVID-19. Как они связаны? Современные стратегии борьбы. Артериальная гипертензия. 2020; 26(3): 304–11. doi:10.18705/1607-419X-2020-26-3-304-311

References

1. Babenko A.Yu., Laevskaya M.Yu. Diabetes mellitus and COVID 19. How are they related? Modern strategies of struggle. *Arterialnaya gipertenziya*. 2020; 26(3): 304–11. doi:10.18705/1607-419X-2020-26-3-304-311. (In Russian)

2. Gupta R., Ghosh A., Singh A.K., Misra A. Clinical considerations for patients with diabetes in times of COVID-19 epidemic. *Diabetes Metab Syndr.* 2020; 14(3): 211–2. doi:10.1016/j.dsx.2020.03.002
3. Yang J., Zheng Y., Gou X., Pu K., Chen Z., Guo Q. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2020; 94: 91–5. doi:10.1016/j.ijid.2020.03
4. Xue T., Li Q., Zhang Q., Lin W., Wen J., Li L., et al. *Blood glucose levels in elderly subjects with type 2 diabetes during COVID-19 outbreak: a retrospective study in a single center.* medRxiv. 2020. [Published online 2 April 2020]. doi:10.1101/2020.03.31.20048579
5. Does comorbidity increase the risk of patients with COVID-19: evidence from meta-analysis / B. Wang et al. *Aging* (Albany NY). 2020; Vol. 12: 6049–57. URL: <https://doi.org/10.18632/aging.103000>
6. Epidemiology Working Group for Ncip Epidemic Response. [The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China. (In Chinese)]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2020; 41(2): 145–51.
7. CDC. Preliminary estimates of the prevalence of selected underlying health conditions among patients with coronavirus disease 2019. United States, February 12 – March 28, 2020. *MMWR.* 2020; 69(13): 382–6.
8. Onder G., Rezza G., Brusaferro S. Case-fatality rate and characteristics of patients dying in relation to COVID-19 in Italy. *JAMA.* 2020. doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4683>
9. Singh A.K., Gupta R., Ghosh A., Misra A. Diabetes in COVID-19: Prevalence, pathophysiology, prognosis and practical considerations. *Diabetes Metab Syndr.* 2020; 14(4): 303–10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.004>
10. Huang I., Lim M.A., Pranata R. Diabetes mellitus is associated with increased mortality and severity of disease in COVID-19 pneumonia – a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Diabetes Metab Syndr.* 2020; 14(4): 395–403. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.018>
11. Ling L., Lianfeng L., Wei C., Taisheng L. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9(1): 727–32. doi: 10.1080/22221751.2020.1746199
12. Tang N.L., Chan, P.K., Wong C.K. et al. Early enhanced expression of interferon-inducible protein-10 (CXCL-10) and other chemokines predicts adverse outcome in severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem.* 2005; Vol. 51: 2333–40. doi:10.1373/clinchem.2005.054460
13. Zhang H., Penninger J.M., Li Y., Zhong N., Slutsky A. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.* 2020; 46(4): 586–90. doi: 10.1007/s00134-020-05985-9.
14. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020. doi: 10.1001/jama.2020.2648
15. Channappanavar R., Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol.* 2017; Vol. 39: 529–39. doi: 10.1007/s0 0281-017-0629-x
16. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395(10223), Feb 15:– 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
17. Jing Y., Zheng Y., Gou X., et al. Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2020; Mar 12. doi:10.1016/j.ijid.2020.03.017
18. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* 2020; Feb 18. doi:10.1016/S2213-2660(20)30 076-X
19. Rabi F.A., Al Zoubi M.S., Kasasbeh G.A., et al. SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: what we know so far. *Pathogens.* 2020; 9(3): 231–5. doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens9030231>
20. Puig-Domingo M., Marazuela M., Giustina A. COVID-19 and endocrine diseases. A statement from the European Society of Endocrinology. *Endocrine.* 2020 Apr; 68(1): 2–5. doi: 10.1007/s12020-020-02294-5. PMID: 32279224; PMCID: PMC7150529
21. Bornstein S.R., Dalan R., Hopkins D., Mingrone G., Boehm B.O. Endocrine and metabolic link to coronavirus infection. *Nat Rev Endocrinol.* 2020; 16(6): 297–8. doi.org/10.1038/s41574-020- 0353-9
22. Vaduganathan M., Vardeny O., Michel T., McMurray J.J.V., Pfeffer M.A., Solomon S.D. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2020; 382(17): 1653–9. doi.org/10.1056/NEJMsr2005760
23. Yang J.K., Lin S.S., Ji X.J., Guo L.M. Binding of SARS coronavirus to its receptor damages islets and causes acute diabetes. *Acta Diabetol.* 2010; 47(3): 193–9. doi.org/10.1007/s00592-009- 0109-4
24. Carlsson P.O., Berne C., Jansson L. Angiotensin II and the endocrine pancreas: effects on islet blood flow and insulin secretion in rats. *Diabetologia.* 1998; 41(2): 127–33.
25. Richard C., Wadowski M., Goruk S., Cameron L., Sharma A.M., Field C.J. Individuals with obesity and type 2 diabetes have additional immune dysfunction compared with obese individuals who are metabolically healthy. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2017; 5(1): e000379. doi:10.1136/bmjdr-2016-000379
26. Ouchi N., Parker J.L., Lugus J.J., Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(2): 85–97.
27. Green W.D., Beck M.A. Obesity impairs the adaptive immune response to influenza virus. *Ann Am Thorac Soc.* 2017; 14(Suppl. 5): S406–S409.
28. Simonnet A., Chetboun M., Poissy J., Raverdy V., Noulette J., Duhamel A., et al. *High prevalence of obesity in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring invasive mechanical ventilation.* Obesity (Silver Spring). 2020. [Ahead of print, published online 9 April 2020]. doi:10.1002/ oby.22831
29. Kravchuk E.N., Neymark A.E., Babenko A.Yu., Grineva E.N. Obesity and COVID-19. *Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension.* 2020; 26(4): 439–45. doi:10.18705/1607-419X-2020-26-4-440-446

Сведения об авторах:

Хохлова Александра Викторовна, аспирант ГОУ ВО ЛНР «ЛГПУ», SPIN: 6970-0037;

Бойченко Павел Константинович, доктор мед. наук, проф. ГУ ЛНР «ЛГМУ им. Св. Луки»;

Пархомчук Демьян Степанович, врио директора ГУ ЛНР «ЛРЦЭМП и МК», SPIN: 4636-1536;

Востриков Алексей Андреевич, бактериолог ГУ ЛНР «ЛРЦЭМП и МК», SPIN: 2403-4230

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.858:612.434'14

Быков Ю.Н.¹, Тетюшкин Н.А.¹, Чипизубов В.А.^{2,3}, Калягин А.Н.¹, Лаврик С.Ю.²

Роль ренин-ангиотензиновой системы в патогенезе болезни Паркинсона

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

²Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 664049, Иркутск, Россия, мкр. Юбилейный, д. 100;

³ГБУЗ Иркутская областная орден «Знак Почёта» клиническая больница, 664049, Иркутск, Россия, мкр. Юбилейный, д. 100

Введение. В настоящее время в научной литературе имеется большой объем данных, посвященных болезни Паркинсона. В то же время недостаточно освещена роль ренин-ангиотензиновой системы (РАС) в патогенезе заболевания.

Цель – оценка современных патогенетически обоснованных подходов к терапии болезни Паркинсона.

Методика. В базах данных Medline (PubMed) и eLibrary осуществлен подбор и анализ современных источников литературы, посвященных изучению роли ренин-ангиотензиновой системы в патогенезе болезни Паркинсона.

Результаты. Болезнь Паркинсона является хроническим нейродегенеративным заболеванием, которое проявляется моторными и немоторными нарушениями. Анализ литературы показал, что помимо системной ренин-ангиотензиновой системы во многих тканях и органах имеется локальная РАС. Авторами было показано, что дофамин и ангиотензин II взаимодействуют в черной субстанции (SN) и стриатуме в реципрокном отношении. В модельных экспериментах на животных доказано, что снижение уровней дофамина сопровождается гиперактивацией ренин-ангиотензиновой системы. При этом так же отмечается выброс активных форм кислорода, индуцируемый микроглиальной тканью, и развитие нейровоспаления, что сопровождается нейродегенерацией. Применение блокаторов ангиотензиновых рецепторов в моделях на животных и в клинических испытаниях позволило значительно снизить прогрессирование нейродегенерации черной субстанции.

Заключение. Авторами изложены результаты, свидетельствующие о том, что развитие болезни Паркинсона сопровождается гиперактивацией мозговой РАС. Подразумевается, что на новое звено патогенеза можно терапевтически воздействовать. Необходимы дополнительные исследования для понимания механизмов данных процессов.

Ключевые слова: ренин-ангиотензиновая система; дофамин; окислительный стресс; болезнь Паркинсона

Для цитирования: Быков Ю.Н., Тетюшкин Н.А., Чипизубов В.А., Калягин А.Н., Лаврик С.Ю. Роль ренин-ангиотензиновой системы в патогенезе болезни Паркинсона. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 107-115. DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.107-115

Участие авторов: концепция и дизайн публикации – Быков Ю.Н., Тетюшкин Н.А.; сбор и обработка материала – Тетюшкин Н.А., Чипизубов В.А.; подготовка иллюстративного материала – Тетюшкин Н.А., Калягин А.Н.; статистическая обработка – Тетюшкин Н.А., Лаврик С.Ю.; написание текста – Быков Ю.Н., Тетюшкин Н.А., Чипизубов В.А., Калягин А.Н., Лаврик С.Ю.; редактирование – Быков Ю.Н.
Для корреспонденции: Быков Юрий Николаевич, e-mail: bykov1971@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность студенту лечебного факультета Иркутского государственного медицинского университета Владиславу Юрьевичу Шенцеву за помощь в подготовке иллюстративного материала.

Поступила 11.01.2019

Принята к печати 21.01.2021

Опубликовано 10.03.2021

Bykov Y.N.¹, Tetyushkin N.A.¹, Chipizubov V.A.^{2,3}, Kalyagin A.N.¹, Lavrick S.Y.²

The role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of Parkinson's disease

¹Irkutsk State Medical University, Krasnogo Vosstaniya Str. 1, Irkutsk 664003, Russian Federation;

²Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Yubileyniy Microdistrict 100, Irkutsk 664049, Russian Federation;

³Irkutsk Regional Hospital, Yubileyniy Microdistrict 100, Irkutsk 664049, Russian Federation

Background. A large amount of literature on Parkinson's disease is currently available. However, the role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of this disease is not sufficiently covered. **Aim.** To highlight new therapeutic possibilities based on pathophysiological mechanisms of Parkinson's disease.

Methods. The literature retrieved from the PubMed, Medline, and eLibrary databases focusing on the role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of Parkinson's disease was analyzed.

Results. Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disease associated with persistent neurological disorders. Studies have demonstrated that a local renin-angiotensin system (RAS) exists in many tissues and organs along with the systemic RAS. The authors showed that dopamine and angiotensin II interact reciprocally in the substantia nigra (SN) and striatum. In animal models, a decrease in the dopamine level was accompanied by RAS overactivation. Furthermore, microglial tissue induced production of reactive oxygen species, which was associated with neuroinflammation. The angiotensin receptor blocker treatment used in animal models and clinical trials significantly reduced the progression of SN neurodegeneration.

Conclusions. The authors reviewed the data of literature demonstrating that the progression of Parkinson's disease is associated with overactivation of the cerebral RAS. Apparently, it is possible to influence therapeutically this new pathogenetic component of Parkinson's disease. Further study is required for understanding the mechanisms of this process.

Keywords: renin-angiotensin system; dopamine; oxidative stress; Parkinson's disease

For citation: Bykov Y.N., Tetyushkin N.A., Chipizubov V.A., Kalyagin A.N., Lavrick S.Y. The role of renin-angiotensin system in pathogenesis of Parkinson's disease. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 107-115. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.107-115

Contributions: conception and design – Bykov Y.N., Tetyushkin N.A.; collection and processing – Tetyushkin N.A., Chipizubov V.A.; preparation of illustrative material – Tetyushkin N.A., Kalyagin A.N.; statistical processing – Tetyushkin N.A., Lavrick S.Y.; writing a text – Bykov Y.N., Tetyushkin N.A., Chipizubov V.A., Kalyagin A.N., Lavrick S.Y.; editing – Bykov Y.N.

For correspondence: **Bykov Yuri**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of the Nervous Diseases of the Irkutsk State Medical University, 664003, Irkutsk, Krasnogo Vosstaniya, 1, e-mail: bykov1971@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Information about the authors:

Bykov Y.N., <https://orcid.org/0000-0002-7836-5179>

Tetyushkin N.A., <https://orcid.org/0000-0003-3828-8743>

Chipizubov V.A., <https://orcid.org/0000-0002-1038-4875>

Kalyagin A.N., <https://orcid.org/0000-0002-2708-3972>

Lavrick S.Y., <https://orcid.org/0000-0003-3125-0486>

Received 11.01.2019

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) занимает одно из ведущих мест среди хронических заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) и является вторым по распространенности нейродегенеративным расстройством после болезни Альцгеймера [1, 2]. Заболеваемость БП составляет в среднем 19 случаев на 1000 населения в год, при этом данное патологическое состояние дебютирует, как правило, в возрасте от 50 лет и старше [3]. По данным А. Arnold и соавт. [2], количество людей, страдающих нейродегенеративным заболеванием к 2030 году в Соединенных Штатах и Европе составит более 5 млн.

На сегодняшний день установлено, что ведущим звеном патогенеза БП является избыточное скопление амилоидных агрегатов – телец Леви. Образование телец Леви сопровождается нейротоксическими эффектами, что приводит к нейродегенерации дофаминергических нейронов в черной субстанции (SN), а также

и в других отделах ЦНС. Считается, что формирование белковых бляшек – телец Леви, обусловлено нарушениями клеточных процессов – повышенной активностью лизосомального аппарата, нарушением процессов фолдинга в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и аппарате Гольджи [4]. К основным факторам, способствующим развитию БП относят: наследственность, пожилой и старческий возраст, влияние экзогенных и/или эндогенных факторов [5]. Принято считать, что основными симптомами БП являются моторные нарушения: брадикинезия, ригидность, тремор и поструральные расстройства [6], наряду с немоторными – когнитивные расстройства, аффективные нарушения, нарушения со стороны ЖКТ, вегетативные расстройства. Медикаментозная терапия является основным методом лечения пациентов с БП, при этом она носит лишь симптоматический характер [7].

Принято считать, что влияние ренин-ангиотензивной системы (РАС) на головной мозг обусловлено эффектами ангиотензина II (АП) (регуляция артериального давления (АД), натрия и воды), которые реализуются через периферические органы [8]. В ряде зарубежных источников имеются данные о роли РАС в патогенезе БП, а именно деградации нейронов SN. При этом вазоактивные вещества (ангиотензины) способны так же оказывать нейропротективное действие, значительно влияя на когнитивные функции и на гемодинамические показатели головного мозга [9].

Выполнен анализ литературных источников в базах данных PubMed, Medline и eLibrary, посвященных изучению роли ренин-ангиотензиновой системы в патогенезе болезни Паркинсона. Цель обзора – анализ современных данных литературы, посвященных изучению роли РАС в патогенезе болезни Паркинсона; выявление возможностей патогенетически обоснованного терапевтического воздействия на основе уточненных патофизиологических данных.

Ренин-ангиотензиновая система мозга. В последнее время, большое внимание уделяется изучению значения РАС в развитии нейродегенеративных заболеваний: болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (БАС) и болезни Гентингтона [10]. В 1971 году в лаборатории Жака Генет (Jacques Genet) в Монреале была открыта «мозговая РАС». Исследования последних лет показывают, что помимо почек продуцировать и активировать АП способны астроциты [11, 12] и, в меньшей степени, нейроны головного мозга [13].

Известно, что ангиотензиноген (АТГ) является предшественником пептида – неактивного АТ. Более того, в астроцитах продуцируется около 90% АТГ, а оставшаяся часть в нейронах [14, 15]. Выделяют 4 основных нейрогормона мозговой РАС: АТI, АТII, АТIII, АТIV, а также 2 дополнительных: – АТ(1-7), состоящий из 7 аминокислот и аламандин (Alamandine).

Известно, что классическая РАС представлена АТI, АТII и ангиотензин-превращающим ферментом (АПФ). При этом выделяют альтернативную РАС, в которую вовлечены и другие нейрогормоны. По данным Vodiga V. и соавт. [13], источником ренина в мозге являются нейроны и астроциты. Так же, отмечено, что нейроны способны продуцировать неактивную форму ренина (проренин) во вне- и внутриклеточное пространство [15]. При этом, проренин имеет высокие концентрации в головном мозге и способен связываться с рецепторами проренина/ренина (PRR). Активированный ренин отщепляет от АТГ 10 аминокислот с образованием неактивного АТI, который под действи-

ем АПФ метаболизируется в АТII. Дуалистический характер АТII обусловлен активацией АТ₁– и АТ₂–рецепторов. Так, АТII под действием аминопептидазы N (АП-N) переходит в АТIII, который связывается с АТ₁–рецептором. В свою очередь, АПФ преобразует АТI в АТ (1–9) [21]. В 2000 году была обнаружена изоформа АПФ – АПФ2, который превращает АТ(1–9) в АТ(1–7) [22]. Стоит отметить, что АТ (1–7) способен связываться с АТ₂– и Mas– рецепторами [21]. По данным A. Tetzner и соавт. [16], был обнаружен MrgD–рецептор, однако функция его не установлена. Основным лигандом для этого рецептора является аламандин, который образуется из АТ(1–7) под действием фермента – декарбоксилазы (ДК-азы). Аламандин так же может метаболизироваться из ангиотензина А под действием АПФ2. При этом источником ангиотензина А является АТII при участии ДК-азы.

Нейроны экспрессируют рецепторы ангиотензинов на поверхность цитоплазматической мембраны. Более того, нейроны так же имеют внутриклеточные рецепторы (АТ₁–, АТ₂– и Mas–), которые располагаются на митохондриях и ядрах, при этом АТ₄–рецепторы имеют цитозольное расположение [15, 17-21] (рис. 1).

Как уже было сказано ранее, клетки головного мозга (астроциты, нейроны) способны продуцировать ангиотензин и ангиотензиноген, как внутриклеточно, так и внеклеточно. Более того, внутриклеточные нейроактивные гормоны – ангиотензины способны связываться с рецепторами типа: АТ₁ – R, АТ₂ – R и Mas – R. Наличие рецепторов к вазоактивным медиаторам РАС позволяет регулировать окислительно-восстановительные реакции в митохондриях. Авторы полагают, что пусковым механизмом оксидативного стресса является активация рецепторов, расположенных в мембране митохондрий. Внутриклеточный сигнал также может транслироваться в ядро клеток, регулируя внутриядерные процессы и, в определенной степени, продукцию активных форм кислорода (АФК) [18, 21].

Аналогом иммунных клеток в нервной ткани является микроглия, которая синтезирует и активирует медиаторы воспаления. В норме нейроны головного мозга выделяют иммуносупрессивные белки, которые подавляют активность микроглиальной ткани. Однако при их активации, они выделяют провоспалительные цитокины и локализуют периферические иммунные клетки в очаге воспаления. Наличие АТ₁–, АТ₂– и Mas–рецепторов на мембранах митохондрий позволяет регулировать образование АФК [18, 20, 22]. В свою очередь, способность ядерного аппарата клеток воспринимать клеточный сигнал приводит к акти-

вации окислительного стресса за счет сигналов провоспалительных цитокинов, которые индуцируют повреждение митохондриальной ДНК [18, 23].

Астроциты являются разновидностью нейроглиальных клеток головного мозга. Основная функция этих клеток: энергообеспечение нейронов, модуляция синаптической передачи, регуляция микроциркуляторных процессов, сохранение кратковременной и долговременной памяти, участие в иммунном ответе [23]. Астроциты способны продуцировать большую часть АТГ, выделяя его во внеклеточное и внутриклеточное пространство. Другими клетками нейроглии являются олигодендроциты, которые играют важную роль в синаптической передаче. Установлено, что астроциты и олигодендроциты имеют AT_1 - и AT_2 -рецепторы,

расположенные на поверхности этих клеток [18, 24-26]. При этом, астроцитарные клетки дополнительно имеют также Mas- рецепторы на своей поверхности и AT_1 -, AT_2 - и Mas- рецепторы, которые располагаются на митохондриях и ядрах. Стоит отметить, что AT_4 -рецепторы не обнаружены в олигодендроцитах, однако эти сведения достоверно не подтверждены [27].

Дофамин и ангиотензин II. В молекулярный патогенез формирования БП вовлечены различные ангиотензины (АТII, АТIII, АТIV, (АТ1-7) и (АТ1-9)). При этом ключевую роль в развитии БП играют АТII и его влияние на nigrostriatную систему. Было установлено, что особую роль в нейродегенерации играет взаимодействие дофамина (ДА) и АТII [28, 29]. В исследованиях Villar-Cheda В. и соавт. [30] изучались взаимо-



Рис. 1. АПФ – ангиотензинпревращающий фермент, АПФ 2 – ангиотензинпревращающий фермент 2, АП – N – аминопептидаза N, АП – А – аминопептидаза А, ДК – декарбоксилаза, АХ – ацетилхолин.

действия между ДА и ангиотензином в клетках SN и возможные способы терапевтического воздействия на данный процесс. Также в моделях на мышах они изучали зависимость между низкими уровнями ДА и повышенной экспрессии AT_2 -рецепторов и активностью NADPH-оксидазного (никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидаза) комплекса в SN и стриатуме [31]. Авторы отметили, что низкие концентрации дофамина стимулируют экспрессию AT_1 - и AT_2 -рецепторов и повышают активность NADPH-оксидазного комплекса. Однако, при этом по мере восстановления уровней ДА активность комплекса NADPH-оксидазы уменьшается. Замечено, что длительное лечение антагонистами AT_1 -рецепторов вызывает компенсаторные изменения в нигростриатной системе – уровни ДА возвращаются к исходным значениям.

Как уже было сказано ранее, рецепторы нейрого르몬ов (АТII, III, IV, (AT1–7) и (AT1–9)) [32–34] и ДА [35, 36] преимущественно локализируются в нейронах SN, микроглии и астроцитах. Можно полагать, что снижение активности дофаминергических нейронов (на начальных стадиях нейродегенеративных процессов) в клетках SN и нейроглии вызывает компенсаторное повышение вазоактивных медиаторов PAC в тканях головного мозга. Достоверно установлено, что активация мозговой PAC запускает воспалительные процессы, активируя микроглиальные клетки, высвобождая АФК, что в свою очередь приводит к нейродегенерации дофаминергических нейронов. Стоит отметить, что дополнительно клетки SN способны подвергаться микролизу посредством активации NADPH-оксидазного комплекса микроглии (рис. 2).

Нейродегенеративные процессы. Авторы полагают, что в основе ранних процессов нейродегенерации лежит активация окислительного стресса и нейровоспалительные процессы (в том числе микроглиальной NADPH-оксидазы), что приводит к гибели дофаминергических нейронов SN. Совокупность этих процессов наряду с экзо- и/или эндогенными факторами усугубляют прогрессирование БП [37–39]. Замечено, что АТII способен усиливать дофаминергическую дегенерацию нейронов SN через различные механизмы (рис. 2). Источником формирования АФК служит NADPH-оксидаза. В качестве активатора выступает АТII, который взаимодействует с AT_1 -рецепторами, расположенными в цитоплазматической мембране микроглии. При этом, АФК выступают в роли вторичных посредников, запуская процессы воспаления и привлекая иммунные клетки в патологический очаг. Основными источниками АФК являются нейроны SN (NADPH-оксидаза в митохондриях), микроглиальные клетки, а так же раз-

личные нейротоксины [40–45]. Более того, АТII так же способен действовать на микроглиальные клетки, активируя NADPH-оксидазный комплекс, в результате чего повышаются концентрации АФК. В свою очередь, АФК высвобождаются во внеклеточное пространство и тем самым, оказывают отрицательное модулирующее действие на нейроны головного мозга. При этом, активация микроглиальной NADPH-оксидазы приводит к низким уровням АФК. АФК выступают в роли вторичных посредников в клеточных сигналах микроглии, участвуют в процессах воспаления [41, 42].

Как уже было сказано ранее, АТII увеличивает нейротоксические эффекты, вызванные низкими концентрациями дофамина. Однако, применение ингибиторов АПФ и антагонистов AT_1 -рецепторов позволило значительно снизить нейродегенерацию нейронов SN, так же перекисное образование липидов (ПОЛ) и активность микроглии [46–53]. Замечено, что процесс нейродегенерации так же снижался при ингибировании NADPH-оксидазы. Более того, исследования показали, что ряд клеточных механизмов реализуются через активацию пероксисом – пролифератор активирующий рецептор (PPAR- γ) и ингибирование микроглиального RhoA/Rho-киназного пути посредством АТII. Нейропротективные эффекты мозговой PAC обусловлены стимуляцией AT_2 -рецепторов, активация которых усиливает репаративные возможности аксонов головного мозга [52]. Необходимы дополнительные исследования, что бы установить, каким образом мозговая PAC приводит к гибели нейронов SN. Понимание этих процессов позволит разработать новые способы терапевтического воздействия на определенные мишени при лечении БП.

Клинические исследования. Несмотря на значительное количество экспериментальных данных, подтверждающих роль мозговой PAC в развитии нейродегенеративных процессов при болезни Паркинсона [54, 55] данных клинических исследований все еще недостаточно. Замечено, что ингибитор АПФ – периндоприл оказывает выраженное положительное модулирующее действие у пациентов с БП [56]. Отмечено, что рамиприл ослабляет клинические симптомы паркинсонизма. Однако, в двух случаях при использовании каптоприла наблюдались клинические симптомы характерные для каптоприл-индуцированного паркинсонизма [57]. В других исследованиях применялись антагонисты AT_1 -рецепторов (лозартан) в результате чего клинические проявления паркинсонизма значительно снижались. Однако число пациентов, получавших антагонисты AT_1 -рецепторов, составляло малое количество для значимого анализа. Кроме того, широкий

диапазон доз антагонистов AT_1 -рецепторов, которые назначались пациентам, затрудняет обобщение и сравнение полученных результатов. В ряде контролируемых клинических исследований различных гипотензивных препаратов изучался риск возникновения БП [58]. Однако количество больных, получавших антагонисты AT_1 -рецепторов, было недостаточным, чтобы сделать выводы. Кроме того, сомнение вызывает и методология некоторых клинических исследований. В частности, в одном из протоколов авторы регистрировали как связанное с применением гипотензивного препарата появление симптомов БП на протяжении 90 дней с момента последнего его употребления, а не в период непосредственного использования препарата [59]. Большинство исследователей сходится во мнении, что целесообразна организация хорошо проду-

манного и соответствующего современным требованиям клинического исследования препаратов, воздействующих на РАС.

Заключение

Изначально наше представление о РАС ограничивалось ее ролью в регуляции АД и водно – солевого (натрия и воды) баланса. Исследования последних лет показали, что помимо системной РАС, во многих органах присутствует и локальная РАС. Наличие локальной или мозговой РАС в нигростриатной системе, показало ее участие в регуляции уровней дофамина, васкуляризации и процессов нейровоспаления. Результаты модельных экспериментов на животных показали, что «дофаминергическая» гибель нейронов SN, вызванная экзогенными и/или эндогенными факторами, приво-

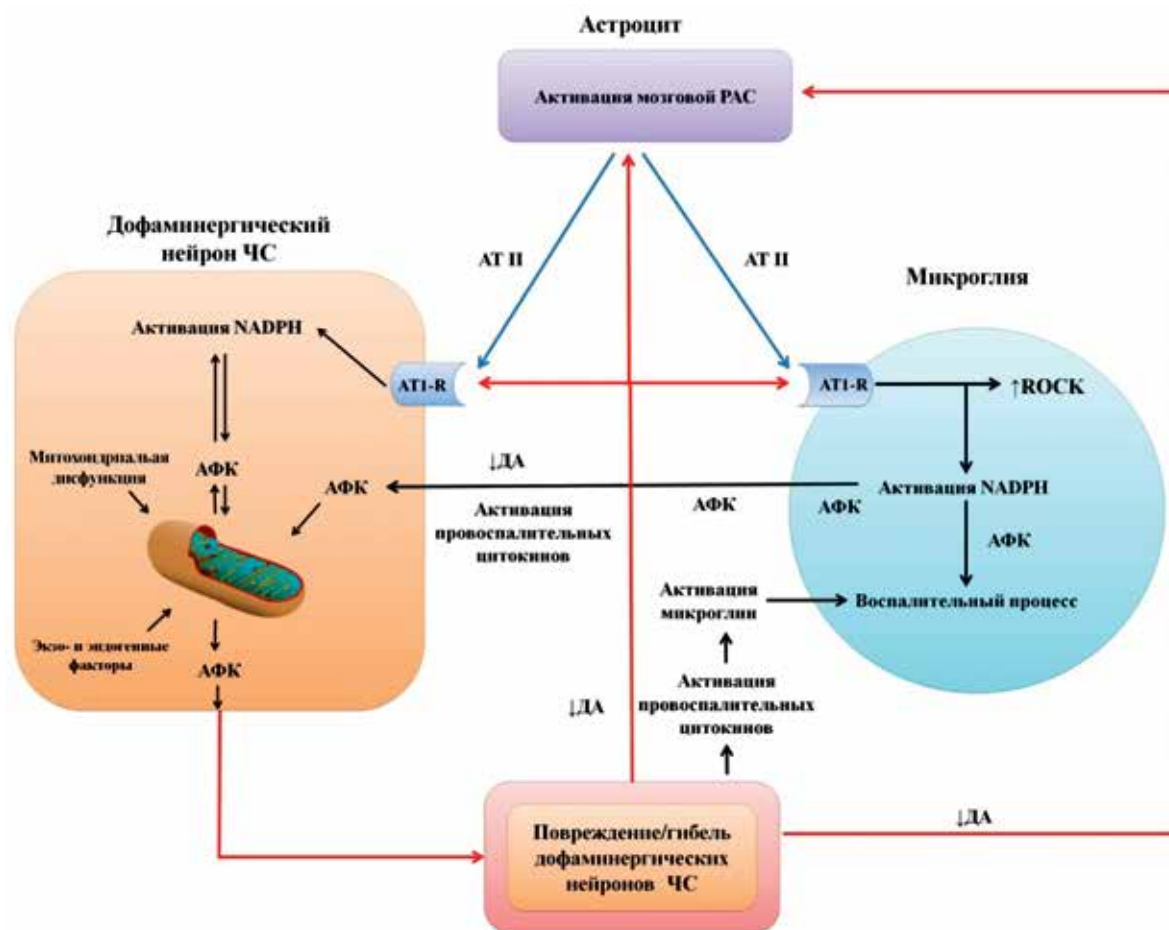


Рис. 2. Схематическое изображение влияния ренин-ангиотензивной системы мозга (РАС) на дофаминергическую гибель нейронов черной субстанции (ЧС).

АФК – активные формы кислорода, ДА – дофамин, АТ II – ангиотензин II, ЧС – черная субстанция, Rho- ассоциированная киназа, NADP – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, AT_1 -R – рецептор AT_1 .

дит к гиперактивации локальной ренин-ангиотензивной системы. Более того, компенсаторное повышение АП II усугубляет процесс нейродегенерации. Особенностью данного звена патогенеза является то, что он может быть мишенью терапевтического воздействия. Применение блокаторов ангиотензиновых рецепторов и ингибиторов АПФ на доклинических испытаниях позволило значительно уменьшить прогрессирование нейродегенеративных процессов. Необходимо установить, действительно ли нейропротективные эффекты ангиогипертензивных препаратов обусловлены активацией АТ₂- и Mas-рецепторов.

Литература

(п.п. 2-5; 9-23; 25-40; 42-59 см. References)

1. Чипизубов В.А., Шпрах В.В., Петров С.И. Использование основанных на результатах МРТ-исследования индексов атрофических изменений вещества головного мозга при выборе тактики лечения болезни Паркинсона. *Забайкальский медицинский вестник*. 2017; (2): 57–62.
6. Левин О.С., Федорова Н.В. *Болезнь Паркинсона*. М.; 2006.
7. Быков Ю.Н., Бендер Т.В. Медикаментозные методы лечения пациентов с болезнью Паркинсона (обзор литературы). *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2016; 1(3): 65–71.
8. Калягин А.Н. Применение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента и антагонистов АТ1-рецепторов ангиотензина. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2007; 73(6): 98–103.
24. Горяйнов С.А., Процкий С.В., Охотин В.Е., Павлова Г.В., Ревин А.В., Потапов А.А. О роли астроглии в головном мозге в норме и патологии. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2013; 7(1): 45–51.
41. Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Бочарова О. Функциональные грани дофаминергической системы и рак (часть 1). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(3): 116–26.

References

1. Chipizubov V.A., Shprah V.V., Petrov S.I. The use of MRI-based indices of atrophic changes in the brain substance in the selection of treatment tactics for Parkinson's disease. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2017; (2): 57–62. (in Russian)
2. Arnold A.C., Okamoto L.E., Gamboa A., et al. Mineralocorticoid Receptor Activation Contributes to the Supine Hypertension of Autonomic Failure. *Hypertension*. 2016; 67: 424–9.
3. Labandeira-García J.L., Garrido-Gil P., Rodríguez-Pallares J., Valenzuela R., Borrajo A., Rodríguez-Perez A.I. Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat*. 2014; 8: 8:67.
4. Perez-Lloret S., Sampaio C., Rascol O. Disease-modifying strategies in Parkinson's Disease. In: Jankovic J., Tolosa E., editors. *Parkinson's Disease and Movement Disorders*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer; 2015.
5. Kalia L.V., Lang A.E. Parkinson disease in 2015: Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. *Nat Rev Neurol*. 2016; 12: 65–6.

6. Levin O.S., Fedorova N.V. *Parkinson's Disease. [Bolezn' Parkinsona]*. Moscow; 2006. (in Russian)
7. Bykov Yu.N., Bender T.V. Medicinal methods of treatment of patients with Parkinson's disease (literature review). *Bulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2016; 1 (3): 65–71. (in Russian)
8. Kalyagin A.N. Use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin AT1 receptor antagonists. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2007; 73 (6): 98–103. (in Russian)
9. Honig, L.S., Boyd, C.D., Treatment of Alzheimer's disease: current management and experimental therapeutics. *Curr. Transl. Geniatr. Exp. Gerontol. Rep*. 2013; 2: 174–181.
10. Farag E., Sessler D.I., Ebrahim Z., Kurz A., Morgan J., Ahuja S., Maheshwari K., John Doyle D. The renin angiotensin system and the brain: New developments. *J Clin Neurosci*. 2017; 46: 1–8.
11. O'Connor A.T., Clark M.A. Astrocytes and the Renin Angiotensin System: Relevance in Disease Pathogenesis. *Neurochem Res*. 2018; 43(7): 1297–307.
12. Marc Y., Llorens-Cortes C. The role of the brain renin-angiotensin system in hypertension: implications for new treatment. *Prog Neurobiol*. 2011; 95 (2): 89–103.
13. Bodiga V.L.; Bodiga S. Renin angiotensin system in cognitive function and dementia. *Asian J. Neurosci*. 2013; 102602.
14. Gironacci M.M., Vicario A., Cerezo G., Silva M.G. The depressor axis of the renin-angiotensin system and brain disorders: a translational approach. *Clinical Science*. 2018; 132: 1021–38.
15. Karamyan V.T., Arsenault J., Escher E., et al. Preliminary biochemical characterization of the novel, non-AT1, non-AT2 angiotensin binding site from the rat brain. *Endocrine*. 2010; 37: 442–8.
16. Tetzner A., Gebolys K., Meinert C., Klein S., Uhlich, A., Trebicka J., et al. G-protein-coupled receptor MrgD is a receptor for angiotensin-(1–7) involving adenylyl cyclase, cAMP, and phosphokinase A. *Hypertension* 2016; 68, 185–94.
17. Costa-Besada M.A., Valenzuela R., Garrido-Gil P., Villar-Cheda B., Parga J.A., Lanciego J.L., et al. Paracrine and intracrine angiotensin 1–7/Mas receptor axis in the substantia nigra of rodents, monkeys, and humans. *Mol Neurobiol*. 2018; 55 (7): 5847–67.
18. Royea J., Zhang L., Tong X.K., Hamel E. Angiotensin IV receptors mediate the cognitive and cerebrovascular benefits of losartan in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci*. 2017; 37: 5562–73.
19. Zawada W.M., Mrak R.E., Biedermann J., Palmer Q.D., Gentleman S.M., Aboud O., et al. Loss of angiotensin II receptor expression in dopamine neurons in Parkinson's disease correlates with pathological progression and is accompanied by increases in Nox4- and 8-OH guanosine-related nucleic acid oxidation and caspase-3 activation. *Acta Neuropathol. Commun*. 2015; 3: 9.
20. Valenzuela R., Costa-Besada M.A.; Iglesias-Gonzalez J., Perez-Costas, E., Villar-Cheda B., Garrido-Gil P., et al. Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell Death Dis*. 2016; 7: e2427.
21. Villar-Cheda B., Costa-Besada M.A., Valenzuela R., Perez-Costas E., Melendez-Ferro M., Labandeira-García J.L. The intracellular angiotensin system buffers deleterious effects of the extracellular paracrine system. *Cell Death Dis*. 2017; 8: e3044.
22. Mertens B., Vanderheyden P., Michotte Y., Sarre S. The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2010; 11 (1): 49–56.

23. John W. Wright., Leen H. Kavas and Joseph W. Harding. A role for the brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 25. 4: 158.
24. Gorjajnov S.A., Prockij S.V., Ohotin V.E., Pavlova G.V., Revishhin A.V., Potapov A.A. On the role of astroglia in the brain in norm and pathology. *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy neurologii*. 2013; 7 (1): 45–51. (in Russian)
25. Arroja M.M., Reid E., McCabe C. Therapeutic potential of the renin-angiotensin system in ischaemic stroke. *Exp. Transl. Stroke Med*. 2016; 8: 8.
26. Labandeira-Garcia J.L., Rodríguez-Perez A.I., Garrido-Gil P., Rodríguez-Pallares J., Lanciego J.L., Guerra M.J. Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*. 2017; 3; 9: 129.
27. Garrido-Gil P., Valenzuela, R., Villar-Cheda B., Lanciego J.L., Labandeira-Garcia J.L. Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: An intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Struct. Funct*. 2013; 218: 373–88.
28. Gildea J.J. Dopamine and angiotensin as renal counterregulatory systems controlling sodium balance. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009; 18: 28–32.
29. Zeng C., Liu Y., Wang Z, et al. Activation of D3 dopamine receptor decreases angiotensin II type 1 receptor expression in rat renal proximal tubule cells. *Circ Res*. 2006; 99: 494–500.
30. Villar-Cheda B., Rodríguez-Pallares J., Muñoz A., et al. Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: implications for progression of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2010; 32: 1695–706.
31. Rodríguez-Pallares J., Rey P., Parga J.A., Muñoz A., Guerra MJ, ~ Labandeira-Garcia J.L. Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol Dis*. 2008; 31: 58–73.
32. Joglar B., Rodríguez-Pallares J., Rodríguez-Perez A.I., Rey P., Guerra M.J., Labandeira-Garcia J.L. The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. *J Neurochem*. 2009; 109: 656–69. 42.
33. Garrido-Gil P., Valenzuela R., Villar-Cheda B., Lanciego J.L., Labandeira-Garcia J.L. Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Struct Funct*. 2013; 218: 373–88.
34. Rodríguez-Pallares J., Quiroz C.R., Parga J.A., Guerra M.J., Labandeira-Garcia J.L. Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci*. 2004; 20: 1489–98.
35. Miyazaki I., Asanuma M., Diaz-Corrales F.J., Miyoshi K., Ogawa N. Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain Res*. 2004; 1029: 120–3.
36. Farber K., Pannasch U., Kettenmann H. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci*. 2005; 29: 128–38.
37. Joglar B., Rodríguez-Pallares J., Rodríguez-Perez A.I., Rey P., Guerra M.J., Labandeira-Garcia J.L. The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. *J Neurochem*. 2009; 109: 656–69.
38. Gao H.M., Liu B., Zhang W., Hong J.S. Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J*. 2003; 17: 1954–6. 61.
39. Wu D., Teisman P., Tieu K., et al. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 6145–50.
40. Doughan A.K., Harrison D.G., Dikalov S.I. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res*. 2008; 102: 488–96. 63.
41. Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Bocharova O. Functional facets of the dopaminergic system and cancer (part 1). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(3): 116–26. (in Russian)
42. Wosniak J. Jr., Santos C.X., Kowaltowski A.J., Laurindo F.R. Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: effects of mild mitochondrial dysfunction on angiotensin II-mediated increase in Nox isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11: 1265–78.
43. Zawada W.M., Banninger G.P., Thornton J., et al. Generation of reactive oxygen species in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP1) treated dopaminergic neurons occurs as an NADPH oxidase-dependent two-wave cascade. *J Neuroinflammation*. 2011; 8: 129. 65.
44. Rodríguez-Pallares J., Parga J.A., Joglar B., Guerra M.J., Labandeira-Garcia J.L. The mitochondrial ATP-sensitive potassium channel blocker 5-hydroxydecanoate inhibits toxicity of 6-hydroxydopamine on dopaminergic neurons. *Neurotox Res*. 2009; 15: 82–95.
45. Rodríguez-Pallares J., Parga J.A., Joglar B., Guerra M.J., Labandeira-Garcia J.L. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels enhance angiotensin-induced oxidative damage and dopaminergic neuron degeneration. Relevance for aging-associated susceptibility to Parkinson's disease. *Age (Dordr)*. 2012; 34: 863–80.
46. Qin L., Liu Y., Wang T., et al. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J Biol Chem*. 2004; 279: 1415–21.
47. Lopez-Real A., Rey P., Soto-Otero R., Mendez-Alvarez E., Labandeira-Garcia J.L. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce oxidative stress and protect dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of parkinsonism. *J Neurosci Res*. 2005; 81: 865–73.
48. Muñoz A., Rey P., Guerra M.J., Mendez-Alvarez E., Soto-Otero R., Labandeira-Garcia J.L. Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. *Neuropharmacology*. 2006; 51: 112–20.
49. Lu J., Wu L., Jiang T., et al. Angiotensin AT2 receptor stimulation inhibits activation of NADPH oxidase and ameliorates oxidative stress in rotenone model of Parkinson's disease in CATH.a cells. *Neurotoxicol Teratol*. 2015; 47: 16–24.
50. Gironacci M.M., Cerniello F.M., Longo Carbajosa N.A., Goldstein J., Cerrato B.D. Protective axis of the renin-angiotensin system in the brain. *Clinical Science*. 2014. 127, 295–306.
51. Wu L., Tian Y.Y., Shi J.P., et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress is involved in the neuroprotective effects of candesartan cilexetil in the rotenone rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2013; 548: 50–5.
52. Garrido-Gil P., Joglar B., Rodríguez-Perez A.I., Guerra M.J., Labandeira-Garcia J.L. Involvement of PPAR-gin the neuroprotective and anti-inflammatory effects of angiotensin type 1 receptor inhibition: effects of the receptor antagonist telmisartan and receptor deletion in a mouse MPTP model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 38.
53. Villar-Cheda B., Dominguez-Mejide A., Joglar B., Rodríguez-Perez A.I., Guerra M.J., Labandeira-Garcia J.L. Involvement of mi-

- croglial RhoA/Rho-Kinase pathway activation in the dopaminergic neuron death. Role of angiotensin via angiotensin type 1 receptors. *Neurobiol Dis.* 2012; 47: 268–79.
54. Zawada W.M., Banninger G.P., Thornton J., et al. Generation of reactive oxygen species in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP1) treated dopaminergic neurons occurs as an NADPH oxidasedependent two-wave cascade. *J Neuroinflammation.* 2011; 8: 129.
55. Grammatopoulos T.N., Jones S.M., Ahmadi F.A., et al. Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Mol Neurodegener.* 2007; 2: 1.
56. Juan M. Saavedra. Angiotensin II AT1 receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. 2012. *Clin Sci (Lond).* 2012; 123 (10): 567–90.
57. Reardon K.A., Mendelsohn F.A., Chai S.Y., Horne M.K. The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, perindopril, modifies the clinical features of Parkinson's disease. *Aust N Z Med.* 2000; 30: 48–53.
58. Chang Y.P., Shih P.Y. A case of Parkinson's disease worsened by captopril: an unexpected adverse effect. *Mov Disord.* 2009; 24: 790.
59. Ascherio A., Tanner C.M. Use of antihypertensives and the risk of Parkinson's disease. *Neurology.* 2009; 72: 578–9.

Сведения об авторах:

Быков Юрий Николаевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нервных болезней Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: bykov1971@mail.ru;

Тетюшкин Николай Андреевич, студент 4 курса лечебного факультета Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: tetuyshkin.neuro@gmail.com;

Чипизубов Василий Александрович, аспирант каф. неврологии и нейрохирургии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования – филиала ФГБОУ РМАНПО Минздрава России, врач-нейрохирург отделения нейрохирургии ГБУЗ «Иркутская ордена «Знак почёта» областная клиническая больница», e-mail: chipizubov.neuro@gmail.com;

Калягин Алексей Николаевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. пропедевтики внутренних болезней Иркутского государственного медицинского университета;

Лаврик Сергей Юрьевич, доктор мед. наук, доцент каф. неврологии и нейрохирургии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования – филиала ФГБОУ РМАНПО Минздрава России, e-mail: lavrick@irk.ru

© Пальцын А.А., 2021

УДК 616-092

Пальцын А.А.

Ресвератрол

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования», 123995, Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1

Ресвератрол (Resveratrol) – природный плохо растворимый полифенол. Синтезируется многими растениями, название получил по растению, из которого был впервые выделен: *Veratrum grandiflorum*. Считается, что Ресвератрол в растениях выполняет функцию защиты от бактерий, грибов, ультрафиолета. Очень популярный и спорный объект медицинских исследований и публикаций. «Подозревается» во многих профилактических и лечебных действиях. Каждый год последнего десятилетия о **Р** появляется более тысячи сообщений, нередко с противоречащими результатами. Данный обзор – попытка выбрать для читателя по возможности достоверную и медицински значимую информацию.

Ключевые слова: ресвератрол, полифенолы, лекарственные растения, биоактивность, биодоступность, гормезис, терапевтические мишени, неинвазивные пандемии, оксидативный стресс, антиоксиданты, антивозрастное действие

Для цитирования: Пальцын А.А. Ресвератрол. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(1): 116-123.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.116-123

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие конфликта интересов.

Поступила 26.05.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Paltsyn A.A.

Resveratrol

Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Moscow 125315, Russian Federation.
Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 123995, Russian Federation

Resveratrol is a natural, poorly soluble polyphenol. Resveratrol is synthesized by many plants and was named after the plant, from which it was originally isolated, *Veratrum grandiflorum*. Resveratrol is considered protective against bacteria, fungi, and ultraviolet. It is a very popular and disputable subject of medical studies and publications. It is «suspected» in many preventive and curative actions. Each year over the past decade, more than a thousand reports of resveratrol have been published, often with conflicting results. This review is an attempt to choose for the reader, to the extent possible, reliable and medically relevant information.

Keywords: resveratrol, polyphenols, medicinal herbs, bioactivity, bioavailability, hormesis, therapeutic targets, noninvasive pandemic, oxidative stress, antioxidants

For citation: Paltsyn A.A. Resveratrol. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 116-123. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.116-123

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 26.05.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Ресвератрол (**Р**) – природный плохо растворимый полифенол. Синтезируется многими растениями. На-

звание получил по растению, из которого был впервые выделен: *Veratrum grandiflorum*. Считается, что в растениях он выполняет функцию защиты от бактерий, гри-

бов, ультрафиолета. Очень популярный и спорный объект медицинских исследований и публикаций. «Позревает» во многих профилактических и лечебных действиях. Каждый год последнего десятилетия о **P** появляется более тысячи сообщений, нередко с противоречивыми результатами. Этот обзор – попытка выбрать для читателя по возможности достоверную и медицински значимую информацию.

P содержится в коже и косточках винограда, чае, во многих других ягодах и фруктах: яблоках, малине, чернике, сливе, орехах, арахисе. Содержание **P** повышается в лекарственных и съедобных растениях, находящихся в состоянии стресса. **P** может быть выделен из этих биологических источников и очищен или синтезирован в несколько этапов с высоким выходом. Для производства аптечных капсул часто используют в качестве источника **P** Рейнутрию японскую (*Reynoutria japonica*).

Два предыдущих абзаца объясняют особое положение **P** среди лекарств. Человек лечился им ещё до «изобретения» медицины, т.е. в те далёкие времена, когда выбирал лекарства не сознанием, а вкусом (языком). В размышлениях о медицинской роли **P** полезно учитывать многотысячелетний опыт его пищевого использования.

С «высоты» современных знаний о **P** его практическое использование в ряде национальных кулинарных культур и традиций вполне разумно. Более того, большое число современных экспериментальных и клинических исследований лишь объясняют, уточняют в принципе известные положения – насыщают теорией по большей части не изменившуюся в своей сути практику.

Медицинская и кулинарная позиции **P** конечно связаны не только со свойствами вещества, но и с историей его познания и использования человеком. Научные исследования убеждают в полезности дальнейшего развития этой связи. Допускаю, что результаты развития окажутся ценнее для медицины, чем для кулинарии, у которой опыт общения с **P** тысячекратно больше и, соответственно, меньше «белых пятен».

Медицински-интересных эффектов действия **P** несколько. Все они осуществляются по схеме гормезиса, т.е. при контакте производят незначительное повреждение, включающее значительную восстановительную реакцию организма. Иными словами – **P** чуть-чуть ядовит. Защитная реакция на контакт с ним (самолечебный эффект организма) часто существенно превышает по величине-силе вызвавший её стимул и, следовательно, позволяют организму в дальнейшем компенсировать действие фактора более ядовитого, разрушительного, вредного, чем тот, который включил гормезисную реакцию.

Есть сообщения, что по такой схеме осуществляется лечебное действие **P** при вызванных оксидативным стрессом склеротических изменениях в клетках сосудистой стенки. Стресс повышает образование реактивных форм кислорода (ROS) мембрано-связанным ферментным комплексом NADPH oxidase (никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидаза). **P** (в адекватной дозе) ингибирует продукцию ROS этим комплексом, уменьшает воспаление, оказывает кардиопротективное действие [1, 2].

ROS некогда считали однозначно вредными виновниками разрушительного оксидативного стресса. Позже стали различать в оксидативном стрессе, в зависимости от концентрации ROS эустресс и дистресс. Эустресс – низкий уровень содержания ROS, действует как редокс-сигнал, необходимый для нормальной, физиологической функции клеток. Противоположный ему – дистресс развивается при избыточном накоплении ROS и означает утрату специфической, сигнальной функции. Происходит классический переход количества в качество, специфический регулятор (мессенджер) при увеличении его содержания становится неспецифическим разрушителем [3]

Наиболее обсуждаемое явление в медицинской истории **P** – Французский парадокс. Идея приобрела особую популярность в общественном сознании после рекламного интервью, директора французского института вина, профессора Сержа Рено в ноябре 1991 г. американскому телеканалу CBS. Факты, сообщенные им, были точными: французские мужчины, потребляют значительно больше насыщенных жиров, чем американские мужчины, но в среднем более стройные и умирают от болезней сердца и опухолей заметно реже американцев. Рено объяснил этот парадокс присутствием **P** и других полифенолов в регулярно потребляемом французами красном вине. Поздние исследования нашли и другие, влияющие на результат факторы. Например: французы не всегда, но часто «наслаждаются едой», а американцы не всегда, но часто «вводят в организм необходимые для поддержания жизни макро- и микромолекулы». Однако и сегодня французский парадокс с красным вином на флаге не опровергнут. Более того, он так популярен и велик, что скрыл в своей тени «американский парадокс». В литературе такого понятия нет, только потому, что США привыкли и навязали миру привычку «считать соринки в чужом глазу». А суть американского парадокса в том, что при максимальных сравнительно с другими странами тратах на здоровье, у них максимально распространены современные неинфекционные пандемии: метаболический синдром, диабет, рак, сердечно-сосудистые, и нейро-дегенеративные заболевания.

Молекула **P**, состоящая из двух фенольных колец (полифенол) с тремя гидроксильными группами, приспособлена природой для удаления свободных радикалов и связывания металлов. Такая структура молекулы обуславливает её антиоксидантное действие. Накопление при нагрузках конечных продуктов гликирования (КПГ) предрасполагает к хроническому оксидативному стрессу с его разрушительными последствиями. В недавнем обзоре двадцати девяти исследований, заслуживающих доверия по методике и техническому уровню, было показано торможение **P** продукции КПГ или продукции рецепторов к ним и соответственно снижение разрушительного действия оксидативного стресса, воспаления, атеросклероза, инсулин устойчивости [4]. По выводу авторов обзора, **P** существенно снижает концентрацию КПГ, предотвращает обусловленные ими осложнения. Влияние **P** осуществлялось по мнению авторов всех оригинальных работ и авторов обзора через ядерный фактор NF- κ B - фактор транскрипции, контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Значительно раньше было показано, что **P**, как и другие сиртуин-активирующие вещества, увеличивает продолжительность жизни нематод и насекомых [5].

Антиоксидантное и антивозрастное биологическое действие **P** похоже на такое же действие caloric restriction (умеренного питания) – главный путь осуществления через белок SIRT1 (NAD-зависимая деацетилаза) – нейропротективный и продляющий жизнь. Авторы исследовали действие **P** на гетерозиготных и трансгенных по болезни Альцгеймера мышей. Животные получали корм с добавлением 100 мг/кг **P** с 2 мес в течение 10 мес. Введение **P** индуцировало полную защиту от потери памяти и патологии мозга у трансгенных мышей и улучшало когнитивную функцию у гетерозиготных мышей. **P** повышал любопытство и уменьшал беспокойство в обеих линиях животных – свидетельствовал о хорошем самочувствии. **P** уменьшал содержание бета-амилоида (A β) и тау-белка в гиппокампе трансгенных животных. Анализом протеостаза установили в обеих сравниваемых группах: увеличение содержания разрушающего амилоид фермента – неприлизина, уменьшение содержания амилоидогенной секретазы, увеличение протеосомной активности. В обеих группах благотворное действие **P** выражалось также повышением как при физической нагрузке уровня АМФК, повышением подавляющего апоптоз фактора SIRT1, активацией PGC-1 α . Работа, на мой взгляд, убеждает в повышении **P** устойчивости организма и защите его от нейродегенерации, накопления aberrантных белков. А для нормальных гетерози-

готных животных прием **P** просто способствует хорошему здоровью. Однако, обращаю внимание читателя на высокую дозу **P** – 100 мг/кг.

Есть данные о благоприятном действии **P** в меньшей концентрации [6]. Авторы исследовали, может ли снижение **P** концентрации ROS в мозге крыс повлиять на когнитивные нарушения при экспериментальной ранней болезни Альцгеймера, вызванной ангиотензином II. Самцы с вызванной ангиотензином II моделью болезни Альцгеймера, получали в течение 2 нед популярное гипотензивное средство лозартан (10 мг/кг) или **P** (10мг/кг). В обеих сравниваемых группах снижалось кровяное давление, продукция ROS, увеличивалось содержание BDNF в гиппокампе, улучшалась гиппокамп-зависимая память. Авторы подчеркивают, что **P**, воспроизводя все положительные эффекты лозартана, действует всё же несколько слабее.

Привожу результаты педантично организованного и проведенного немецкими врачами исследования действия **P** на когнитивные и физические способности пожилых людей [7]. Двадцать три (9 женщин) здоровых участника с избыточным весом (BMI, 25–30 кг/м², возраст 50–75 лет) получали в течение 26 нед **P** (в 4 капсулах, по 2 на прием с суммарным количеством **P** 200 мг/сут). В контроле всё так же, только вместо **P** – плацебо, внешне не отличимое от **P**. При анализе результатов субъект и исследователь не знали из какой группы анализируемый человек. Статистически значимые отличия результатов в группе **P** сравнительно с плацебо были следующими. Улучшение настроения. Улучшение памяти в финале исследования в сравнении с исходной и в сравнении с финальной в группе плацебо ($p < 0.05$). По данным функциональной магнитно-резонансной томографии существенно увеличилась функциональная коннективность гиппокампа. Резко снизилось содержание гликированного гемоглобина и повысилось содержание лептина в группе **P**. Не обнаружено значимых различий опыта и контроля по содержанию глюкозы, инсулина, липидному профилю, маркерам воспаления, BDNF, IGF-1. Уменьшилось содержание жира ($1.2 \pm 3\%$ SD), а в группе плацебо увеличилось ($0.9 \pm 3\%$ SD), различие статистически значимо ($p = 0.033$) Снизилось сравнительно с плацебо систолическое и диастолическое давление.

P оказался эффективным антиоксидантным препаратом в эксперименте, модулирующим частое сегодня заболевание – жировое перерождение печени. Авторы исследовали лечебное действие **P** при оксидативном стрессе, воспалении и нарушении липидного метаболизма, созданных высокожировой диетой. Самцов C57BL/6 содержали на высоко жировой диете в те-

чение 8 нед. В результате сформировался отчетливо выраженный стеатоз (жировая инфильтрация) печени. Затем мыши получали *reg/os* в течение 4 нед **P** в дозе 100мг/кг. У животных нормализовались: общий сывороточный холестерин, липопротеины высокой плотности, концентрация глюкозы, инсулина, аланина, аспартат аминотрансферазы, аминотрансферазы, существенно нормализовалась структура печени. Авторы объясняют положительные изменения терапевтическим действием **P**, снижением оксидативного стресса, воспаления, поглощения жирных кислот. [8]. Обращаю внимание читателя на высокую дозу **P**.

При диабете 2-го типа гипергликемический стресс сочетается с оксидативным и результатом такого взаимодействия закономерно становятся сосудистые осложнения. Увеличивается содержание ROS. Если они не удаляются антиоксидантными ферментами (супероксиддисмутазами), развивается оксидативный стресс – ROS разрушают макромолекулы [9]. Оксидативный стресс – ведущий патогенный фактор многих возрастных болезней: диабета, рака, хронической почечной недостаточности, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных болезней [10]. Есть публикации сообщающие об эффективности применения в этих условиях **P** [11].

Анализ литературы по **P** демонстрирует существенные различия в категоричности выводов между экспериментальными и клиническими данными. В отличие от определенности нескольких, приведенных выше и множества других экспериментальных результатов, клинические наблюдения итожатся преимущественно сослагательным наклонением. Так метаанализ влияния **P** на когнитивные способности и настроение 329 взрослых людей [12] не позволил вывести категорического заключения, а констатировал лишь, что прием препарата «может улучшить отдельные показатели когнитивной деятельности». Итогом первой международной конференции по **P** в Дании в 2010 г. было заявление рабочей группы, что рассмотренные ею данные «не достаточно убедительные, чтобы рекомендовать введение **P** людям в дозах, превышающих его содержание в пищевых продуктах» [13]. Были и другие публикации с неопределенно-пессимистическими мнениями о **P**.

В 2016 г. Sabine Weiskirchen и Ralf Weiskirchen опубликовали статью с вызывающим названием: «Сколько вина нужно пить, чтобы быть здоровым» [14]. Статья вполне профессиональная. Со знанием обсуждаемого материала. Но, на мой взгляд, с зауженной зоной рассмотрения этого материала. Авторы определили терапевтическую дозу **P** – 1г/сут. Цифра скромная, не

избыточная. Основываясь на содержании **P** в различных пищевых продуктах они перечисляют сколько человек должен потребить того или иного продукта, чтобы получить эту дозу. Результат оказался явно не совместимый с реальностью. Примеры продуктов наиболее богатых **P**, которые пришлось бы проглотить для набора 1г **P**: красное вино – 505-2762л, кожица красных помидор -52,6 кг, красный виноград – 795 кг. Остальные продукты, традиционно считающиеся источником **P**, для получения 1 г/сут, должны поглощаться в ещё более неправдоподобных количествах.

Эта, по первому впечатлению, мощная мина, взорванная под **P**, не произвела, однако, ошутимого эффекта. Так, например, возрастающее число ежегодных публикаций по теме **P**, и после появления статьи продолжает устойчиво возрастать. Причин, на мой взгляд, две. Первая причина, уже ждала Weiskirchen'ов в информационном пространстве, поскольку была выражена в публикации, появившейся ровно за год до их статьи [15]. Публикация большая по объему работы, текста и числу авторов – 26. Русский перевод названия «Меньше значит больше для химио профилактики рака: свидетельство нелинейного дозового ответа для защитных эффектов ресвератрола у людей и мышей». Авторы, почему-то не используя слово гормезис, приводят ещё одно доказательство, конечно давно известного факта, что **P** (подобно огромному числу других влияний) действует по принципу гормезиса. Они даже указывают признак гормезиса: кривая зависимости доза-эффект имеет колоколообразную форму. Авторы представили доказательства, что доза **P**, 0,07мг/кг существенно тормозила рост аденом у животных и клеток колоректального рака человека в культуре. Доза 14 мг/кг слабее влияла на рост аденом *in vivo* и *in vitro*. Торможение роста мышечных и человеческих опухолей, осуществлялось через индукцию АМФК. Гормезисный принцип действия **P** снижает пафос статьи Weiskirchen'ов, поскольку свидетельствует, что как раз большие дозы неэффективны.

Думаю, что статья Sabine Weiskirchen и Ralf Weiskirchen, может быть неожиданно для авторов, не закрыла вопрос о **P**, не только по причине его гормезисного действия. В проблеме **P** есть ещё один важный момент. **P** – это не столько скорая помощь, сколько образ жизни. Его немалый профилактический и лечебный потенциал раскрывается во всей силе только при постоянном или, по крайней мере, весьма длительном применении. Этим словам есть фактические доказательства. Одно из них можно найти в ещё молодом, но очень перспективном направлении исследований, которое назову так: «**P** и кишечная микро-

биота». Об априори предполагаемой связи **P** с кишечной микробиотой пока ещё часто забывают [16], хотя уже достаточно сведений о её значении и праве на исследовательскую разработку. Так после 28 сут умеренного потребления красного вина в моче людей идентифицировали 21 продукт, связанный, по мнению авторов, с таким потреблением и часть этих продуктов аргументировано сочли производными микробиоты [17]. Концентрация **P**-производных увеличивалась к концу 28-дневного курса одинаково как у потребителей обычного красного вина, так и потребителей деалкоголизированного красного вина. Это указывает, что на биодоступность и биотрансформацию **P** алкоголь не влияет. Но, что существенно влияет на биодоступность, биотрансформацию, а ещё проще, на содержание **P** и что не было учтено Weiskirchen'ами – это участие кишечной микробиоты в разнообразных превращениях **P**. В частности, способность увеличить его концентрацию в кишечнике, сравнительно с концентрацией в пище, путем превращения микробиотой (пробиотиком) в **P** другого, содержащегося в винограде глюкозида – писеида [18].

В подкрепление идеи: «**P** – эффективен, как образ жизни» приведу ещё одно яркое свидетельство. В журнале Nature была опубликована статья 27 авторов доказавших, что даже у мышей среднего возраста и находящихся на высококалорийной диете можно приемом **P** улучшить здоровье и продлить срок жизни [19]. «Пожилых» (возраст 1 год) мышей C57BL/6 содержали либо на диете стандартной (ДС), либо на высококалорийной диете (КД – 60% такой же, как стандартная по общей калорийности диеты за счет жира). Такое кормление поддерживалось в течение всей оставшейся жизни животных. Каждая группа (ДС и КД) подразделялась на 2 подгруппы, различающиеся получаемой мышами дозой **P**: 5.2 ± 0.1 или 22.4 ± 0.4 мг. Авторы называют эти величины допустимыми суточными дозами для человека. Через 6 мес обнаружилась отчетливая тенденция увеличения продолжительности жизни и чувствительности к инсулину более выраженная для высокой дозы **P**. Мыши КД увеличивали массу приблизительно до возраста 75 нед, затем наступало медленное снижение. Примерно до этого же возраста (75 нед) прием **P** тормозил увеличение массы. На отдаленных сроках (18-24 мес) различие было незначительным. Кривая смертности животных КД разделялась около возраста 65 нед и в дальнейшем получавшие **P** жили в среднем месяца на 3 дольше. К сроку 114 нед умерли 58% мышей КД; 42% мышей КД+**P** и 42% мышей на стандартной диете. Иными словами, **P** продлил срок жизни животных на высококалорийной диете. Причем в конце жизни эти животные были

сильнее (дольше удерживались на вращающемся круге), чем мыши не получавшие **P**.

Высококалорийная диета у людей – многократно доказанный и проверенный путь ко многим патологическим изменениям, в частности: повышению концентрации в крови глюкозы, инсулина, нарушению липидного профиля крови [20], вероятности развития диабета, сердечно-сосудистой патологии, жировой дистрофии печени. В том же направлении развивались события и у мышей на КД: увеличение содержания глюкозы, инсулина, IGF-1. В группе КД+**P** эти показатели были ниже, как при ДС. У мышей КД группы к возрасту 18 мес резко увеличивалась печень сравнительно с ДС, в группе КД+**P** увеличение печени было незначительным. Резко выраженная жировая дистрофия печени в группе КД, в группе КД+**P** не наблюдалась. «Слепой» метод морфологической оценки (жировых включений, вакуолизации, отека, воспалительных, дегенеративных изменений по шкале от 0 до 4-максимум) дал следующие результаты: ДС – 1,6; КД – 3,2; КД+**P** – 1,2. Подсчет содержания митохондрий в срезах печени показал статистически значимое увеличение в КД+**P** сравнительно с КД; с группой ДС существенной разницы не обнаружили.

Этим исследованием была показана способность продолжительного приема **P** существенно ослабить и даже нейтрализовать распространеннейший самоубийственный порок современного человечества – переедание. Приведенный экспериментальный результат, по сути, полностью подтвердился клиническим исследованием [21]. В группах **P** и плацебо было по 23 человека (в каждой по 9 женщин) с избыточной массой тела, возраст 50-75 лет. **P** – 200 мг/сут или плацебо принимали в течение 26 нед. Сравнение результатов до и после применения курса **P** или плацебо показало следующие статистически значимые результаты: улучшение запоминания слов ($p = 0.038$), уменьшение содержания гликированного гемоглобина, жира, увеличение содержания лептина (для всех показателей $p < 0,05$), увеличение функциональной коннективности гиппокампа.

Антиоксидантное действие **P**, будучи универсальным защитным эффектом, предопределяет, наряду с ним, другие терапевтические мишени, механизмы действия, объекты влияния и корректируемые патологии. К предыдущему сюжету ближе всего метаболический синдром. «Модное» сегодня заболевание, распространенное почти на половину современных американцев старше 50 лет. Есть сообщения, что **P**, активируя SIRT1, действует подобно умеренному питанию, снижает все проявления метаболического синдрома: вес,

кровенное давление, содержание глюкозы, холестерина, липопротеинов в крови, регулируя клеточный энергетический гомеостаз и биогенез митохондрий [22]. Однако результаты недавнего масштабного мета-анализа достоверно подтвердили только один, но очень важный, положительный эффект **P** при метаболическом синдроме – снижение уровня холестерина [23]. Это совсем не плохой результат метаанализа, учитывая значимость уровня холестерина для метаболического синдрома и других патологий. А также тот факт, что в таких проверках воспроизводятся не более 10% результатов из первичных сообщений, опубликованных в самых уважаемых журналах [24].

Метаболический синдром предшественник, пособник и движитель диабета II типа, сердечно-сосудистых болезней, когнитивных расстройств. При экспериментальном диабете и в клинике **P** повышает чувствительность к инсулину, уменьшает морфологические изменения β -клеток, увеличивает секрецию инсулина, улучшает метаболические показатели больного, увеличивает экспрессию/активность АМФК и SIRT1 в тканях лиц с диабетом 2-го типа [25]. Жировая ткань – постоянный спутник метаболического синдрома и диабета продуцирует адипокины, способствующие воспалению и инсулин-резистентности [26]. **P** тормозит развитие воспаления, подавляет продукцию цитокинов и инфильтрацию макрофагами [27]. Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование 24 пациентов (12 – **P**; 12 – плацебо в той же форме) с диагнозом метаболический синдром показало, что **P** (по 500 мг в течение 3 и 90 сут) существенно снизил массу тела, жира, окружность талии, секрецию инсулина [28].

Важно подчеркнуть, что **P** – медаль с двумя медицински-значимыми сторонами: лечение и профилактика. Практически для всех современных неинфекционных пандемий нет особо действенных средств лечения. К исключениям можно отнести только физическую нагрузку. Если иметь в виду массовость действия, значительно более эффективны сегодня методы профилактики. В сфере профилактики **P** особо ценен. Во-первых: тысячелетиями и на миллиардах «испытываемых» проверенным опытом. Во-вторых: дешевой, сравнительно с другими средствами. В-третьих: обширным списком «целей». В-четвертых: сопутствующими применению положительными и, следовательно, усиливающими благоприятное действие средства, эмоциями.

Высокая биоактивность и соответственно быстрый метаболизм **P** ограничивают его лечебный потенциал. Для улучшения фармакокинетики в последнее время

предложено несколько приемов, направленных на повышение эффективности клинического использования **P**. В частности, связывание с наночастицами, липидными носителями и внутри липосом для повышения стабильности в пищеварительном тракте и пролонгированного высвобождения. [29, 30].

Всеобъемлющее значение антиоксидантных свойств **P**, как наиболее общей характеристики его действия не должно отвлекать внимание исследователей от частных: противовоспалительного, кардиопротективного, нейропротективного и противоопухолевого действия. В комплексе они обеспечивают геропротективный эффект [31]. Создается он способностью **P** увеличивать содержание таких факторов как АМПК, SIRT1, PGC-1 α , NF- κ B, антиоксидантные ферменты и регулировать такие процессы как апоптоз, ангиогенез, биогенез митохондрий, глюконеогенез, липидный метаболизм [32].

Благодаря перечисленным выше свойствам в настоящее время появились сообщения об успешном применении **P** при ряде «возрастных» патологических процессов: ожирении, метаболическом синдроме, диабете 2-го типа, сердечно-сосудистых заболеваниях, гипертонической болезни, инсульте, хронической болезни почек, воспалительных заболеваниях, деменции, раке молочной железы, колоректальном раке [33].

В теме клинического применения **P** сложным, противоречивым остается вопрос его биодоступности. Вещество мало растворимо и большая доля введенной *per os* дозы остается в печени [34]. Сегодня есть сообщения о существенном повышении антиоксидантной и противовоспалительной эффективности **P**, примененного в виде нагруженных им наночастиц [35].

Заканчиваю тему **P** в клинике одной из «проклятых» проблем медицины – болезнью Альцгеймера. Ее гуманитарная, медицинская, экономическая и, даже, политическая тяжесть, а также гнетущая, длительная неразрешимость известны. В обширной подборке по этой теме в интернете на сайте <https://www.alz.org/media/Documents/alzheimers-facts-and-figures-2019-r.pdf>, есть, в частности, такой факт, иллюстрирующий трудность задачи. Из 244 препаратов прошедших контроль Национального института здоровья (НИИ) за 10 лет (2002-2012) только один был допущен к использованию на пациентах с до сих пор неясным результатом. В самом свежем обзоре по теме **P** – в лечении болезней Альцгеймера и Паркинсона [36] отмечается выраженный лечебный эффект **P** при экспериментальной болезни Альцгеймера у грызунов. Однако в рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании пациентов с AD от легкой до умеренной степени тяжести, получавших очень низкую дозу **P** (5 мг/сут) или плаце-

бо в течение 1 года можно было наблюдать всего лишь *меньшее ухудшение* (измеряемое с помощью специальных шкал для оценки прогрессирования AD) у пациентов, получавших **P**, однако и эти скромные изменения не были статистически значимыми. В обзоре публикуются данные о попытках улучшить фармакокинетику **P** созданием его дериватов (имеют в виду гликозилирование, алкилирование, галогенирование, гидроксилирование, метилирование и пренилирование). Авторы полагают, что таким путем удастся получать препараты с повышенной биодоступностью и фармакологической активностью. Эти препараты действовали нейропротективно в экспериментальных моделях болезней Альцгеймера и Паркинсона. Однако, авторы подчеркивают необходимость для них дополнительных предклинических исследований механизмов действия и токсичности.

Значительные противоречия результатов и мнений о **P** в литературе естественны и не должны оборачиваться пренебрежением к веществу со стороны практической медицины. Главная причина противоречий гормональный принцип действия. Следовательно, при неудаче первый «подозреваемый» должен быть не препарат, а исследователь не сумевший определить и обеспечить создание адекватной дозы препарата. Чтение клинических отчетов часто не дает оснований для уверенного использования результатов в практике. Однако сравнительная безопасность вещества, то обстоятельство, что неудача испытания во многих случаях выражается всего лишь бесполезностью, а не вредом, и, конечно, факт многократно и во многих ситуациях доказанной его эффективности определяют высокую актуальность **P** для современной медицины. Сотни тысяч лет эволюции *Homo sapiens*, предшествующие миллионы лет эволюции гоминид и всего класса млекопитающих протекали с постоянным потреблением **P**. Замечательный успех этой эволюции (до последних полутора веков) убеждает в вероятности открытия ещё не известных положительных воздействий **P** на здоровье.

Литература

(п.п. 1-19; 21-23; 25-36 см. References)

20. Покусаева Д.П., Аниховская И.А., Коробкова Л.А., Яковлев М.Ю. Возрастные и гендерные особенности показателей системной эндотоксинемии и их взаимосвязь с общепризнанными лабораторными факторами риска атеросклероза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(3): 13-9. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2019.03.13-19>
24. Кузнецова Л.В., Бахтина Л.Ю., Малышев И.Ю. Фундаментальные исследования в контексте разработки лекарственных веществ и технологий *Патогенез*. 2018; 16(3): 83-6. DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.84-86

References

1. Xia N., Daiber A., Förstermann U., Li H. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 2017; 174: 1633–46.
2. Salehi B., Mishra A.P., Nigam M., Sener B., Kilic M., Sharifi-Rad M., et al. Resveratrol: a double-edged sword in health benefits. *Biomedicines*. 2018; 6:E91. 10.3390.
3. Milkovic L., Cipak Gasparovic A., Cindric M., Mouthuy P.A., Zarkovic N. Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. *Cells*. 2019; 8; E793. 10.3390.
4. Hajizadeh-Sharafabad Fatemeh, Sahebkar Amirhossein, Zabetian-Targhi Fateme, Maleki Vahid. The impact of resveratrol on toxicity and related complications of advanced glycation end products: A systematic review. *Biofactors*. 2019; 45(5): 651-65.
5. Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*. 2004; 430: 686–9.
6. Yu-Te Lin, Yi-Chung Wu, Gwo-Ching Sun, Chiu-Yi Ho, Tzyy-Yue Wong, Ching-Huang Lin, et al. Effect of resveratrol on reactive oxygen species-induced cognitive impairment in rats with angiotensin II-induced early Alzheimer's disease. *J Clin Med*. 2018; Oct; 7(10): 329.
7. Witte A.V., Kerti L., Margulies D.S., Floel A. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *J. Neurosci*. 2014; 34(23): 7862-70.
8. Cheng Kang, Song Zhihua, Zhang Hao, Li Simian, Wang Chao, Zhang Lili, et al. The therapeutic effects of resveratrol on hepatic steatosis and lipid-related gene transcriptional expression. is in high-fat diet-induced obese mice by improving oxidative stress inflammation and lipid-related gene transcriptional expression. *Med Mol Morphol*. 2019; 52(4): 187-97.
9. Pisoschi A.M., Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem*. 2015; 97: 55–74.
10. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018; 13: 757–72.
11. Mehta J., Rayalam S., Wang X. Cytoprotective effects of natural compounds against oxidative stress. *Antioxidants*. 2018; 7: 147.
12. Marx W., Kelly J.T., Marshall S., Cutajar J., Annois B., Pipingas A., et al. Effect of resveratrol supplementation on cognitive performance and mood in adults: a systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Rev*. 2018; Jun 1; 76(6): 432-43.
13. Vang Ole. What Is New for Resveratrol? Is a New Set of Recommendations Necessary? *Ann N Y Acad Sci*. 2013; 1290, 1-11.
14. Weiskirchen Sabine, Weiskirchen Ralf. Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? *Adv Nutr*. 2016; Jul; 7(4): 706–18.
15. Scott Edwina Cai Hong, Kholghi Abeer, Andreadi Catherine, Rufini Alessandro, Karmokar Ankur, et al. Less is more for cancer chemoprevention: evidence of a non-linear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice. *Sci Transl Med*. 2015; Jul 29; 7(298): 298ra117.
16. Chaplin Alice, Carpené Christian, Mercader Josep. Resveratrol, Metabolic Syndrome, and Gut Microbiota. *Nutrients*. 2018; Nov; 10(11): 1651.
17. Rotches-Ribalta M., Urpi-Sarda M., Llorach R., Boto-Ordoñez M., Jauregui O., Chiva-Blanch G., et al. Gut and microbial resveratrol metabolite profiling after moderate long-term consumption of red

- wine versus dealcoholized red wine in humans by an optimized ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *J. Chromatogr.* 2012; 1265: 105–13.
18. Basholli-Salihu Mimoza, Schuster Roswitha, Mulla Dafina, Praznik Werner, Viernstein Helmut, Muelle Monika. Bioconversion of piceid to resveratrol by selected probiotic cell extracts. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2016; 39(12): 1879–85.
 19. Baur Joseph, Pearson Kevin, Price Nathan, Jamieson Hamish, Lerin Carles, Kalra Avash, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006; 16; 444(7117): 337–42.
 20. Pokusaeva D.P., Anikhovskaya I.A., Korobkova L.A., Yakovlev M.Yu. Age and gender characteristics of indicators of systemic endotoxemia and their relationship with generally accepted laboratory risk factors for atherosclerosis. 2019; 63(3): 13-9. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2019.03.13-19>. (in Russian)
 21. Witte Veronica, Kerti Lucia, Margulies Daniel, Flöel Agnes. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *J Neurosci.* 2014; 4; 34(23): 7862–70.
 22. de Ligt M., Timmers S., Schrauwen P. Resveratrol and obesity: Can resveratrol relieve metabolic disturbances? *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jun; 1852(6): 1137-44.
 23. Akbari Maryam, Tamtaji Omid Reza, Lankarani Kamran B, Tabrizi Reza, Dadgostar Ehsan, Haghghat Neda, et al. The effects of resveratrol on lipid profiles and liver enzymes in patients with metabolic syndrome and related disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Lipids Health Dis.* 2020; 19: 25.
 24. Kuznetsova L.V., Bukhtina L.Yu., Malyshev I.Yu. Basic research in the context of the development of medical substances and technologies. *Patogenez.* 2018; 16(3): 83-6. DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.84-86
 25. Szkudelski T., Szkudelska K. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochim. Biophys. Acta,* 2015; 1852 (6): 1145-54.
 26. Kwon H., Pessin J.E. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front. Endocrinol.* 2013; 4(71).
 27. Gomez-Zorita S., Fernandez-Quintela A., Lasa A., Hijona E., Bujanda L., Portillo M.P. Effects of resveratrol on obesity-related inflammation markers in adipose tissue of genetically obese rats. *Nutrition.* 2013; 29(11-12): 1374-80.
 28. Mendez-del Villar M., Gonzalez-Ortiz M., Martinez-Abundis E., Perez-Rubio K.G., Lizarraga-Valdez R. Effect of resveratrol administration on metabolic syndrome, insulin sensitivity, and insulin secretion. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 2014; 12: 497–501.
 29. Neves A.R., Lucio M., Martins S., Lima J.L.C., Reis S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. *Int. J. Nanomed.* 2013; 8: 177–87.
 30. Sessa M., Balestrieri M.L., Ferrari G., Servillo L., Castaldo D., D’Onofrio N., et al. Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. *Food Chem.* 2014; 147: 42–50.
 31. Wahl D., Bernier M., Simpson S.J., de Cabo R., Le Couteur D.G. Future directions of resveratrol research. *Nutr. Healthy Aging* 2018; 4: 287–90.
 32. Pannu N., Bhatnagar A. Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomed. Pharmacother.* 2019; 109: 2237–51.
 33. Singh A.P., Singh R., Verma S.S., Rai V., Kaschula C.H., Maiti P., et al. Health benefits of resveratrol: evidence from clinical studies. *Med. Res. Rev.* 2019; 39: 1851–91.
 34. Smoliga J.M., Blanchard O. Enhancing the delivery of resveratrol in humans: if low bioavailability is the problem, what is the solution? *Molecules.* 2014; 19: 17154–72.
 35. Vaiserman Alexander, Koliada Alexander, Zayachkivska Alina, Lushchak Oleh. Nanodelivery of Natural Antioxidants: An Anti-aging Perspective. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019; 7: 447.
 36. Dutra Arbo Bruno, André-Miral Corinne, Nasre-Nasser Raif Gregorio, Schimith Lúcia Emanuéli, Goulart Santos Michele, Dennis Costa-Silva, et al. Resveratrol Derivatives as Potential Treatments for Alzheimer’s and Parkinson’s Disease. *Front. Aging Neurosci.* 17 April 2020 00103

Сведения об авторе:

Пальцин Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр. НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО.

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-006.6

Лосев О.Э., Бородулин В.Б., Русецкая Н.Ю., Бобылева Е.В., Бородулин Я.В.

Молекулярные механизмы развития рака легкого

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, 410012, Саратов, Россия, Б. Казачья ул., д. 112

Рак легкого является многоэтапным процессом с участием генетических факторов и изменений в эпигенетическом регулировании клеточного цикла. Амплификация генов, сверхэкспрессия, точечные мутации или перестройки ДНК могут привести к постоянной позитивной регуляции митогенных сигналов роста, вследствие чего усиливается онкогенная сигнализация в клетках. В данном обзоре рассматриваются нарушения в 3 сигнальных путях (RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-Akt-mTOR и Keap1-Nrf2) при раке легкого. Причинами неконтролируемого роста и пролиферации клеток являются мутации EGFR, KRAS и аномальное слияние EML4-ALK, вследствие чего активируются 2 основных пути внутриклеточной сигнализации RAS-RAF-MEK-ERK и PI3K-Akt-mTOR. Канцерогенез при раке легкого может быть вызван генетическими aberrациями в любых компонентах пути PI3K-Akt-mTOR, его отрицательных регуляторах, взаимосвязанных путях и передаче сигналов через рецепторы RTK. Нарушения сигнального пути Keap1-Nrf2, обнаруженные при раке легкого, вызваны соматическими мутациями, потерей гетерозиготности или метилированием ДНК в промоторной области Keap1 и мутациями Nrf2, что приводит к увеличению накопления Nrf2. Опухоли с высоким уровнем Nrf2 связаны с плохим прогнозом из-за радио- и химиорезистентности и агрессивной пролиферации раковых клеток. Гиперактивность Nrf2 помогает автономным злокачественным клеткам выдерживать высокие уровни эндогенных активных форм кислорода (АФК) и избегать апоптоза. В этой связи важным подходом для профилактики рака является усиление активности Nrf2, тогда как для лечения рака желательно ингибирование Nrf2.

Ключевые слова: рак легкого; пролиферация; сигнальные пути; MAP-киназы; Akt; Nrf2; ARE**Для цитирования:** Лосев О.Э., Бородулин В.Б., Русецкая Н.Ю., Бобылева Е.В., Бородулин Я.В. Молекулярные механизмы развития рака легкого. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021;65 (1): 124-132.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.124-132

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Бородулин В.Б., Русецкая Н.Ю.; сбор и обработка материала – Лосев О.Э., Бобылева Е.В., Бородулин Я.В.; написание текста – Бородулин В.Б., Русецкая Н.Ю., Лосев О.Э.; подготовка иллюстративного материала – Бородулин В.Б., Русецкая Н.Ю.; редактирование – Бородулин В.Б., Русецкая Н.Ю., Бобылева Е.В.**Для корреспонденции:** Русецкая Наталья Юрьевна, e-mail: borodulinvb@mail.ru**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.11.2019

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Losev O.E., Borodulin V.B., Rusetskaya N.Y., Bobyleva E.V., Borodulin Y.V.

Molecular mechanisms of lung cancer

V.I. Razumovsky Saratov State Medical University,
Kazachiya Str. 112, Saratov 410012, Russian Federation

Lung cancer is a multistep process involving genetic factors and changes in the epigenetic regulation of cell cycle. Gene amplification, overexpression, point mutations or DNA rearrangements may lead to continuous positive regulation of mitogenic growth signals resulting in enhancement of oncogenic cell signaling. This review focuses on disorders of three signaling pathways (RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-Akt-mTOR, and Keap1-Nrf2) in lung cancer. The causes for the uncontrolled cell growth and proliferation are EGFR and KRAS mutations and the abnormal EML4-ALK merging, which activate two major pathways of intracellular signaling, RAS-RAF-MEK-ERK and PI3K-Akt-mTOR. Carcinogenesis in lung cancer may result from genetic aberrations in any component of the PI3K-Akt-mTOR pathway, its negative regulators, interconnected pathways, and the signal transduction through RTK receptors. The disorders of the Keap1-Nrf2 signaling pathway found in lung cancer are caused by somatic mutations, loss of heterozygosity or DNA methylation in the Keap1 promoter region and Nrf2 mutations, which lead to an increase in the accumulation of Nrf2. Tumors with high Nrf2 levels are associated with a poor prognosis due to their radio- and chemoresistance and aggressive proliferation of cancer cells. The Nrf2 hyperactivity helps autonomous malignant cells withstand high levels of endogenous reactive oxygen species (ROS) and evade apoptosis. In this regard, enhancing the Nrf2 activity is an important approach to prevention of cancer while Nrf2 inhibition is desirable for its treatment.

Keywords: lung cancer; proliferation; signaling pathways; MAP-kinases; Akt; Nrf2; ARE

For citation: Losev O.E., Borodulin V.B., Rusetskaya N.Y., Bobyleva E.V., Borodulin Y.V. Molecular mechanisms of lung cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 124-132. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.124-132

Contribution of authors: the concept and design of the study – Borodulin V.B., Rusetskaya N.Y.; collection and processing of material – Losev O.E., Bobyleva E.V. Borodulin Y.V.; preparing illustrative material – Borodulin V.B., Rusetskaya N.Y.; writing a text – Borodulin V.B., Rusetskaya N.Y., Losev O.E.; editing – Borodulin V.B., Rusetskaya N.Y., Bobyleva E.V.

For correspondence: *Rusetskaya Natalya Yuryevna*, Associate Professor, Department of Biochemistry, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education Saratov State Medical University named after Razumovsky of the Ministry of Health of the Russian Federation, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor e-mail: rusetskayanu@yandex.ru

Acknowledgment: The study had no sponsorship.

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

Information about authors:

Borodulin V.B., <https://orcid.org/0000-0003-1550-313X>

Losev O.E., <https://orcid.org/0000-0002-4816-5707>

Rusetskaya N.Y., <https://orcid.org/0000-0002-0121-1112>

Bobyleva E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1124-2817>

Borodulin Y.V., <https://orcid.org/0000-0002-8685-6517>

Received 22.11.2019

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Рак легкого является ведущей причиной смерти от онкологических заболеваний у мужчин и женщин, как в России, так и за рубежом. Многолетние исследования показали, что рак легкого является многоэтапным процессом с участием генетических факторов и изменений в эпигенетическом регулировании клеточного цикла. В результате повреждения ДНК нормальные эпителиальные клетки легких подвергаются канцерогенному перерождению. В настоящее время неизвестно, будут ли восприимчивы к полной злокачественной трансформации все эпителиальные клетки легких или только некоторое подмножество этих клеток (например, легочных эпителиальных стволовых клеток или их клеток-предшественников). Кроме того, при наличии нескольких мутаций опухолевые клетки могут приобретать дополнительные свойства, нехарактерные для нормальных клеток (инвазивность, способность к миграции, адгезии и т.д.) [1-2].

Рак легкого подразделяют на 2 основных типа: мелкоклеточный рак легкого (МРЛ, SCLC) и немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ, NSCLC). МРЛ является очень агрессивным, метастазирующим и смертельным типом рака, на долю которого приходится 15%. НМРЛ является основным типом рака легкого и его доля составляет 85% всех случаев рака легкого. НМРЛ включает аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого (ПРЛ, LSCC) и крупноклеточный рак легкого [3-4]. Пятилетняя выживаемость в популяциях с раком легкого составляет от 4 до 17% в зависимости от стадии заболевания к моменту верификации диагноза и осо-

бенностей пациента. 5-летняя выживаемость пациентов с 1А стадией НМРЛ составляет 77-92%, с 1В стадией – 68%, с 2А – 60% и 2В – 53% [5-8].

Молекулярные причины канцерогенеза в легких находятся в центре внимания современных исследований, они могут отражать изменения, происходящие в разных классах эпителиальных клеток или различные молекулярные изменения, происходящие в эпителиальных клетках легочной ткани.

Сигнальные пути онкогенов и факторов роста. Активация онкогенов происходит, вероятно, во всех случаях рака легкого (как правило, путем амплификации гена, сверхэкспрессии, точечной мутации или перестроек ДНК) и может привести к постоянной позитивной регуляции митогенных сигналов роста, которые вызывают рост клеток, вследствие чего клетка становится зависимой от онкогенной сигнализации [9-33].

В настоящее время предпринимаются все новые шаги по выявлению молекулярных мишеней для лечения рака легкого. Мутация EGFR (Epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермального фактора роста) и аномальное слияние EML4 – ALK (EML4 – Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4, ALK – Anaplastic lymphoma kinase) активируют 2 основных пути внутриклеточной сигнализации, RAS-RAF-MEK-ERK и PI3K-Akt-mTOR, которые приводят к неконтролируемому росту и пролиферации клеток. Сигнальный путь PI3K-Akt-mTOR является одним из путей, участвующих в канцерогенезе немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) [10]. Молекулярные и гистологиче-

ские особенности пациентов с раком легкого представлены в **таблице** [11-33].

PI3K/AKT/mTOR путь. Физиологически путь PI3K-Akt-mTOR (PI3K – Phosphoinositide 3-kinases, Akt – AKT-serine/threonine kinase 1, mTOR – mechanistic target of rapamycin) активируется связыванием лиганда с тирозинкиназными рецепторами (receptor tyrosine kinase, RTK), такими как EGFR, ErbB3, MET, PDGFR, VEGFR, IGF-1R, HER2/neu, что приводит к сборке и активации фосфатидилинозитол-3-киназ (PI3Ks) в клеточной мембране, где они превращают фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP2) в фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3). Одновременно может быть активирован путь Ras-Raf-MAPK, пересекающийся с сигнальным путем PI3K-Akt-mTOR. PIP3, образованный на клеточной мембране, действует как вторичный мессенджер, который связывается с Akt и способствует его фосфорилированию по остатку Thr308 в каталитическом домене фосфоинозитид-зависимой киназой 1 (PDK1) и по остатку Ser473 в C-концевом гидрофобном мотиве mTORC2. Это при-

водит к полной активации Akt, благодаря чему происходит фосфорилирование и инактивация комплекса TSC2-TSC1, который является ГТФаза-активирующим белком (GAP) для гомолога Ras (RHEB). Кроме того, активированный AKT фосфорилирует ряд белков, которые включают киназы (GSK-3 α / β , I κ B α), ингибиторы клеточного цикла (CDKN1A, CDKN2B), факторы транскрипции (FOXO1, FOXO3a) и / или белки, участвующие в апоптозе (Bad, прокаспаза-9) [34]. TSC2 инактивируется также ERK-Rsk. В результате этого активируется комплекс mTORC1, который фосфорилирует киназу p70 S6 и 4E-связывающий белок 1 (4EBP1), 4EBP2 и 4EBP3, что приводит к увеличению переноса белка, биогенезу рибосом и ингибированию аутофагии, пролиферации и выживанию клеток [10] (**рисунок**).

Нарушение сигнализации PI3K-Akt-mTOR при НМРЛ.

Канцерогенез является результатом способности раковых клеток поддерживать пролиферативную сигнализацию, уклоняться от супрессоров роста, активировать инвазию и метастазы, способствовать репликативному бессмертию, индуцировать ангиогенез и сопротивлять-

Таблица

Молекулярные и гистологические особенности рака легкого.

Мутации	Молекулярные особенности	Частота	Гистология	Ссылки
EGFR	Более 90% делеции экзона 19 и мутации экзона 21 (Leu858Arg)	17-21%	Главным образом аденокарцинома, нечасто плоскоклеточная карцинома (ПК, SCC)	11-19
HER2	Активирующие вставки экзона 20	2% НМРЛ, из них 35% сверхэкспрессия, 10% амплификация	Аденокарцинома	11, 12
KRAS	Точечные мутации кодона 12 (более 90%) и кодона 13 (менее 10%)	25% аденокарцинома, 5% ПК	Главным образом аденокарцинома, реже ПК	11, 12, 19-21
BRAF	Активирующие мутации тирозинкиназного домена 50% мутация Val600Glu	2-5%	Главным образом аденокарцинома	11, 12, 22
MET (MEK)	Мутации пропуска экзона 14	4% аденокарцинома, 1% ПК	Аденокарцинома	11, 12, 23
ALK	Слияние генов партнеров с экзоном 20 гена ALK (перегруппировка ALK-EML4)	2-7% НМРЛ	Главным образом аденокарцинома	11, 12, 24
PIK3CA	Соматические мутации в экзонах 9 и 20	1-5% НМРЛ 6,5% ПК 1,5% аденокарцинома	ПК, реже аденокарцинома	12
PTEN	Метилирование промоторов (24%)	6-9%	МРЛ	25, 26
	Активация miR-21 и потеря PTEN в хромосоме 10 (24-44%)			
KEAP1	Точечные мутации (G430C, G364C и R470C) или Делеция	20% аденокарцинома	Аденокарцинома	26-29
Nrf2	Потеря экзона 2	1-4% НМРЛ	ПК, реже аденокарцинома	29-33

Примечание. Описание данных таблицы в тексте.

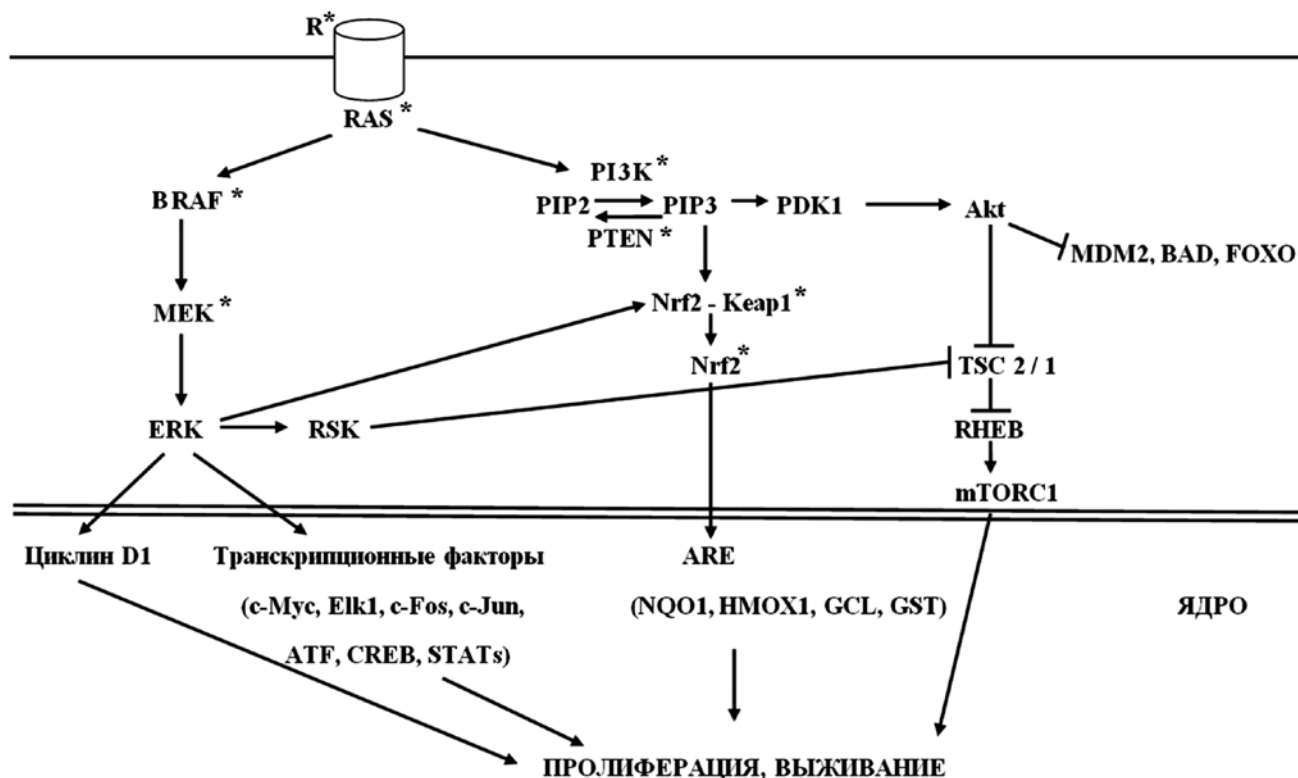
ся клеточной гибели [35]. Многие исследования показали, что избыточная экспрессия фосфорилированного Akt при НМРЛ составляет 50-70%, что указывает на то, что аномальная активация пути PI3K-Akt-mTOR является частым событием [34]. Условная активация сигнального пути PI3K-Akt-mTOR может быть результатом генетических aberrаций в любых компонентах пути PI3K-Akt-mTOR, его отрицательных регуляторах, взаимосвязанных путях и передаче сигналов через рецепторы RTK, что приводит к аномальному росту и пролиферации клеток (рисунок). Мутация EGFR и увеличенные копии, мутация и амплификация MET и перегруппировка EML4-ALK являются примерами генетических изменений, которые могут привести к аномальной передаче сигналов RTK [11, 12].

Кроме того, путь PI3K-Akt-mTOR переключается с Ras-Raf-MEK-ERK-Rsk, поэтому мутации KRAS также играют определенную роль. Некоторые из этих генетических изменений более распространены в ряде гистологических подтипов НМРЛ, чем другие. Мутации EGFR, KRAS и перегруппировка EML4-ALK чаще встречаются при аденокарциноме, чем плоскоклеточный рак, тогда как амплификация PIK3CA чаще встре-

чается при плоскоклеточной карциноме (ПК), чем карцинома без плоскоклеточного рака (таблица 1) [10].

Мутации PI3KCA выявлены у 2% пациентов с НМРЛ. PI3KCA фосфорилирует PIP2 с образованием PIP3, тогда как фосфатаза PTEN, напротив, дефосфорилирует PIP3. Следовательно, PTEN подавляет сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR [36-39].

Нарушения в MAP-киназных сигнальных путях также могут вызвать канцерогенез. Митоген-активированная протеинкиназа (МАРК) является важным сигнальным путем в ответ на внеклеточные стимулы. Существует 5 основных компонентов MAP-киназных сигнальных путей: ERK (ERK1 / ERK2), c-Jun N (JNK / SAPK), p38 MAPK (p38α, p38β, p38γ и p38δ) и ERK3 / ERK4 / ERK5. При стимуляции внеклеточными стимулами запускаются MAPK сигнальные пути, которые связаны с множественными биологическими процессами, такими как пролиферация, дифференцировка клеток, смерть, миграция, инвазия и воспаление. Однако после аномальной активации возможна инициация канцерогенеза. Несколько компонентов сети MAPK уже были предложены в качестве целей в терапии рака, таких как p38, JNK, ERK, MEK, RAF, RAS



Нарушение сигнальных путей при онкогенезе. Обозначения: R – рецепторы, связанные с G-белком, рецепторы цитокинов, рецепторы RTK (EGFR, PDGFR, VEGFR, ErbB, KIT, MET, IGFR). * обозначают возможные мутации. Описание мутаций в таблице 1.

и DUSP1. Среди них при канцерогенезе у человека наиболее часто отмечались изменения в пути RAS-RAF-МЕК-ERK-МАРК (RAS-МАРК) [40.]

Путь JNK. JNK (c-Jun N-terminal kinase) кодируются тремя генами JNK1, JNK2 и JNK3. Подтипы JNK1 / 2 повсеместно экспрессируются, тогда как JNK3 обнаружены, главным образом, в семенниках и головном мозге. JNK является важным медиатором апоптоза и клеточной пролиферации, индукция которого происходит в ответ на различные химиотерапевтические агенты и клеточные стрессы, включая тепловой шок, ионизирующее излучение, окислительный стресс. JNK обычно активируется MKK7 и MKK4. Исследования показывают, что JNK1 и JNK2 участвуют в сенсбилизации к гибели клеток, индуцированной цисплатином. Увеличение уровней активных форм кислорода (АФК) опосредуют активацию JNK при ингибировании Р38 МАРК. На самом деле, существуют некоторые взаимодействия между JNK и МАРК-каналом. Изоформы JNK могут стимулировать МАРК р38, в то время как многие МАРККК в модуле р38 совместно используются модулем JNK [40].

Путь Р38МАРК. Как указано выше, пути р38 МАРК и JNK могут пересекаться на нескольких уровнях, главным образом в недетерминированных клетках. Существует 4 изоформы р38 (р38 α , р38 β , р38 γ и р38 δ), также известного как стресс-активированная протеинкиназа (SAPK) 2a, 2b, 3 и 4 соответственно, которые различаются по распределению в тканях; р38 МАР-киназа избирательно активируется МАРК-киназами (MKK3/6) и механизм опосредуется двойным фосфорилированием в мотиве Thr-Gly-Tyr. Они опосредуют выживаемость клеток или клеточную гибель в зависимости не только от типа стимула, но также и от типа клеток. В клетках SAPKs/JNKs и р38 плохо активируются митогенами, но сильно активируются в ответ на стресс-сигналы [40].

Как правило, р38МАРК может играть важную роль при раке легкого, предстательной железы, молочной железы, мочевого пузыря, печени, трансформированной фолликулярной лимфоме и лейкемии. Снижение активности р38 имеет много общего с раком, поскольку непрерывная клеточная пролиферация требует активности р38 у большинства изученных новообразований, которая осуществляется путем активации нижестоящих мишеней. Более того, антиканцерогенное действие р38МАРК связано как с активацией р53, так и с апоптозом, вызванным р53 [40].

р53 путь. TP53 (17p13) кодирует фосфопротеин, который предотвращает накопление генетических повреждений в дочерних клетках. В ответ на клеточный стресс, р53 индуцирует экспрессию нижестоящих генов, таких

как ингибиторы циклин-зависимой киназы (CDK), которые регулируют контрольные точки сигналов клеточного цикла, в результате чего клетки не могут пройти фазу G1, что позволяет начаться репарации ДНК или процедуре апоптоза [41]. р53-инактивирующие мутации являются наиболее распространенными изменениями в легких. Изменения в хромосомах 17p13 часто связаны с удалением и мутационной инактивацией в оставшихся аллелях. Некоторые точечные мутации в TP53 могут придать фенотипу усиление функции, что приводит к увеличению агрессивности рака легкого. Из-за распространенности р53-инактивирующих мутаций в раковых клетках человека многочисленные усилия исследователей были сосредоточены на терапевтических стратегиях с целью восстановления нормальной функции р53. Они включают в себя повторное введение дикого типа р53 с помощью генной терапии, фармакологическую реактивацию мутантного р53 небольшими молекулами и пептидами, блокирование MDM2, ингибирование MDM2 убиквитинлигазной активности, и ориентации р53-MDM2 на взаимодействие с низкомолекулярными ингибиторами. В естественных условиях происходило восстановление экспрессии р53 в субпопуляции опухолевых клеток, что указывало на положительный терапевтический эффект [42]. Частота мутаций TP53 при МРЛ составляет от 75% до 90%, что указывает на то, что потеря этого гена является важным событием в начале развития МРЛ [43, 44].

Путь ERK (extracellular signal-regulated kinase). ERK1 и ERK2 являются ключевыми преобразователями сигналов пролиферации, дифференцировки и выживания (рисунк). Первоначально было установлено, что ERK фосфорилируется по остаткам Tyr и Thr и экспрессируется почти во всех тканях, что влияет на рост клеток путем прогрессирования G1-S-фазы. ERK3 ответствен за пролиферацию клеток, прогрессирование клеточного цикла и дифференцировку клеток, тогда как функция ERK4 остается неизвестной; ERK5 (также известный как BMK) активируется различными раздражителями, такими как окислительный стресс и факторы роста, и необходим для раннего эмбрионального развития, развития сосудистой системы, а также для выживаемости клеток [40].

МАРК и рак легкого. Курение табака, пол, этническая принадлежность, возраст, окружающая среда, диета, ожирение, инфекции, заболевания легких или обструкции дыхательных путей - все это во многом способствует возникновению рака легкого. Кроме того, развитию рака легкого способствуют множественные мутации генов, из которых 90% приходится на KRAS, благодаря чему происходит активация сигнального пути RAS/RAF/

МЕК/МАРК [40]. При НМРЛ в 50-90% раковых клеток характерна избыточная экспрессия или aberrантная активация EGFR. Дисбаланс между МКК6 и МКК3 может быть потенциальным биомаркером для НМРЛ [40].

RAS/RAF/MEK/МАРК путь. Одним из основных эффекторов RAS/RAF/MEK/МАРК пути является протоонкоген MYC. В нормальных условиях этот фактор транскрипции контролирует клеточную пролиферацию (**рисунок**). Однако aberrантное изменение его свойств через активацию или сверхэкспрессию обычно обнаруживается в раковых клетках легкого. Протоонкоген Myc и члены его подсемейства (MYC, MYCN и MYCL) являются объектами сигнализации RAS (Retrovirus Associated DNA Sequences) и ключевыми регуляторами пролиферации, для которой необходима активация Myc, что приводит клеточный цикл к непрерывной репликации. Активация членов MYC часто происходит посредством амплификации гена. MYC наиболее часто активируется при НМРЛ, в то время как другие два гена, MYCN и MYCL, как правило, активизируются при МРЛ [45].

Белки Ras являются важными медиаторами клеточной передачи сигналов. Существует широкий спектр белков Ras-эффектора, в частности Raf (МАРК-киназный путь), PI3-киназа (путь Akt/mTOR) и RalGDS (путь Ral). Эти эффекторы (которые представляют собой только подмножество ниже лежащих сигнальных узлов Ras) очень сложны с многочисленными взаимодействиями между путями. Нарушение регуляции Ras приводит к увеличению пролиферации, уменьшению апоптоза, нарушению клеточного метаболизма и усилению ангиогенеза, что является отличительными признаками канцерогенеза [46, 47].

Сигнальные пути RAS/RAF/MEK/МАРК при раке легкого. Активация пути RAS/RAF/MEK/МАРК часто встречается при раке легкого вследствие активирующих мутаций в KRAS, которые происходят примерно в 20% случаев рака легкого, особенно при аденокарциномах (**таблица**) [11, 12, 19-21]. При раке легкого, 90% мутаций находится в KRAS (80% в кодоне 12, а 20% в кодонах 13 и 61). В результате подобных мутаций происходит активация ниже лежащих сигнальных путей, таких как PI3K и MAPK, вызывающих возникновение опухолей KRAS, независимо от EGFR сигнализации и, следовательно, устойчивых к проводимой химиотерапии (**рисунок, таблица**) [11, 12, 19-21].

KRAS мутации являются взаимоисключающими с мутациями EGFR и ERBB2 и, прежде всего, наблюдаются в легких при диагностировании аденокарциномы у курильщиков [32]. Распространенность и значимость KRAS в легких при развитии опухолевого процесса делают его привлекательной терапевтической мишенью.

В последнее время усилия были сосредоточены на ниже лежащих эффекторах передачи сигналов RAS: RAF-киназа и MAPK / MEK-киназа [11, 12, 48-50]. Кроме того, также обнаружено, что прогрессирование рака легкого вызвано изменениями генов в пути Keap1-Nrf2.

Keap1-Nrf2 сигнальный путь. Путь Keap1-Nrf2 является основным регулятором цитопротективных ответов на эндогенные и экзогенные стрессы, вызванные АФК [51, 52]. Ключевыми сигнальными белками в пути являются фактор транскрипции Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), и Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), репрессорный белок, который связывается с Nrf2 и способствует его деградации по пути протеосомного убиквитинирования (**рисунок**). Окисление остатков цистеина C151, C273 и C288 изменяют конформацию Keap1, приводящую к освобождению и ядерной транслокации Nrf2 [53]. В ядре Nrf2 связывается с антиоксидант-респонзивным элементом (ARE) и запускают экспрессию генов-мишеней Nrf2, таких как NAD(P)H-хинон-оксидоредуктаза 1 (NQO1), гем-оксигеназа 1 (HMOX1), глутамат-цистеиновая лигаза (GCL) и глутатион-S-трансфераза (GST) (**рисунок**) [52]. Важно заметить, что сигнальный путь Keap1-Nrf2 пересекается с описанными выше сигнальными путями RAS-RAF-MEK-ERK и PI3K-Akt-mTOR. На активность Nrf2 влияют MAP-киназы ERK 1/2, JNK2, p38 MAPK, MEK3/4. В частности, p38 MAPK ингибирует Nrf2, тогда как ERK2 и JNK, напротив, активируют сигнальный путь Keap1-Nrf2, а киназы PERK и PIP3 усиливают транслокацию Nrf2 в ядро (**рисунок**) [54].

Все большее число исследований показывают, что нарушения пути Keap1-Nrf2, обнаруженные при раке легкого, включают соматические мутации, потерю гетерозиготности или метилирование ДНК в промоторной области Keap1, а также мутации Nrf2 [55-56]. Соматические изменения в Keap1 были впервые обнаружены как в клеточных линиях рака легкого, так и в опухолевых тканях легких. Aberrантный Keap1 нарушает связь между Keap1 и Nrf2, что приводит к увеличению накопления Nrf2. Атлас генома рака (TCGA) недавно профилировал 178 плоскоклеточных карцином (ПК, SQCC) для комплексной геномной характеристики. Данные показали, что мутации или делеции в Nrf2, Keap1 и CUL3 наблюдались в 34% опухолей [55, 56]. В другом исследовании было рассмотрено 213 соматических мутаций в Keap1, а затем было описано 18 общих мутаций при ПРЛ. Из этих 18 мутаций 4 (L231V, S224Y, P318L и R71L) не влияли на ингибирующее действие NRF2, 5 (N469fs, P318fs, G333C, R554Q и W544C) — влияли на ассоциацию Keap1-Nrf2 и способность Keap1 подавлять Nrf2, остальные сайты мутаций показали ги-

поморфное подавление Nrf2 [55]. Соматические мутации в Nrf2 или Keap1 нарушают взаимодействие этих 2 белков. В Nrf2 мутации влияют на ETGE и DLG-мотивы, но в Keap1 мутации более равномерно распределены. Кроме того, активация онкогена, такая как KrasG12D, [51-53, 56], или нарушение супрессоров опухолей, таких как PTEN [57], может привести к транскрипционной индукции Nrf2 и увеличению ядерного Nrf2. Гиперметилирование промотора Keap1 при раке легкого приводит к уменьшению экспрессии мРНК Keap1, что увеличивает накопление Nrf2 в ядре [58]. К настоящему времени известно, что мутации в KEAP1, ингибиторе NRF2, присутствуют примерно в 20% аденокарцином легкого человека (таблица) [26-29, 59].

У пациентов с раком легкого также были обнаружены параллельные мутации KRAS с TP53 (39%) и с KEAP1 (24%). Совместные мутации KRAS и KEAP1 связаны с более коротким сроком выживания [39].

В физиологических условиях низкие уровни ядерного Nrf2 достаточны для поддержания клеточного гомеостаза. Nrf2 ингибирует иницирование опухоли и метастазы рака, устраняя канцерогены, АФК и другие ДНК-разрушающие агенты. Во время опухолегенеза накопление повреждений ДНК приводит к конститутивной гиперактивности Nrf2, которая помогает автономным злокачественным клеткам выдерживать высокие уровни эндогенных АФК и избегать апоптоза. Устойчиво повышенные уровни ядерного Nrf2 активируют метаболические гены в дополнение к цитозащитным генам, способствующим метаболическому перепрограммированию и усиленной клеточной пролиферации. Опухоли с высоким уровнем Nrf2 связаны с плохим прогнозом из-за радио- и химиорезистентности и агрессивной пролиферации раковых клеток. Таким образом, активность пути Nrf2 защищена на ранних стадиях опухолевого генеза, но вредна на более поздних стадиях. Поэтому для профилактики рака усиление активности Nrf2 остается важным подходом, тогда как для лечения рака желательнее ингибирование Nrf2 [51, 60].

Заключение

Причинами неконтролируемого роста и пролиферации клеток при НМРЛ являются мутации в сигнальных путях RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-Akt-mTOR и Keap1-Nrf2, которые взаимосвязаны друг с другом (**рисунки**). Развитию рака легкого способствуют множественные мутации генов, из которых 90% приходится на KRAS, благодаря чему происходит активация сигнального пути RAS/RAF/MEK/MAPK. При НМРЛ в 50-90% раковых клеток характерна избыточная экс-

прессия или aberrантная активация EGFR. Мутация EGFR и увеличенные копии, мутация и амплификация MET и перегруппировка EML4-ALK являются примерами генетических изменений, которые могут привести к аномальной передаче сигналов по путям RAS-RAF-MEK-ERK и PI3K-Akt-mTOR (таблица). Кроме того, p53-инактивирующие мутации также часто встречаются в легких и связаны с увеличением агрессивности рака легкого. Особое место занимает сигнальный путь Keap1-Nrf2, поскольку он является основным регулятором цитопротективных ответов на эндогенные и экзогенные стрессы вызванные АФК. Активация онкогена KrasG12D или нарушение супрессора опухолей PTEN может привести к транскрипционной индукции Nrf2 и увеличению ядерного Nrf2. С одной стороны, Nrf2 ингибирует иницирование опухоли и метастазы рака, устраняя канцерогены, АФК и другие ДНК-разрушающие агенты. Однако, с другой стороны, связанное с канцерогенезом накопление повреждений ДНК, приводит к конститутивной гиперактивности Nrf2, что помогает автономным злокачественным клеткам выдерживать высокие уровни эндогенных АФК и избегать апоптоза. Следовательно, усиление активности Nrf2 необходимо для профилактики рака легкого, тогда как для лечения рака желательнее ингибирование Nrf2. В этой связи в настоящее время проводится большое число исследований по таргетному лечению различных видов рака, при которых действие химиопрепаратов направлено на конкретные звенья сигнальных путей, позволяя регулировать пролиферацию и выживание опухолевых клеток.

Литература

- Кузнецова Е.С., Зиновьева О.Л., Опарина Н.Ю., Прокофьева М.М., Спиринов П.В., Фаворская И.А. и др. Аномальная экспрессия генов, регулирующих метаболизм и сигнальный путь ретиноидов, при немелкоклеточном раке легкого. *Молекулярная биология*. 2016; 50(2): 220-9.
- Дерюшева И.В., Цыганов М.М., Родионов Е.О., Ефтеев Л.А., Ибрагимов М.К., Миллер С.В. и др. Прогностическая значимость экспрессии мРНК генов TOP1, TOP2A, TUBB3, TYMS, ABCG5 И GSTP1 у пациентов с немелкоклеточным раком легкого. *Молекулярная медицина*. 2018. 16(4): 23-8.
- Бровкина О.И., Гордиев М.Г., Тороповский А.Н., Ходырев Д.С., Еникеев Р.Ф., Гусев О.А. и др. Определение соматических мутаций в гене EGFR в тканях и плазме больных немелкоклеточным раком лёгкого. *Биомедицинская химия*. 2016. 62(6): 638-44. DOI: 10.18097/PBMC20166206638.
- Якунина Е.Ю., Мошев А.В., Модестов А.А. Определение мутации гена EGFR у пациентов с немелкоклеточным раком легкого. *Сибирское медицинское обозрение*. 2016. 5(101): 112-3.
- Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньшикова Е.Б. Лабиринты регуляции NRF2. *Биохимия*. 2017; 82(5): 556-64.

References

- Kuznetsova E.S., Zinovieva O.L., Oparina N.Y., Prokofjeva M.M., Spirin P.V., Lisitsyn N.A., et al. Abnormal expression of genes that regulate retinoid metabolism and signaling in non-small-cell lung cancer. *Molekulyarnaya biologiya*. 2016; 50(2): 220-9. (in Russian)
- Zhu L., Deng H., Hu J., Huang S., Xiong J., Deng J. The promising role of miR-296 in human cancer. *Path Res Pract*. 2018; S0344-0338(18): 31012-4. DOI: 10.1016/j.prp.2018.09.026
- Pancewicz-Wojtkiewicz J. Epidermal growth factor receptor and Notch signaling in non-small-cell lung cancer. *Cancer Med*. 2016; 5(12): 3572-8. DOI: 10.1002/cam4.944.
- Abe Y., Tanaka N. The Hedgehog signaling networks in lung cancer: The mechanisms and roles in tumor progression and implications for cancer therapy. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 7969286. DOI: 10.1155/2016/7969286
- Goldstraw P., Chansky K., Crowley J., Rami-Porta R., Asamura H., Eberhardt W.E. et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2016; 11: 39–51. DOI: 10.1016/j.jtho.2015.09.009
- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136: E359–86. DOI: 10.1002/ijc.29210
- Hu M., Hu Y., He J., Li B. Prognostic value of basic fibroblast growth factor (bFGF) in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *PLoS One*. 2016; 11(1): e0147374. DOI: 10.1371/journal.pone.0147374. eCollection 2016.
- Deryusheva I.V., Tsyganov M.M., Rodionov E.O., Efteev L.A., Ibragimova M.K., Miller S.V., et al. The prognostic significance of mRNA expression of the TOP1, TOP2A, TUBB3, TYMS, ABCC5 and GSTP1 genes in patients with non-small cell lung cancer. *Molekulyarnaya meditsina*. 2018; 16(4): 23-8. (in Russian)
- Weir B.A., Woo M.S., Getz G., Perner S., Ding L., Beroukheim R., et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2007; 450(7171): 893–8. DOI: 10.1038/nature06358
- Yip P.Y. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2015; 4(2): 165-76. DOI: 10.3978/j.issn.2218-6751.2015.01.04
- Hirsch F.R., Scagliotti G.V., Mulshine J.L., Kwon R., Curran W.J.Jr., Wu Y.L., et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017; 389(10066): 299-311. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30958-8
- Morgensztern D., Campo M.J., Dahlberg S.E., Doebele R.C., Garon E., Gerber D.E., et al. Molecularly targeted therapies in non-small cell lung cancer annual update 2014. *J Thorac Oncol*. 2015; 10(1): S1–63. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000405
- Brovkina O.I., Gordiev M.G., Toropovskiy A.N., Khodyrev D.S., Enikeev R.F., Gusev O.A., et al. Determination of EGFR gene somatic mutations in tissues and plasma of patients with non-small cell lung cancer. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2016; 62(6): 638-44. DOI: 10.18097/PBMC20166206638 (in Russian)
- Yakunina E.Yu., Moshev A.V., Modestov A.A. Determination of EGFR gene mutation in patients with non-small cell lung cancer. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie*. 2016; 5(101): 112-3. (in Russian)
- Tsao A.S., Scagliotti G.V., Bunn P.A. Jr., Carbone D.P., Warren G.W., Bai C., et al. Scientific advances in lung cancer. 2015; *J Thorac Oncol*. 2016; 11: 613–38. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.03.012
- Tan D.S.W., Yom S.S., Tsao M.S., Pass H.I., Kelly K., Peled N., et al. The International Association for the Study of Lung Cancer consensus statement on optimizing management of EGFR mutation-positive NSCLC: status in 2016. *J Thorac Oncol*. 2016; 11(7): 946–63. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.05.008
- Wu Y.-L., Zhou C., Liam C.K., Wu G., Liu X., Zhong Z. et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann. Oncol*. 2015; 26(9): 1883–9. DOI: 10.1093/annonc/mdv270
- Castellanos E., Feld E., Horn L. Driven by Mutations: The Predictive Value of Mutation Subtype in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2017; 12(4): 612-23. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.12.014
- Fan G., Zhang K., Ding J., Li J. Prognostic value of EGFR and KRAS in circulating tumor DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(20): 33922-32. DOI: 10.18632/oncotarget.15412
- Kim J.H., Kim H.S., Kim B.J. Prognostic value of KRAS mutation in advanced non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: A meta-analysis and review. *Oncotarget*. 2017; 8(29): 48248-52. DOI: 10.18632/oncotarget.17594
- Tomasini P., Walia P., Labbe C., Jao K., Leigh N.B. Targeting the KRAS pathway in non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2016; 21(12): 1450-60. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0084
- Hyman D.M., Puzanov I., Subbiah V., Faris J.E., Chau I., Blay J.Y. et al. Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*. 2015; 373(8): 726–36. DOI: 10.1056/NEJMoa1502309
- Paik P.K., Drilon A., Fan P.D., Yu H., Rekhtman N., Ginsberg M.S. et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov*. 2015; 5(8): 842–9. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-1467
- Katayama R., Lovly C.M., Shaw A.T. Therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase in lung cancer: a paradigm for precision cancer medicine. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(10): 2227–35. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2791
- Milella M., Falcone I., Conciatori F., Cesta Incani U., Del Curatolo A., Inzerilli N. et al. PTEN: multiple functions in human malignant tumors. *Front Oncol*. 2015; 5: 24. DOI: 10.3389/fonc.2015.00024. eCollection 2015
- Testa U., Castelli G., Pelosi E. Lung Cancers: Molecular characterization, clonal heterogeneity and evolution, and cancer stem cells. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(8): 248. DOI: 10.3390/cancers10080248
- Jeong Y., Hoang N.T., Lovejoy A., Stehr H., Newman A.M., Gentles A.J., et al. Role of KEAP1/NRF2 and TP53 mutations in lung squamous cell carcinoma development and radiation resistance. *Cancer Discov*. 2017; 7(1): 86-101. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0127
- Jordan E.J., Kim H.R., Arcila M.E., Barron D., Chakravarty D., Gao J., et al. Prospective comprehensive molecular characterization of lung adenocarcinomas for efficient patient matching to approved and emerging therapies. *Cancer Discov*. 2017; 7(6): 596-609. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-1337
- Barrera-Rodríguez R. Importance of the Keap1-Nrf2 pathway in NSCLC: Is it a possible biomarker? *Biomed Rep*. 2018; 9(5): 375–82. DOI: 10.3892/br.2018.1143
- Goldstein L.D., Lee J., Gnad F., Klijn C., Schaub A., Reeder J. et al. Recurrent loss of NFE2L2 Exon 2 is a mechanism for Nrf2 pathway activation in human cancers. *Cell Rep*. 2016; 16: 2605–17. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.08.010
- Frank R., Scheffler M., Merkelbach-Bruse S., Ihle M.A., Kron A., Rauer M., et al. Clinical and pathological characteristics of KEAP1- and NFE2L2-mutated non-small cell lung carcinoma (NSCLC). *Clin Cancer Res*. 2018; 24: 3087–3096. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3416

32. Namani A., Cui Q.Q., Wu Y., Wang H., Wang X.J., Tang X. NRF2-regulated metabolic gene signature as a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(41): 69847–62. DOI: 10.18632/oncotarget.19349
33. Kitamura H., Motohashi H. NRF2 addiction in cancer cells. *Cancer Sci*. 2018; 109: 900–11. DOI: 10.1111/cas.13537
34. De Marco C., Laudanna C., Rinaldo N., Oliveira D.M., Ravo M., Weisz A. et al. Specific gene expression signatures induced by the multiple oncogenic alterations that occur within the PTEN/PI3K/AKT pathway in lung cancer. *PLoS One*. 2017; 12(6): e0178865. DOI: 10.1371/journal.pone.0178865. eCollection 2017
35. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57–70.
36. Malanga D., Belmonte S., Colelli F., Scarfo M., De Marco C., Oliveira D.M. et al. AKT1E17K is oncogenic in mouse lung and cooperates with chemical carcinogens in inducing lung cancer. *PLoS one*. 2016; 11(2): e0147334. DOI: 10.1371/journal.pone.0147334.
37. Maeda M., Murakami Y., Watari K., Kuwano M., Izumi H., Ono M. CpG hypermethylation contributes to decreased expression of PTEN during acquired resistance to gefitinib in human lung cancer cell lines. *Lung Cancer*. 2015; 87(3): 265–71. DOI: 10.1016/j.lungcan.2015.01.009
38. Xiao J., Hu C.P., He B.X., Chen X., Lu X.X., Xie M.X. et al. PTEN expression is a prognostic marker for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Oncotarget*. 2016; 7(36): 57832–40. DOI: 10.18632/oncotarget.11068
39. Tomasini P., Walia P., Labbe C., Jao K., Leigh N.B. Targeting the KRAS pathway in non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2016; 21(12): 1450–60. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0084
40. Lei Y.Y., Wang W.J., Mei J.H., Wang C.L. Mitogen-activated protein kinase signal transduction in solid tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(20): 8539–48.
41. Breuer R.H., Postmus P.E., Smit E.F. Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration*. 2005; 72(3): 313–330. DOI: 10.1159/000085376
42. Ventura A., Kirsch D.G., McLaughlin M.E., Tuveson D.A., Grimm J., Lintault L., et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*. 2007; 445(7128): 661–5. DOI: 10.1038/nature05541
43. Semenova E.A., Nagel R., Berns A. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes Dev*. 2015; 29(14): 1447–62. DOI: 10.1101/gad.263145.115
44. VanderLaan P.A., Rangachari D., Mockus S.M., Spotlow V., Reddi H.V., Malcolm J., et al. Mutations in TP53, PIK3CA, PTEN and other genes in EGFR mutated lung cancers: Correlation with clinical outcomes. *Lung Cancer*. 2017; 106: 17–21. DOI: 10.1016/j.lungcan.2017.01.011
45. Meyer N., Penn L.Z. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(12): 976–90. DOI: 10.1038/nrc2231
46. Vasan N., Boyer J.L., Herbst R.S. A RAS renaissance: emerging targeted therapies for KRAS-mutated non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(15): 3921–30. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1762
47. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013
48. Scholl C., Frohling S., Dunn I.F., Schinzel A.C., Barbie D.A., Kim S.Y., et al. Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells. *Cell*. 2009; 137(5): 821–34. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.017
49. Luo J., Emanuele M.J., Li D., Creighton C.J., Schlabach M.R., Westbrook T.F., et al. A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell*. 2009; 137(5): 835–48. DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.006
50. Sunaga N., Shames D.S., Girard L., Peyton M., Larsen J.E., Imai H., et al. Knockdown of oncogenic KRAS in non-small cell lung cancers suppresses tumor growth and sensitizes tumor cells to targeted therapy. *Mol Cancer Ther*. 2011; 10(2): 336–46. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0750.
51. Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*. 2013; 1(1): 45–9. DOI: 10.1016/j.redox.2012.10.001
52. Kansanen E., Jyrkkänen H.-K., Levonen A.-L. Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52: 973–82. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.038
53. Taguchi K., Motohashi H., Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 2011; 16: 123–40.
54. Zenkov N.K., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Menshchikova E.B., Martinovich G.G., Kandalintseva N.V. Mazes of Nrf2 regulation. *Biokhimiya*. 2017; 82(5): 556–64. (in Russian)
55. Tong Y.H., Zhang B., Fan Y., Lin N.M. Keap1-Nrf2 pathway: A promising target towards lung cancer prevention and therapeutics. *Chronic Dis Transl Med*. 2015; 1(3): 175–86. DOI: 10.1016/j.cdtm.2015.09.002
56. DeNicola G.M., Karreth F.A., Humpton T.J., Gopinathan A., Wei C., Frese K., et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*. 2011; 475: 106–9. DOI: 10.1038/nature10189
57. Mitsuishi Y., Taguchi K., Kawatani Y., Shibata T., Nukiwa T., Aburatani H., et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*. 2012; 22: 66–79. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.05.016
58. Hanada N., Takahata T., Zhou Q., Ye X., Sun R., Itoh J., et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2012; 12: 66. DOI: 10.1186/1471-2407-12-66
59. Kerr E.M., Martins C.P. Metabolic rewiring in mutant Kras lung cancer. *FEBS J*. 2018; 285(1): 28–41. DOI: 10.1111/febs.14125
60. Sporn M.B., Liby K.T. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 564–71. DOI: 10.1038/nrc3278

Сведения об авторах:

Бородулин Владимир Борисович, доктор мед наук, проф., зав. каф. биохимии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России; e-mail: borodulinvb@mail.ru;

Лосев Олег Эдуардович, канд. мед. наук, докторант каф. биохимии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, e-mail: losev15@rambler.ru;

Русецкая Наталья Юрьевна, доктор биол. наук, доцент, доцент каф. биохимии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России; e-mail: rusetskayanu@yandex.ru;

Бобылева Елена Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. биохимии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Бородулин Ярослав Владимирович, аспирант каф. биохимии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России; e-mail: borodulinvb@mail.ru

МЕТОДИКА

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.613-003.7

Верлов Н.А.¹, Ланда С.Б.¹, Егоров В.В.¹, Эмануэль Ю.В.², Эмануэль В.Л.²

Уромодулин: связь олигомерных форм и функции

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1;

²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8

Введение. Уромодулин является основным белком присутствующим в моче в норме, его физиологическая роль очень разнообразна. Оценка его вклада в стабилизацию коллоида мочи в норме и при различных патологических состояниях требует детального исследования олигомерных форм, присутствующих в моче, их структуры и функций. **Цель работы** – изучение структурных особенностей олигомерных форм белка уромодулина в моче здоровых добровольцев и пациентов с подтвержденным уролитиазом и выявление связи структуры белка и его роли в стабилизации коллоида мочи.

Методика. Методом динамического рассеяния света, анализом треков наночастиц и измерением дзета-потенциала изучены биофизические свойства изоформ уромодулина (UM), присутствующего в нативной моче в виде олигомерных форм, из которых можно выделить 2 основные: UM(7) – глобулярная молекула массой 7MDa, характеризуется гидродинамическим радиусом $R_h=90-100$ нм и отрицательным поверхностным зарядом величиной $25 - 30$ мВ; UM(28) – массой 28MDa обладает палочкоподобной структурой с гидродинамическим радиусом $R_h=200-300$ нм и существенно меньшим по величине поверхностным зарядом $0 - -7$ мВ.

Результаты. В норме в моче UM(7) является доминантной формой, при этом вклад UM(28) либо отсутствует, либо незначителен. При уролитиазе доля UM(7) радикально уменьшается и вклад UM(28) становится основным. В модельных экспериментах показаны различия этих переходов в моче здоровых лиц и пациентов с уролитиазом в зависимости от величины pH и концентрации одновалентных катионов: натрия, калия и аммония.

Заключение. На основании полученных данных существенно расширено представление о саногенетической системе коллоидного гомеостаза мочеобразования и патогенезе кристаллогенеза. Аппроксимация выдвинутой концепции развития патологического кристаллогенеза в клиническую практику расширяют информативность превентивной диагностики уролитиаза.

Ключевые слова: Уромодулин; белок Тамма-Хорсфалла; динамическое рассеяние света; анализ треков наночастиц; дзета-потенциал; титрование; уролитиаз

Для цитирования: Верлов Н.А., Ланда С.Б., Егоров В.В., Эмануэль Ю.В., Эмануэль В.Л. Уромодулин: связь олигомерных форм и функции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 133-140.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.133-140

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Эмануэль В.Л., Верлов Н.А., Ланда С.Б.; сбор и обработка материала – Верлов Н.А., Ланда С.Б., Егоров В.В.; подготовка иллюстративного материала – Верлов Н.А., Ланда С.Б., Егоров В.В.; статистическая обработка – Эмануэль Ю.В.; написание текста – Эмануэль В.Л., Верлов Н.А., Ланда С.Б., Егоров В.В.; редактирование – Эмануэль В.Л., Верлов Н.А., Эмануэль Ю.В.

Для корреспонденции: Эмануэль Владимир Леонидович, e-mail: vladimirem1@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.06.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Verlov N.A.¹, Landa S.B.¹, Egorov V.V.¹, Emanuel Yu.V.², Emanuel V.L.²

Uromodulin: Relationship of protein oligomeric forms and functions

¹B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of the National Research Centre «Kurchatov Institute», Orlova Roshcha Microdistrict 1, Leningradskaya Oblast, Gatchina 188300, Russian Federation;

²I.P. Pavlov Saint Petersburg First State Medical University,

L'va Tolstogo Str. 6-8, Saint Petersburg 197022, Russia

Introduction. Uromodulin is the major protein, which is normally present in urine and plays multiple physiological roles. Evaluation of the uromodulin contribution to stabilization of urinary colloids in normal and various pathological conditions requires a comprehensive study of uromodulin oligomeric forms occurring in urine, their structure and functions.

The aim of this work was studying structural features of uromodulin oligomeric forms in the urine of healthy volunteers and patients with confirmed urolithiasis and identifying a relationship between the protein structure and role in stabilization of urinary colloids.

Methods. Dynamic light scattering (DLS), nanoparticle tracking analysis (NTA), and measurement of zeta potential were used to study biophysical properties of uromodulin (UM) isoforms. UM is present in native urine as oligomeric forms, including two major ones: i) UM (7), a 7MDa globular molecule characterized by a hydrodynamic radius $R_h = 90-100$ nm and a negative surface charge of 25-30 mV and ii) UM (28), a rod-like 28MDa molecule with a hydrodynamic radius of $R_h = 200-300$ nm and a significantly lower surface charge of 0 --7 mV.

Results. Normally, UM (7) is a dominant form in urine whereas the UM (28) contribution is either non-existent or minor. In urolithiasis, the proportion of UM (7) decreases drastically, and the contribution of UM (28) becomes primary. Model experiments showed differences between these transitions in the urine of healthy individuals and patients with urolithiasis depending on pH values and concentrations of monovalent cations, including sodium, potassium, and ammonium.

Conclusion. The study results considerably expanded the concept of the sanogenetic system of colloidal homeostasis in urine formation and the pathogenesis of crystallogenesis. Approximating the proposed concept of pathological crystallogenesis in clinical practice expands the informative value of preventive diagnosis of urolithiasis.

Keywords: uromodulin, Tamm-Horsfall protein, dynamic light scattering, nanoparticle tracking analysis, zeta potential, titration, urolithiasis

For citation: Verlov N.A., Landa S.B., Egorov V.V., Emanuel Yu V., Emanuel V. L. Uromodulin: the relationship of protein oligomeric forms and functions. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 133-140. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.133-140

Contribution: research concept and design – Emanuel V.L., Verlov N.A., Landa S.B.; collection and processing of material – Verlov N.A., Landa S.B., Egorov V.V.; preparation of illustrative material – Verlov N.A., Landa S.B., Egorov V.V.; statistical processing – Emanuel Yu.V.; text writing – Emanuel V.L., Verlov N.A., Landa S.B., Egorov V.V.; editing – Emanuel V.L., Verlov N.A., Emanuel Yu.V.

For correspondence: Emanuel V.L., Doctor of Medical Sciences, Professor, head Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a course of molecular medicine, Director of the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation basis on Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, e-mail: vladimirem1@gmail.com

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Information about the authors:

Verlov N.A., <https://orcid.org/0000-0002-3756-0701>

Landa S.B., <https://orcid.org/0000-0001-5546-250X>

Egorov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3670-8962>

Emanuel V. L., <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>

Received 13.06.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Уромодулин, ранее позиционируемый как «белок Тамма-Хорсфалла» (UM), представляет собой гликопротеин открытый I. Tamm и F.L. Horsfall в 1950 г. [1]. UM – специфичный почечный белок массой 95 кDa, кодируемый геном UMOD, расположенным в хромосоме 16p12.3 [2], является мажорным белком, выделяемым с мочой в объеме от 20 до 100 мг в норме [3]. Уникальный «протеом мочеобразования» синтезируется исключительно в эпителиальных клетках, выстилающих дистальные каналцы толстого сегмента восходящего колена петли Генле (TAL). Предполагается, что UM играет существенную роль в ре-

гуляции водно-электролитного баланса и широкого диапазона физико-химических условий мочеобразования [8, 9]. Формирование посттрансляционных изоформ белка проявляется способностью к патологическому гелеобразованию [10], снижению местного иммунитета и, следовательно, к развитию инфекции мочевыводящих путей [11, 12]. Нарушения апикальной мембраны почечного канальца с развитием уромодулинемии индуцирует интерстициальное воспаление, приводящее к прогрессирующему фиброзу, следовательно развитию хронической болезни почек [13].

Методика

В работе использован биоматериал (моча) пациентов, наблюдавшихся в урологическом отделении клиники ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург). Были получены информированные согласия пациента и одобрение локального этического комитета. Верификация диагноза проводилась на основании комплекса клинических признаков и данных инструментального обследования. Критерием включения являлась верификация методом ИК-спектроскопией (Фурье-спектрометр ALPHA, «Bruker Optik GmbH», Германия) преимущественно оксалатных конкрементов, отделяемых и/или удаленных при хирургическом пособии или дистанционной литотрипсии. Гендерное распределение в группе больных составило: мужчин – 45 (45%), женщин – 55 (55%). Средний возраст больных составил $46,5 \pm 1,8$ лет, возраст при возникновении заболевания – $39,9 \pm 1,4$ лет, продолжительность заболевания – $6,6 \pm 3,9$ лет. Контрольная группа была сформирована из 40 практически здоровых добровольцев: 22 женщины в возрасте от 19 до 47 лет и 18 мужчин в возрасте от 18 до 44 лет.

Выделение ТНР из мочи. Для выделения УМ из биологического материала использован метод высаливания $0.6M NaCl$ [1]. Качество очистки контролировали методом денатурирующего электрофореза в ПААГ.

Метод динамического рассеяния света. Метод динамического рассеяния света (DLS) основан на взаимодействии монохроматического когерентного излучения со светорассеивающими частицами исследуемой жидкости. Информация о всех динамических процессах в изучаемой системе содержится в спектре флуктуаций света, рассеянного на частицах в растворе. Использована гетерогенная схема, при которой на фотоприемнике совмещаются фронты 2 лучей (рассеянного и опорного). В качестве опорного пучка использовалось лазерное излучение под углом 90° , которым облучается исследуемая система [14, 15]. Результат измерений представляется в виде гистограммы распределения частиц по размерам, в которой ось абсцисс – шкала размеров в нанометрах, ось ординат – вклад в общее рассеяние образца частиц данного размера в процентах. При этом суммарное рассеяние всех частиц образца принимается за 100%. Для каждого образца измерения проводили не менее 5 раз; данные, полученные в результате регуляризации, усредняли.

Метод анализа траекторий наночастиц (NTA). Метод анализа траекторий наночастиц (NTA; NanoSight® LM10, Malvern Instruments, Великобритания: синий ла-

зер ($45 mW$ при $488 nm$) и камера C11440-5B (Hamamatsu photonics K. K., Япония) использован для измерения гидродинамического диаметра и концентрации частиц УМ. Суспензию, приготовленную посредством разведения исходного образца в PBS, пропускали через проточную кювету NanoSight®. Для записи и анализа полученных результатов использовалось программное обеспечение NTA 2.3. При анализе записей длительностью 30-60 с оценивались следующие параметры: средний гидродинамический диаметр, мода распределения, стандартное отклонение и концентрация суспензии.

Титрование pH и концентрации одновалентных ионов. Для выяснения влияния pH и концентрации одновалентных катионов на олигомерные формы УМ готовили универсальный буфер из смеси уксусной фосфорной и борной кислот в эквимолярном соотношении по $40 mM$ каждая [16]. До нужного pH смесь доводится $200 mM NaOH$. В выбранном диапазоне pH ионная сила (IF) буферного раствора колебалась от $123 mM$ для pH -2.56 до $136 mM$ для pH -9.91 . Для получения необходимой ионной силы раствор буфера либо разбавляли дистиллированной водой, до нужной концентрации, либо доводили до нужной концентрации $1M$ или $3M$ раствором $NaCl$. Аликвоты белка, выделенного и очищенного как описано выше, разбавлялись буфером в соотношении $1:1000$ и помещались в кювету лазерного корреляционного спектрометра «ЛКС-03» (Сертификат Госстандарта Ru.C39.022A № 17157) для измерения размеров частиц. Измерения проводили в полосе $2048 Гц$. По результатам измерений вычисляли среднее значение, дисперсию и стандартное отклонение размера частиц и их вклада в рассеяние для каждого пика гистограммы распределения частиц по размерам. Для формы УМ(7) ($R_h = 100 nm$) строили кривые зависимости вклада в рассеяние от pH раствора для каждой ионной силы отдельно. Были получены семейства таких кривых для нормального УМ, УМ больных МКБ очищенного с помощью диализа, и УМ который не удалось очистить диализом.

Для выяснения различий в действии одновалентных катионов буферные растворы готовили также, только $NaOH$ заменяли на KOH или водный раствор аммиака, а $NaCl$ на KCl или NH_4Cl . После этого к растворам добавляли водный раствор УМ в соотношении $1:1000$.

Метод атомно-силовой микроскопии. Для атомно-силовой микроскопии использовали сканирующий зондовый микроскоп Solver-Bio (NT-MDT, Россия). Раствор образца в концентрации $1 mg/ml$ наносили на поверхность слюды (сразу после расщепления, freshly-cleaved mica) инкубировали в течение $60 c$ и отмывали

три раза 50 мкл деионизованной воды при помощи сэмплера. Высушивали образец при помощи сжатого воздуха, затем проводили сканирование образца в полуконтактном режиме с использованием зонда NSG03 (NT-MDT, Россия). Для обработки изображений использовали программу NT-MDT Image Analysis.

Результаты и обсуждение

В настоящее время принято считать, что форма UM(7) характерна для нормы, в то время как UM(28) характерна для пациентов с уролитиазом¹. Различия во фракционном составе олигомерных форм UM подтверждаются диффузометрическими методами, динамическим рассеянием света (рис. 1) и NTA (рис. 2). Для образцов мочи полученных от здоровых добровольцев характерен пик в области 90-100 нм ($R_h = 100$ нм), характерный для олигомерной формы UM(7). Для образцов, полученных от пациентов с МКБ, характерен пик в области 200 нм и более, данный пик соответствует UM(28), при этом происходит сдвиг первого пика в область меньших размеров (60-70 нм).

Данные, полученные методом NTA, частично подтверждают результаты корреляционной спектроскопии (рис. 2). В образцах от здоровых добровольцев, медиана распределения составляет 126 ± 6 нм, мода – 112 ± 5 нм. Существенные отличия наблюдаются при МКБ: распределение имеет более пологий вид, медиана составляет 296 ± 28 нм, мода – 260 ± 23 нм, т.е. характерен пик с размером, соответствующим UM(28).

Данные о различиях форм UM(7) и UM(28) получены на основании данных атомносиловой микроскопии (рис. 3). Для UM(7) характерна глобулярная структура представляющая из себя стохастический клубок, а UM(28) представляет собой палочкоподобную структуру с большим соотношением длины к толщине (>40). Результаты микроскопии подтверждают данные, полученные диффузометрическими методами, относительно размеров олигомерных форм.

Зависимость соотношения олигомерных форм UM от физико-химических свойств раствора. Тот факт, что форма UM(28) образуется в растворах с высокой ионной силой отмечался еще в работах Максфилда [17]. Нами впервые изучена динамика перехода формы UM(7) в UM(28) при изменении ионной силы окружающего раствора и pH. На рис. 4 представлена динамика содержания UM(7) по величине убыли вклада в светорассеяние этой формы, имеющий характерный R_h порядка 100 нм [18]. Аликвоты образцов были помещены в раствор NaCl различных концентраций: 0

М, 005 М, 015 М, 0.25 М, 0.35 М, 0.45 М и 0.6 М при pH 7. Последняя концентрация гарантировано приводит к массовому образованию тетрамерной формы UM(28), так как именно данная концентрация NaCl используется для выделения UM из мочи. На рис. 5 представлена зависимость уменьшения вклада олигомерной формы UM(7) в светорассеяние от концентрации натрия, калия и аммония в растворе при pH = 6, содержащем образцы UM из мочи здорового человека (А) и больных МКБ, у которых удалось отделить UM от кристаллов солей – UM(28)F (Б) и у которых БТХ

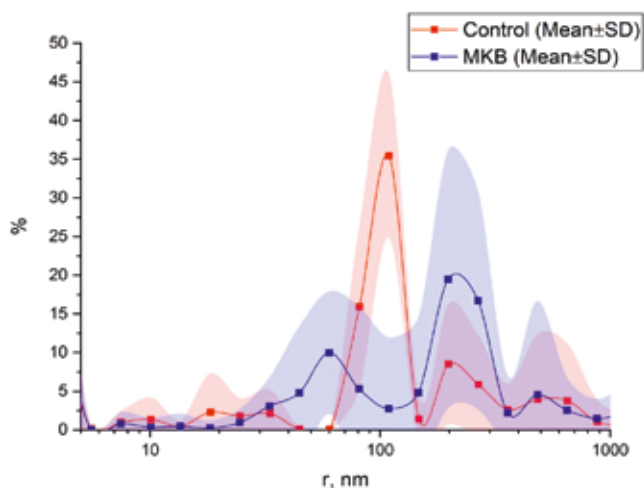


Рис. 1. Распределение размеров частиц в моче в норме и при патологии (метод динамического рассеяния света). Красная кривая – образцы, полученные от здоровых добровольцев (среднее±СКО). Синяя кривая – образцы, полученные от пациентов с МКБ (среднее±СКО).

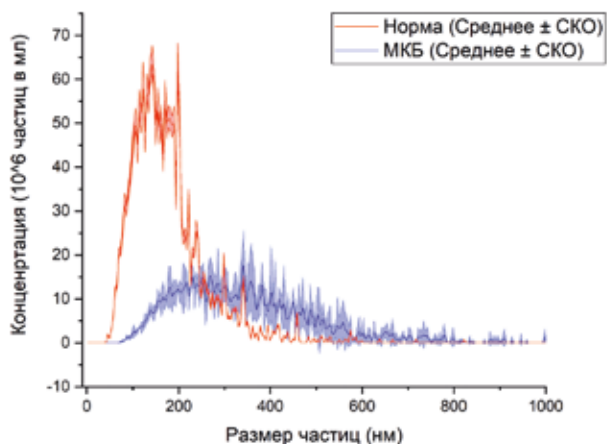


Рис. 2. Распределение размеров частиц в моче в норме и при патологии (анализ треков наночастиц). Красная кривая – образцы, полученные от здоровых добровольцев (среднее±СКО). Синяя кривая – образцы, полученные от пациентов с МКБ (среднее±СКО).

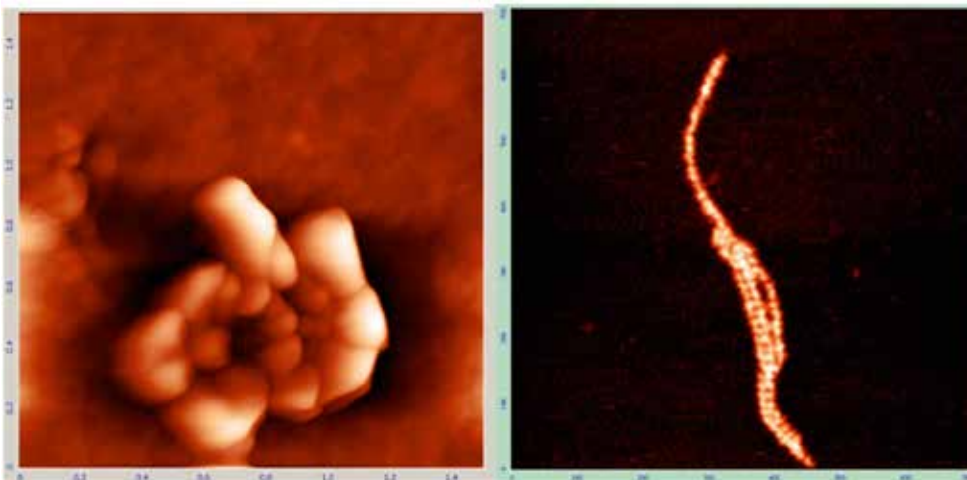


Рис. 3. Атомно-силовое изображение глобулярной структуры UM(7) (слева) и палочкоподобной структуры UM(28) (справа).

так и остался связанным с кристаллами солей UM(28) А (В). Следует отметить, что половые различия в олигомеризации UM отсутствуют, поэтому данные для мужчин и женщин отдельно не приводятся.

Исходное количество олигомерной формы UM(7) у здоровых людей всегда близко к 100 % (рис. 5, а). Кривая имеет вид типичной «пороговой кривой» с точкой перегиба при концентрации 250 мМ для натрия и аммония и 150 мМ для калия. До этой концентрации образование формы UM(28) идет медленно, а при достижении порога концентрации резко ускоряется. Уровень в 10% достигается при концентрации равной 580 мМ для натрия, 545 мМ для аммония и 450 мМ для калия. Для натрия точка

перегиба близка к физиологическому верхнему референтному интервалу концентрации этого катиона в моче (220 мМ). Для калия точка перегиба наступает при 150 мМ и еще больший запас имеется по аммонiu.

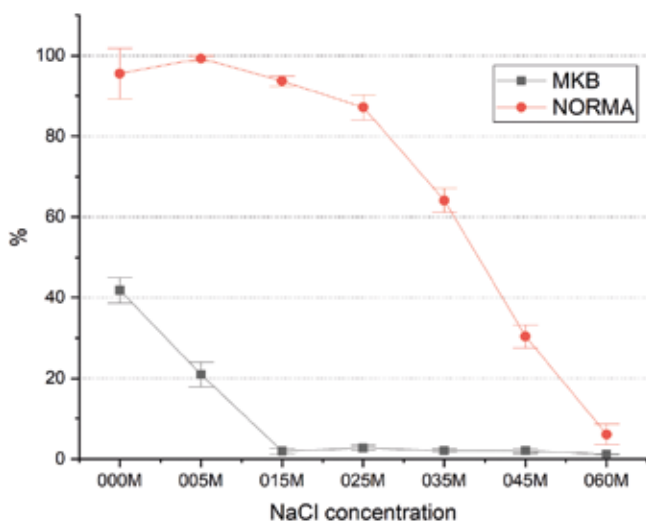


Рис. 4. Динамика содержания UM(7) при различных концентрациях NaCl в норме (красная, а) и при МКБ (черная, б). Среднее ± СКО.

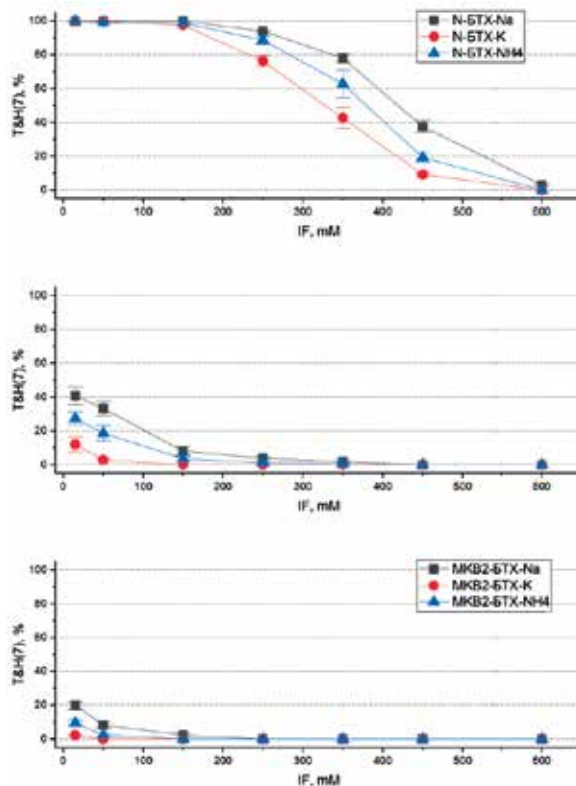


Рис. 5. Титрование растворов белка (ионная сила, IF) в норме и при патологии. а – UM в норме; б – UM при МКБ1; в – UM при МКБ2.

У больных МКБ, т.е. при преобладании формы UM(28)F (рис. 5, б) сказать что-нибудь о пороге образования формы UM(28) невозможно, так как уже при 15 мМ концентрации натрия в образце остается менее 50 % формы UM(7). 10ти % уровень формы UM(7) достигается при концентрации соли 140 мМ для натрия и 105 мМ для аммония. В среде калия количество формы UM(7) не превышает 12% даже при 15 мМ. В тоже время наклон обеих кривых в «беспороговой» части одинаков.

Еще сильнее эта тенденция выражена в группе МКБ2, т.е. при преобладании формы UM(28)A (рис. 5, в). В натриевой среде 10ти% уровень формы UM(7) наблюдается при 40 мМ, в среде аммония при 15 мМ, а в среде калия даже при 15 мМ вклад формы UM(7) составляет не более 2%.

Переход из формы UM(7) в форму UM(28) происходит и при увеличении кислотности раствора (рис. 6). Для нормального UM кривые зависимости количества формы UM(7) от pH также как и в случае с одновалентными катионами носят ярко выраженный пороговый характер. Особенно ярко это проявляется, когда концентрация соли в растворе не превышает физиологического диапазона (250 мМ Na). В этом случае резкое уменьшение содер-

жания формы UM(7) происходит при pH менее 4, то есть вблизи изоэлектрической точки нормального UM. 10ти% предел достигается при pH 3.5 – 4.0. При увеличении концентрации соли выше физиологического предела точка перегиба смещается сначала в область pH = 6, а затем и в область щелочных pH: при концентрации Na 450 мМ точка перегиба находится при pH = 8, а при 600 мМ NaCl кривая становится беспороговой. При этом, 10-процентный предел при концентрации соли 450 мМ достигается при pH = 4.5, а при 600 мМ NaCl при pH = 7.

При преобладании формы UM(28)F (рис. 6, б) кривая становится беспороговой уже при концентрации NaCl равной 150 мМ. При более низкой концентрации соли порог наблюдается в диапазоне pH 8.0 – 8.7. 10ти% предел при этих концентрациях соли достигается при pH близкой к 5. При концентрации соли 150 мМ 10-процентный предел наблюдается при pH = 6.2, а вблизи физиологического предела при pH близким к 7. При дальнейшем увеличении концентрации соли 10-процентный предел достигается при все более щелочных pH. При концентрации NaCl 450 мМ 10-процентный предел достигается при pH = 8.7, а при 600 мМ NaCl – при pH 10.

При преобладании формы UM(28)A (рис. 6, в) пороговая кривая наблюдается только при концентрации соли 15 мМ. При этом точка перегиба находится при pH = 9.5, а 10-процентный предел достигается при pH = 6.5. Уже при концентрации соли 50 мМ кривая становится беспороговой, 10-процентный предел при этом достигается при pH 7.1. При концентрации соли вблизи физиологического предела – 250 мМ 10-процентный предел достигается при pH 9.4.

Для исследования превращения олигомерной формы UM(7) в форму UM(28) в норме и при патологии, в т.ч. в широком диапазоне физико-химических свойств мочи, применяли измерения в буферных растворах с различной ионной силой (IF) и pH.

Роль олигомерных форм уромулина в стабилизации мочи. При измерении дзета-потенциала UM исходный раствор белка титровался до требуемой для измерения концентрации натрий фосфатным буфером (PBS). При измерении pH образца составлял 7.4, т.е. на 2 и более порядка превосходит по концентрации ионов водорода величину изоэлектрической точки десиалированной формы UM ($I_p=4-5$) и на 3 порядка и более величину изоэлектрической точки сиалированной формы UM ($I_p=3.2-4.3$) [19]. При измерении образцов, полученных от здоровых добровольцев, наблюдался один пик в области -25 – -30 мВ (рис. 7). В сравнении с данными по распределению размеров, полученных методом корреляционной спектроскопии (рис. 1), можно сделать вывод, что данный пик соответствует олигомерной форме

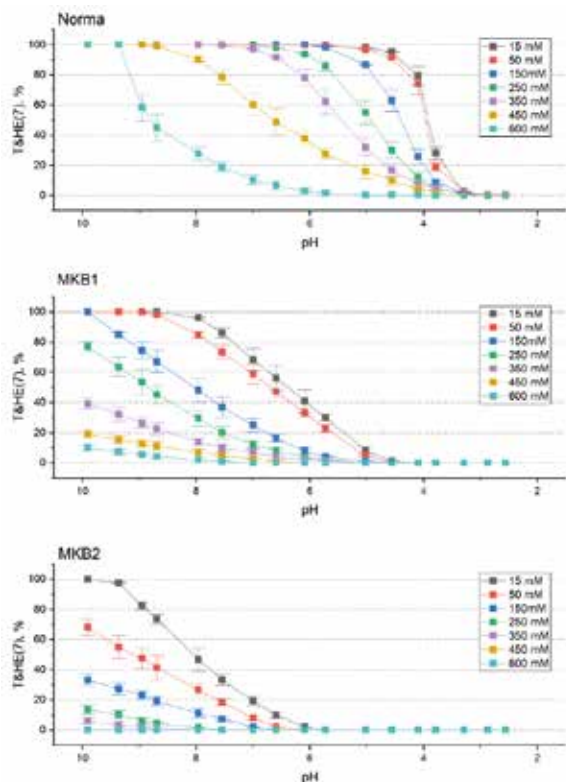


Рис. 6. Титрование растворов белка (pH) в норме и при патологии. а – UM в норме; б – UM при МКБ; в – UM при МКБ2.

UM(7). Полученные результаты хорошо согласуются с концепцией, в соответствии с которой UM(7) – глобулярная олигомерная форма с большим отрицательным зарядом на поверхности молекулы, что обуславливает её вклад в стабилизацию коллоида мочи. При измерении образцов, полученных от пациентов с МКБ, наблюдалось двухмодовое распределение с пиком в области -25 – -35 мВ и вторым пиком в области 0 – 7 мВ (рис. 7). В сравнении с данными о распределении размеров можно сделать вывод о том, что более электроотрицательный пик соответствует форме UM(7), в то время как менее электроотрицательный пик можно отнести к UM(28).

Глобулярная структура UM(7) за счёт достаточной величины поверхностного заряда позволяет стабилизировать биофизические свойства концентрированной мочи. Преимущественный механизм стабилизации коллоида – связывание органических и неорганических ионов вблизи отрицательно заряженных глобул белка. Как было показано ранее при увеличении концентрации NaCl свыше 0.6 М наблюдается агрегация UM(7) и образование формы UM(28). UM(28), в отличие от формы UM(7), имеет не глобулярную, а палочкоподобную структуру (рис. 3). За счёт частичного десалирования, экранирования поверхностного заряда, а также изменённого форм-фактора UM(28) обладает существенно меньшим, чем UM(7) поверхностным зарядом. Ввиду меньшего поверхностного заряда роль олигомерной формы UM(28) в стабилизации насыщенного раствора за счёт собственной электроотрицательности незначительна. Однако, за счёт существенно большего гидродинамического радиуса, обусловленного не только увеличением массы, но и изменившимся форм-фактором, UM(28) увеличивает характеристическую вязкость раствора, замедляя рост уже сформировавшихся микрокристаллов и формирование из них крупных и трудно выводимых конкрементов. Можно предположить, что ингибирование роста уже образовавшихся микрокристаллов позволяет избежать патологических проявлений и манифестации МКБ, за счёт удаления конкрементов малого размера в процессе мочеиспускания.

Таким образом, на основании полученных данных можно утверждать, что в нативной моче в норме наблюдается разнообразие олигомерных форм UM, однако преимущественно представлена фракция UM(7), для пациентов с МКБ увеличивается вклад UM(28). UM(7) и UM(28) отличаются по гидродинамическому радиусу, форм фактору и поверхностному заряду, как следствие, механизм стабилизации коллоида мочи для каждой из олигомерных форм различен. Как в норме, так и при патологии соотношение UM(7) и UM(28) зависит от свойств раствора, таких как концентрация од-

новалентных ионов и pH. С увеличением ионной силы и при понижении pH происходит переход из UM(7) в UM(28). Для пациентов с МКБ характерен больший исходный вклад UM(28) и более выраженная динамика увеличения этого вклада при увеличении IF и pH.

Заключение

Распространенное мнение о том, что форма UM(28) не характерна для нормы, а присутствует исключительно в моче пациентов с МКБ, вряд ли, соответствует реальности. В норме, в ряде случаев могут возникнуть условия (например, высокая концентрация солей, обезвоживание) при которых в моче можно наблюдать UM(28) у здоровых людей. Трансформация олигомерных форм из 7 в 28 МДа, их соотношение в моче отражают функциональную адаптацию процесса мочеобразования физико-химическому составу мочи в конкретный момент времени. Поэтому у здоровых лиц в условиях высокой концентрации солей в моче при выраженной дегидратации, например, можно наблюдать UM(28), верифицируемую в «общем анализе мочи» как гиалиновые цилиндры. Снижение емкости коллоидной системы мочеобразования инициирует первичный кристалогенез в моче, т.е. формирование центра кристаллизации. Состав почечных конкрементов, формируемых на базе этого центра кристаллизации, определяется физико-химическим составом мочи, уровнем компонентов, обуславливающих их пересыщенную концентрацию. Уникальность UM заключается в том, что в широком диапазоне концентраций солей в моче наблюдаются 2 принципиально различных механизма стабилизации коллоида. В области низких концентраций одновалентных катионов стабильность коллоида обеспечивается за счёт выражен-

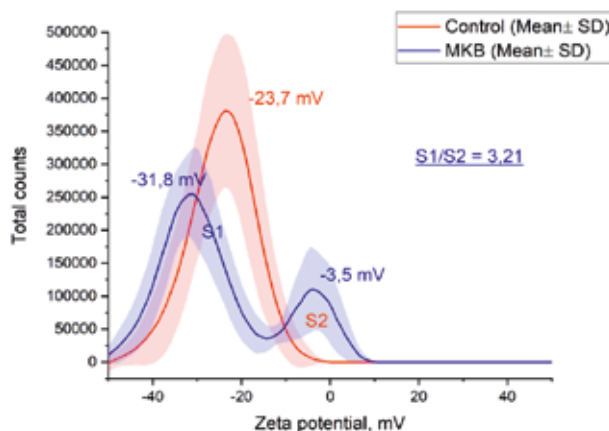


Рис. 7. Зета-потенциал UM в норме и при патологии (соотношение заряда олигомерных форм UM(7) и UM(28)).

ных электроотрицательных свойств олигомерной формы УМ(7). При больших значениях величины ионной силы, когда электроотрицательная форма УМ не способна полностью ингибировать образование центров первичной кристаллизации в коллоиде мочи, активируется иной механизм, при котором УМ(28) частично ингибирует рост образовавшихся микрокристаллов за счёт увеличения вязкости коллоида. Вклад УМ(28) в вязкость коллоида мочи можно оценить по величине характеристической вязкости $[\eta]$. В рассматриваемом случае вязкость определяется не столько общей длиной цепи, зависящей от молекулярной массы олигомера, сколько эффективной длиной цепи в растворе. Только в случае предельно вытянутой цепи ее длина и молекулярный вес пропорциональны друг другу. Определение характеристической вязкости рассчитывается по формуле: $[\eta] = K \times M^\alpha$, где K – коэффициент, постоянный для растворов данного полимергомологического ряда в одном и том же растворителе, α – величина, характеризующая форм-фактор макромолекулы в растворе, зависящей от гибкости цепей и изменяется от 0,5 до 2. Следовательно, прирост характеристической вязкости коллоида мочи при образовании тетраполимера УМ(28) приводит к увеличению молекулярной массы в 4 раза, а изменение коэффициента α с 1 на 2 (1 для глобулярной формы УМ(7), 2 для палочкоподобной формы УМ(28)), увеличивает вязкость в 16 раз. Такой расчёт косвенно подтверждает физиологическое значение наблюдаемых превращений олигомерных форм УМ (7МДа–28МДа) в растворах с высокой концентрацией солей.

Литература

(п.п. 1-14; 17-19 см. References)

15. Ланда С.Б., Филатов М.В., Арутюнян А.В., Варфоломеева Е.В. Исследование образования мегамолекулярных комплексов в плазме крови методом лазерной корреляционной спектроскопии. *Клин. лаб. диагн.* 2008; (4): 37–41.
16. Лурье Ю.Ю. *Справочник по аналитической химии*. М.: Химия; 1989.

References

1. Tamm I., Horsfall F.L. A mucoprotein derived from human urine which reacts with influenza, mumps, and Newcastle disease viruses. *J. Exp. Med.* 1952; 95(1): 71–97.

Сведения об авторах:

Верлов Николай Александрович, канд. биол. наук, зав. Ресурсным центром ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, e-mail: verlov_na@npri.nrcki.ru;

Ланда Сергей Борисович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ;

Егоров Владимир Валерьевич, доктор. биол. наук, ст. науч. сотр. ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ;

Эмануэль Юлия Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотр. каф. клинической лабораторной диагностики ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова;

Эмануэль Владимир Леонидович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. клинической лабораторной диагностики ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

2. Rindler M.J., et al. Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein/ uromucoid) is a phosphatidylinositol-linked membrane protein. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(34): 20784–9.
3. Nagaraj N., Mann M. Quantitative analysis of the intra- and inter-individual variability of the normal urinary proteome. *J. Proteome Res.* 2011; 10(2): 637–45.
4. Devuyt O., Dahan K., Pirson Y. Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20(7): 1290–4.
5. Serafini-Cessi F., Malagolini N., Cavallone D. Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *Am. J. Kidney Dis.* 2003; 42(4): 658–76.
6. Pruijm M. et al. Associations of Urinary Uromodulin with Clinical Characteristics and Markers of Tubular Function in the General Population. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 11(1): 70–80.
7. Leihner A., et al. Serum uromodulin is associated with impaired glucose metabolism. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96 (5): e5798.
8. Wiggins R.C. Uromucoid (Tamm-Horsfall glycoprotein) forms different polymeric arrangements on a filter surface under different physicochemical conditions. *Clin. Chim. Acta.* 1987; 162(3): 329–40.
9. Renigunta A., et al. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(3): 2224–35.
10. Yoshimura K., et al. Investigation of the Possible Role of Sialic Acid in Calcium Oxalate Urolithiasis. *Eur. Urol.* 1998; 33(1): 111–5.
11. Patras K.A., et al. Tamm-Horsfall glycoprotein engages human Siglec-9 to modulate neutrophil activation in the urinary tract. *Immunol. Cell Biol.* 2017; 95(10): 960–5.
12. El-Achkar T.M., et al. Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2008; 295(2): 534–44.
13. Garimella P.S., et al. Urinary uromodulin, kidney function, and cardiovascular disease in elderly adults. *Kidney Int.* 2015; 88(5): 1126–34.
14. Lebedev A.D., et al. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl. Opt.* 1997; 36(30): 7518–22.
15. Landa S.B., et al. Study of plasma megamolecular complexation by laser correlation spectroscopy. *Klin. Lab. Diagn.* 2008; (4): 37–41.
16. Lur'e Yu.Yu. *Handbook of analytical chemistry. [Spravochnik po analiticheskoy khimii]*. Moscow: Khimiya; 1989. (in Russian)
17. Maxfield M. Fractionation of the urinary mucoprotein of Tamm and Horsfall. *Arch. Biochem.* 1960; 89: 281.
18. Oliver C.J., Pikk R.R., Cleave A.J., Peacocke A.R. Determination of the Diffusion Coefficient and Molecular Weight of Tamm-Horsfall Glycoprotein by Intensity Fluctuation Spectroscopy. *Biopolymers.* 2000; 10; 1971(9): 1731–3.
19. Viswanathan P., et al. Calcium oxalate monohydrate aggregation induced by aggregation of desialylated Tamm-Horsfall protein. *Urol. Res.* 2011; 39(4): 269–82.