

**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 13.11.2020  
Подписано к печати 23.11.2020  
Опубликовано 26.11.2020

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

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и экспер. тер.  
2020. Том 64. № 4. 1–152

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

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2020.



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

# ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

Том 64 № 4 · 2020

Октябрь–Декабрь

**Главный редактор:**

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

**Заместители главного редактора:**

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

**Ответственный секретарь:**

Н.С. Гурко, *к.м.н., НИИОПП, Москва*

**Редакционная коллегия:**

Ю.В. Архипенко, *д.б.н., проф., МГУ, Москва*  
Е.И. Асташкин, *д.б.н., проф., Первый МГМУ, Москва*  
С.В. Грачев, *акад. РАН, д.м.н., проф., Первый МГМУ, Москва*  
Т.А. Гуськова, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ЯГПУ, Ярославль*  
Г. Дауни, *д.б.н., проф., Университет Северного Техаса, Форт-Уэрт, Техас, США*  
А.В. Ефремов, *д.м.н., проф., НГМУ, Новосибирск*  
В.Б. Кошелев, *д.б.н., проф., МГУ, Москва*  
Н.А. Крупина, *д.б.н., НИИОПП, Москва*  
А.А. Кубатиев, *акад. РАН, д.м.н., проф., НИИОПП, Москва*  
П.Ф. Литвицкий, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., Первый МГМУ, Москва*  
Р. Маллет, *д.м.н., проф., Университет Северного Техаса, Форт-Уэрт, Техас, США*  
О. Мацуо, *д.б.н., проф., Университет Киндай, Хигасиосака, Япония*  
В.В. Новицкий, *акад. РАН, д.м.н., проф., СибГМУ, Томск*  
Г.В. Порядин, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., РНИМУ, Москва*  
Р. Сьюелл, *д.б.н., проф., Университет Кардиффа, Кардифф, Великобритания*

**Редакционный совет:**

Ю.В. Балякин, *д.м.н., проф., РНИМУ, Москва*  
Ю.Ю. Бяловский, *д.м.н., проф., РязГМУ, Рязань*  
В.Т. Долгих, *д.м.н., проф., ОГМУ, Омск*  
А.М. Дыгай, *акад. РАН, д.м.н., проф., Томский НИМЦ РАН, Томск*  
Д.А. Еникеев, *д.м.н., проф., БГМУ, Уфа*  
В.П. Куликов, *д.м.н., проф., АМИЦДО, Барнаул*  
В.П. Михайлов, *д.м.н., проф., ЯГМУ, Ярославль*  
В.Г. Овсянников, *д.м.н., проф., РостГМУ, Ростов-на-Дону*  
С.Н. Орлов, *д.б.н., проф., МГУ, Москва*  
Н.Н. Петрищев, *д.м.н., проф., ПСПбГМУ, Санкт-Петербург*  
Л.А. Северьянова, *д.м.н., проф., КГМУ, Курск*  
В. Шварц, *д.м.н., проф., Саарский Университет, Хомбург/Саар, Германия*  
А.П. Ястребов, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., УГМУ, Екатеринбург*

**Mailing address:**

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

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

**Home page:** www.pfiet.ru

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

**Publisher:** Dmitry Irishkin

**E-mail:** genius-media@mail.ru

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

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

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

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

Sent into set on 13.11.2020  
Signed for publication on 23.11.2020  
Published on 26.11.2020

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

**ISSN** 0031-2991

Pat Fiziol Eksp Ter  
2020. Volume 64. No 4. 1-152

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

© IE Irishkin Dmitry Andreevich, 2020.

ISSN 0031-2991



Russian Academy of Sciences

Russian Society of Pathophysiologists

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

# PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

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

Vol. 64 № 4 · 2020  
October–December

**Editor in chief:**

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

**Assistant editors in chief:**

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

**Executive editor:**

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

**Editorial Board:**

Yu.V. Archipenko, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*  
E.I. Astashkin, *DSc, Prof., First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*  
H. Downey, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*  
S.V. Grachev, *Acad. RAS, DSc, Prof., First Mos. State Med. University, Moscow, Russia*  
T.A. Guskova, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Inst. of Immunology, Moscow, Russia*  
A.V. Efremov, *DSc, Prof., Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*  
V.B. Koshelev, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*  
N.A. Krupina, *DSc, Inst. of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*  
A.A. Kubatiev, *Acad. RAS, DSc, Prof., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*  
P.F. Litvitskiy, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., Moscow State Med. Univ., Moscow, Russia*  
R. Mallet, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*  
O. Matsuo, *PhD, Prof., Kindai University, Higashiosaka, Japan*  
V.V. Novitskiy, *Acad. RAS, DSc, Prof., Siberian Medical State University, Tomsk, Russia*  
G.V. Poryadin, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., National Research Med. Univ., Mos., Russia*  
R. Sewell, *PhD, Prof., Cardiff University, Cardiff, UK*

**Advisory Committee**

Yu.V. Balyakin, *DSc, Prof., National Research Medical University, Moscow, Russia*  
Yu.Yu. Byalovskiy, *DSc, Prof., Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia*  
V.T. Dolgikh, *DSc, Prof., Omsk State Medical University, Omsk, Russia*  
A.M. Dygay, *Acad. RAS, DSc, Prof., Tomsk National Research Medical Center of RAS, Tomsk, Russia*  
D.A. Enikeev, *DSc, Prof., Bashkir State Medical University, Ufa, Russia*  
V.P. Kulikov, *DSc, Prof., Altai Medical Inst. of Postgraduate Education, Barnaul, Russia*  
V.P. Mikhailov, *DSc, Prof., Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia*  
V.G. Ovsyannikov, *DSc, Prof., Rostov State Med. University, Rostov-na-Donu, Russia*  
S.N. Orlov, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*  
N.N. Petrishchev, *DSc, Prof., First St.Petersburg State Med. Univ., St.Peterburg, Russia*  
L.A. Severyanova, *DSc, Prof., Kursk State Medical University, Kursk, Russia*  
V. Shvarz, *PhD, Prof., Saarland University, Homburg/Saar, Germany*  
A.P. Yastrebov, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia*

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Павленко Т.А., Кухарский М.С., Григорьев А.В., Стручкова С.В., Безнос О.В., Чеснокова Н.Б.** Экспериментальное обоснование возможности прогнозирования развития нейродегенеративных заболеваний, в основе патогенеза которых лежит нарушение функции гамма-синуклеина, подавление..... 5
- Борзенко С.А., Мушкова И.А., Шкандина Ю.В., Соболева М.А.** Изучение биосовместимости интракорнеальных линз в экспериментально-морфологическом исследовании *ex vivo*..... 12
- Богданов Л.А., Великанова Е.А., Шишкова Д.К., Шабаетв А.Р., Кутихин А.Г.** Ремоделирование неоинтимы при каротидном атеросклерозе: влияние матричных металлопротеиназ-2 и -9 и сосудистых гладкомышечных клеток различного фенотипа..... 20
- Гуляева И.Л., Булатова И.А., Пестренин Л.Д.** Роль васкулоэндотелиального фактора роста в патогенезе стеатоза печени и дислипидемии..... 31
- Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г.** Парадоксальная рефрактерность, возникающая при аллогенном переносе животным с аллоксановым диабетом суммарной РНК лимфоцитов селезенки вылеченных особей..... 37
- Гребенчиков О.А., Касаткина И.С., Кузовлев А.Н., Лобанов А.В., Ершов А.В.** Влияние хлорида лития на активацию нейтрофилов при развитии синдрома системного воспалительного ответа у пациентов после операций на сердце с использованием аппарата искусственного кровообращения..... 47
- Михайличенко М.И., Шаповалов К.Г., Мудров В.А., Фигурский С.А., Емельянов Р.С.** Патогенетическое значение дисфункции эндотелия в формировании гипертонуса периферической сосудистой стенки при местной холодовой травме..... 54
- Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Ахвердян Ю.Р., Шилова Л.Н., Заводовский Б.В.** Никотинамид фосфорибозилтрансфераза – провоспалительная молекула, характеризующая тяжесть течения ревматоидного артрита..... 62
- Труш В.В., Соболев В.И.** Эффективность α-липоевой кислоты в компенсации расстройств сократительной функции скелетной мышцы, вызванных длительным введением дексаметазона, в модельных экспериментах на животных..... 69
- Чурина Е.Г., Уразова О.И., Ситникова А.В., Новицкий В.В., Кононова Т.Е., Чумакова С.П., Патышева М.Р.** Дифференцировка моноцитов крови и особенности цитокинового статуса у больных туберкулезом легких..... 79

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Шубина Т.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А.** Влияние пептидов глипролинового ряда на уровень метаболитов оксида азота и активность тканевого активатора плазминогена у крыс в норме и при метаболическом синдроме..... 88
- Лупанова И.А., Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Мартынчик И.А., Колхир В.К., Трумпе Т.Е., Звездина Е.В.** Сравнительная оценка нейротропной активности экстрактов котловников кошачьего и крупноцветкового..... 95

## CONTENTS

### ORIGINAL ARTICLES

- Pavlenko T.A., Kukharsky M.S., Grigoryev A.V., Struchkova S.V., Beznos O.V., Chesnokova N.B.** Experimental justification for a possibility of predicting the development of neurodegenerative diseases associated with gamma-synuclein dysfunction..... 5
- Borzenok S.A., Mushkova I.A., Shkandina Yu.V., Soboleva M.A.** Biocompatibility of intracorneal lenses in an *ex vivo* experimental study..... 12
- Bogdanov L.A., Velikanova E.A., Shishkova D.K., Shabaev A.R., Kutikhin A.G.** Neointimal remodeling in carotid atherosclerosis: roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 and different phenotypes of vascular smooth muscle cells..... 20
- Gulyaeva I.L., Bulatova I.A., Pestrenin L.D.** Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of hepatic steatosis and dyslipidemia..... 31
- Gevorgyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G.** Paradoxical refractoriness developing with the allogeneic transfer of splenic lymphocyte total RNA from animals with treated alloxan diabetes to animals with untreated diabetes..... 37
- Grebentchikov O.A., Kasatkina I.S., Kuzovlev A.N., Lobanov A.V., Ershov A.V.** Influence of lithium chloride on neutrophil activation in the development of systemic inflammatory response syndrome in patients after on-pump cardiac surgery..... 47
- Mikhaylichenko M.I., Shapovalov K.G., Mudrov V.A., Figursky S.A., Emelianov R.S.** Pathogenetic significance of endothelial dysfunction in formation of vascular wall hypertonia in local cold trauma..... 54
- Polyakova Y.V., Seewordova L.E., Akhverdyan Y.R., Shilova L.N., Zavadovsky B.V.** Nicotinamid phosphoribosyltransferase is a proinflammatory molecule characterizing severity of rheumatoid arthritis..... 62
- Trush V.V., Sobolev V.I.** Efficacy of α-lipoic acid in correction of skeletal muscle contractile disorders caused by chronic dexamethasone treatment in animal model..... 69
- Churina E.G., Urazova O.I., Sitnikova A.V., Novitskiy V.V., Kononova T.E., Chumakova S.P., Patysheva M.R.** Differentiation of blood monocytes and features of the cytokine status in patients with lung tuberculosis..... 79

### BRIEF REPORTS

- Obergan T.Yu., Grigorjeva M.E., Lyapina L.A., Shubina T.A., Myasoedov N.F., Andreeva L.A.** The effect of glyproline peptides on levels of nitric oxide metabolites and tissue plasminogen activator activity in healthy rats and rats with metabolic syndrome..... 88
- Lupanova I.A., Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Martintchik I.A., Kolkhir V.K., Trumpe T.E., Zvezdina E.V.** Comparison studies of neurotropic activity of the nepeta cataria and nepeta grandiflora extracts..... 95

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

- Яковлева М.В., Червинец В.М., Червинец Ю.В., Смирнова Л.Е.**  
Микробиота кишечника и полости рта у больных артериальной гипертензией с метаболическим синдромом . . . 101

### ОБЗОРЫ

- Соловьева Н.В., Чаусова С.В., Кичук И.В., Макарова Е.В.** Влияние кальциевой сигнализации на развитие расстройств аутистического спектра . . . . . 106
- Иванов А.В., Вирюс Э.Д., Логинов В.И., Зимина И.С., Бурдён-ный А.М., Александрин В.В., Кубатиев А.А.** Метаболизм гомоцистеина на экспериментальных моделях гипергомоцистеинемии у грызунов. Часть 1: генетические модели 118
- Кытикова О.Ю., Новгородцева Т.П., Денисенко Ю.К., Антонюк М.В., Гвозденко Т.А.** Взаимоотношения толл-подобных рецепторов и ядерных транскрипционных факторов при бронхиальной астме . . . . . 125
- Тугузбаева Г.М., Павлов В.Н., Еникеев Д.А.** Анализ противоопухолевого эффекта эндостатина в отношении плоскоклеточного рака полости рта по результатам экспериментальных исследований . . . . . 134

### МЕТОДИКА

- Сазонова М.А., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Сазонова М.Д., Дорошук Н.А., Кириченко Т.В., Карагодин В.П., Орехов А.Н., Собенин И.А.** Создание цибридных клеточных культур, содержащих однонуклеотидную замену в гене *MT-TL2*, ассоциированную с атеросклерозом . . . . . 140
- Лунёва К.А., Клементьева О.Е., Терновская К.Э., Дубова Е.А., Лунёв А.С.** Опыт ксенотрансплантационного гетеротопического моделирования колоректального рака различных клеточных типов у бестимусных мышей линии BALB/c nude . 148

- Yakovleva M.V., Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Smirnova L.E.**  
Gut and oral microbiota in patients with arterial hypertension and metabolic syndrome

### REVIEWS

- Solov'eva N.V., Chausova S.V., Kichuk I.V. Makarova E.V.** The influence of calcium signaling on the development of autism spectrum disorders
- Ivanov A.V., Virus E.D., Loginov V.I., Zimina I.S., Burdenny A.M., Alexandrin V.V., Kubatiev A.A.** Homocysteine metabolism in rodent models with hyperhomocysteinemia. Part 1: genetic models
- Kytikova O.Yu., Novgorodtseva T.P., Denisenko Yu.K., Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A.** Relationship of toll-like receptors and nuclear transcription factors in asthma
- Tuguzbaeva G.M., Pavlov V.N., Enikeev D.A.** Analysis of the anti-cancer effect of endostatin on oral squamous cell carcinoma based on results of experimental studies

### METHOD

- Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Doroshuk N.A., Kirichenko T.V., Karagodin V.P., Orekhov A.N., Sobenin I.A.** Creation of cybrid cell cultures containing a single-nucleotide substitution associated with atherosclerosis in the *MT-TL2* gene
- Lunyova K.A., Klementyeva O.E., Ternovskaya K.E., Dubova E.A., Lunev A.S.** Xenograft heterotopic modeling of colorectal cancer of various cell types in athymic BALB/c nude mice

## Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Павленко Т.А.<sup>1</sup>, Кухарский М.С.<sup>2,3</sup>, Григорьев А.В.<sup>1</sup>, Стручкова С.В.<sup>1</sup>, Безнос О.В.<sup>1</sup>, Чеснокова Н.Б.<sup>1</sup>

# Экспериментальное обоснование возможности прогнозирования развития нейродегенеративных заболеваний, в основе патогенеза которых лежит нарушение функции гамма-синуклеина

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, Москва, Россия, Садовая-Черногрозская ул., д.14/19;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт физиологически активных веществ Российской академии наук», 142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, Россия, Северный проезд, д. 1;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1, стр. 9

Синуклеины – синаптические белки участвующие в процессе везикулярного транспорта и высвобождении медиаторов, в частности дофамина. Патологическая агрегация членов этого семейства ассоциирована с развитием ряда нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), а для  $\gamma$ -синуклеина показана также связь с развитием глаукомы. На данный момент не существует доступных диагностических методов, позволяющих выявлять группы риска развития НДЗ или других заболеваний, связанных с нарушением функции  $\gamma$ -синуклеина. Сложность разработки таких методов объясняется тем, что диагноз НДЗ ставится при появлении клинических признаков заболевания, когда процесс уже практически необратим.

**Цель исследования** — экспериментальное обоснование возможности прогнозирования нарушения функции  $\gamma$ -синуклеина по влиянию регуляторов адренергической и дофаминергической системы на уровень внутриглазного давления (ВГД).

**Методика.** На линии мышей с инактивированным геном, кодирующим  $\gamma$ -синуклеин ( $\gamma$ -КО), разработан способ диагностики нарушения функции данного белка, включающий определение внутриглазного давления (ВГД) до и после инстилляцией в конъюнктивальную полость регуляторов дофаминергической системы.

**Результаты.** У мышей  $\gamma$ -КО выявлено значительное снижение ВГД в ответ на инстилляцию Мелатонина 0,1%, Галоперидола 0,2%, и Дофамина 10% по сравнению с мышами дикого типа.

**Заключение.** Предложенный способ измерения ВГД после инстилляцией препаратов, влияющих на метаболизм дофамина, позволяет выявлять и прогнозировать развитие недостаточности функции  $\gamma$ -синуклеина и его влияние на регуляцию внутриглазного давления. Предлагаемый метод позволяет формировать группы риска для динамического наблюдения и выбора превентивных лечебных мероприятий.

**Ключевые слова:** нейродегенеративные заболевания;  $\gamma$ -синуклеинопатия; внутриглазное давление; регуляторы дофаминергической системы; нокаутные мыши.

**Для цитирования:** Павленко Т.А., Кухарский М.С., Григорьев А.В., Стручкова С.В., Безнос О.В., Чеснокова Н.Б. Экспериментальное обоснование возможности прогнозирования развития нейродегенеративных заболеваний, в основе патогенеза которых лежит нарушение функции гамма-синуклеина. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 5-11.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.5-11

**Для корреспонденции:** Павленко Татьяна Аркадьевна, e-mail: tanya1975\_@inbox.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн работы – Павленко Т.А., Чеснокова Н.Б., Кухарский М.С.; сбор данных – Павленко Т.А., Григорьев А.В., Кухарский М.С., Стручкова С.В.; моделирование мышей с инактивированным геном, кодирующим  $\gamma$ -синуклеин – Кухарский М.С.; анализ и интерпретация данных – Павленко Т.А., Стручкова С.В., Безнос О.В.; написание статьи – Павленко Т.А., Кухарский М.С.; редактирование статьи – Чеснокова Н.Б., Безнос О.В., Григорьев А.В. Утверждение окончательного варианта статьи – Павленко Т.А., Кухарский М.С., Григорьев А.В., Стручкова С.В., Безнос О.В., Чеснокова Н.Б.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России, 2020 г. № НИОКРТР АААА-А18-118031590063-5. Разведение и содержание животных было выполнено с использованием оборудования ЦКП ИФАВ РАН, при поддержке гранта РФФИ 19-14-00064.

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

Поступила 12.12.2019

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Pavlenko T.A.<sup>1</sup>, Kukharsky M.S.<sup>2,3</sup>, Grigoryev A.V.<sup>1</sup>, Struchkova S.V.<sup>1</sup>, Beznos O.V.<sup>1</sup>, Chesnokova N.B.<sup>1</sup>

## Experimental justification for a possibility of predicting the development of neurodegenerative diseases associated with gamma-synuclein dysfunction by the influence of dopaminergic system on intraocular pressure

<sup>1</sup>Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases,  
Sadovaya-Chernogryazskaya Str. 14/19, Moscow, 105062, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences,  
Severnoy Proezd 1, Chernogolovka, 142432, Russia;

<sup>3</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University,  
Ostrovityanova Str. 1, Moscow, 117997, Russia

Synucleins are a family of synaptic proteins involved in vesicular transport and release of neurotransmitters, particularly dopamine. Pathological aggregation of these proteins is associated with development of several neurodegenerative diseases (NDD), and gamma-synuclein was shown to be related with glaucoma. At present, there are no available diagnostic methods for identifying groups at risk of NDD or other diseases related with  $\gamma$ -synuclein dysfunction by the effect of adrenergic and dopaminergic regulators on intraocular pressure (IOP). A difficulty in developing such methods is that NDDs are diagnosed by clinical symptoms when the process is already practically irreversible.

**The aim** of this study was experimental justification of a possibility for predicting the  $\gamma$ -synuclein dysfunction by the effect of adrenergic and dopaminergic regulators on IOP.

**Methods.** A strain of knockout mice with inactivated gamma-synuclein gene (gamma-KO) was used for developing a method for detection of  $\gamma$ -synuclein dysfunction. The method included measurement of IOP before and after instillation of drugs regulating the dopaminergic system activity.

**Results.** Gamma-KO mice showed a statistically significant decrease in IOP following the instillation of 0.1% Melatonin, 0.2% Haloperidol, or 10% Dopamine compared to the wild type control.

**Conclusion.** The suggested method allows detecting and predicting the development of  $\gamma$ -synuclein dysfunction and its influence on the IOP regulation and, thus, to identify groups of risk to be monitored and preventively treated.

**Keywords:** neurodegenerative diseases; gamma-synucleinopathy; intraocular pressure; dopaminergic system regulators; knockout mice

**For citation:** Pavlenko T.A., Kukharsky M.S., Grigoryev A.V., Struchkova S.V., Beznos O.V., Chesnokova N.B. Experimental justification for a possibility of predicting the development of neurodegenerative diseases associated with gamma-synuclein dysfunction by the influence of dopaminergic system on intraocular pressure. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2020; 64(4): 5-11. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.5-11

**For correspondence: Pavlenko T.A.,** e-mail: tanya1975\_@inbox.ru

**Contributions:** research concept and design – Pavlenko T.A., Chesnokova N.B., Kukharsky M.S.; maintenance and manipulations with the gamma-synuclein knock-out mice (gamma-KO) – Kukharsky M.S.; material collecting and processing – Pavlenko T.A., Grigoryev A.V., Kukharsky M.S., Struchkova S.V.; statistical processing – Pavlenko T.A., Struchkova S.V., Beznos O.V., text editing – Chesnokova N.B., Beznos O.V.; Approval of the final version of the article – Pavlenko T.A., Kukharsky M.S., Grigoryev A.V., Struchkova S.V., Beznos O.V., Chesnokova N.B.

**Acknowledgment.** The work was completed as part of the State Assignment of the Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2020 (Research and Technological Development project No. АААА-А18-118031590063-5). This work was supported by Russian Science Foundation (Grant 19-14-00064). The animal facilities and equipment of the «Centre for Collective Use of IPAC RAS» were used.

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

### Information about the authors:

Pavlenko T.A., <https://orcid.org/0000-0001-8032-4248>

Kukharsky M. S., <https://orcid.org/0000-0001-5080-2544>

Struchkova S.V., <http://orcid.org/0000-00955,03-4480-1953>

Beznos O.V., <https://orcid.org/0000-0001-7557-4955>

Chesnokova N.B., <https://orcid.org/0000-0002-7856-8005>

Received 12.12.2019

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ), к которым относятся синуклеинопатии, являются одной из наиболее актуальных и важных проблем в медицине, имеющих значимое медико-социальное значение в связи с высокой распространенностью и тяжестью исходов заболеваний, нередко ведущих к инвалидности. Диагноз этих заболеваний, как правило, верифицируется когда процесс уже необратим [1, 2]. Эффективность лечения НДЗ зависит от своевременного выявления нейродегенеративных процессов.

Синуклеинопатии, в основе которых лежит патологическая агрегация синуклеинов — это относительно медленно развивающиеся заболевания с преимущественным поражением нервной системы. Помимо токсического действия белковых агрегатов одним из механизмов развития таких заболеваний является недостаточность белка в местах его функционирования, т.е. в синапсах, вследствие его агрегации в цитоплазме нейрона [3, 4].

Гамма-синуклеин ( $\gamma$ -синуклеин) наряду с альфа- и бета-синуклеинами относится к семейству белков, которые в нервной системе обнаруживаются в синаптических окончаниях и регулируют нейротрансмиссию [5].

Показано, что синуклеины способны регулировать процессы слияния синаптических везикул с пресинаптической мембраной [6–8], а также участвуют в начальных этапах эндоцитоза синаптических везикул [9]. Белок  $\gamma$ -синуклеин отличается от других синуклеинов паттерном экспрессии в процессе развития нервной системы, он в большом количестве содержится не только в синапсах, но также в аксонах и телах нейронов [10–13]. Агрегированный  $\gamma$ -синуклеин является компонентом атипических включений в дегенерирующих нейронах головного и спинного мозга больных с нейродегенеративными расстройствами [10, 12, 15, 16]. Показано, что  $\gamma$ -синуклеин ассоциирован с рядом глазных патологий [17, 18]. Выявлено изменение уровня и распределения экспрессии  $\gamma$ -синуклеина при глаукоме. В норме в головке зрительного нерва  $\gamma$ -синуклеин обнаруживается в пучках нервных волокон, в то время как у пациентов с глаукомой он появляется в глиальных клетках ламинарного и постламинарного слоев, где образует включения, а его количество в пучках нервных волокон снижается [17, 19].

На данный момент не существует доступных диагностических методов, позволяющих выявлять группы риска развития нейродегенеративных или других заболеваний, связанных с нарушением функции

$\gamma$ -синуклеина. Сложность разработки таких методов объясняется тем, что диагноз НДЗ ставится при появлении клинических признаков заболевания, когда процесс уже практически необратим. Для того, чтобы смоделировать недостаточность функции  $\gamma$ -синуклеина была использована линия мышей нокаутных по гену, кодирующему  $\gamma$ -синуклеин ( $\gamma$ -КО). Известно, что у мышей, нокаутных по  $\alpha$ - и  $\gamma$ -синуклеину, а также по всем 3 членам семейства, наблюдается нарушение метаболизма дофамина в пресинаптических окончаниях [5, 6, 20]. Нарушение нейротрансмиссии и синаптическая дисфункция в дофаминергической системе могут влиять на регуляцию внутриглазного давления (ВГД) [21]. Уровень ВГД у  $\gamma$ -КО животных, а также влияние различных препаратов на ВГД на данной модели, а также при  $\gamma$ -синуклеинопатиях у людей ранее не исследовали.

Цель исследования — экспериментальное обоснование возможности прогнозирования нарушения функции  $\gamma$ -синуклеина по влиянию регуляторов адренергической и дофаминергической системы на уровень ВГД.

## Методика

Мыши с делецией гена  $\gamma$ -синуклеина были получены из лаборатории V. Buchman [11]. Название и номер в каталоге The Jackson Laboratory — B6.129P2-Sncgtm1Vlb/J и 008843, соответственно. В качестве контрольных использовали мышей линии C57BL/6J того же возраста. Животные содержались в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 ч светлого и 12 ч темного времени) с свободным доступом к воде и корму. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации» от 2016 г. Протокол одобрен этической комиссией ИФАВ РАН г. Черноголовка.

Проведен поиск препаратов-регуляторов адренергической и дофаминергической системы, влияющих на продукцию или отток внутриглазной жидкости. Воздействие этих препаратов может по-разному влиять на ВГД в норме и при отсутствии  $\gamma$ -синуклеина. Были исследованы адренергические препараты: адреномиметик Мезатон (фенилэфрин) 0,1%, адреноблокатор Тимолол 0,5%, и вещества, влияющие на дофаминергическую систему: мелатонин 0,1%, дофамин 10%, Галоперидол 0,2%.

Уровень ВГД оценивали у  $\gamma$ -КО мышей в возрасте 3, 5 и 7 мес по 5 животных (10 глаз) на каждый срок и у соответствующих по возрасту контрольных мышей (15 животных, 30 глаз). Исследование влияния инстилляции препаратов-регуляторов проводили у 15 моло-

дых  $\gamma$ -КО мышей (30 глаз), и 20 контрольных мышей (40 глаз) того же возраста (2,5-3,5 мес). Всего в эксперименте использовано 30 животных (60 глаз)  $\gamma$ -КО мышей и 35 контрольных мышей (70 глаз).

Экспериментальным и контрольным мышам проводили однократные инстилляции 10 мкл исследуемого вещества в оба глаза. Для каждого препарата-регулятора формировалась отдельная группа мышей. Каждое животное могло участвовать в эксперименте с интервалом не менее двух недель. На одной мыши один и тот же препарат не испытывался.

ВГД измеряли под общей анестезией (Авертин 1%, 400 мг/кг массы) с помощью автоматического электронного тонометра Tonovet (Iscag, Финляндия) утром до инстилляций и после инстилляций через каждые 30 мин в течение 2 ч. Предварительно было установлено, что общая анестезия не влияет на уровень ВГД как у здоровых так и  $\gamma$ -КО мышей.

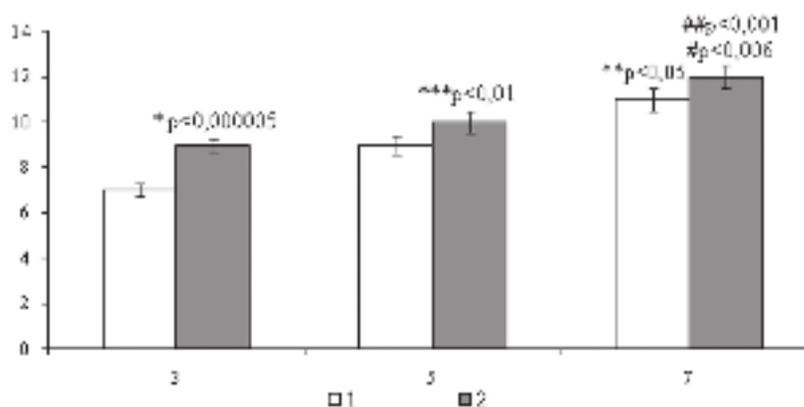
Для статистической обработки рассчитывали изменение ВГД ( $\Delta$ ВГД) в каждый момент времени по сравнению с исходным уровнем. Поскольку у  $\gamma$ -КО мышей была выявлена асимметрия уровня ВГД ( $\Delta_a$ ВГД) между левым и правым глазами, при обработке учитывалось  $\Delta$ ВГД в каждом глазу. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета Statistica 10.0. Полученные данные проверяли на нормальность распределения. Поскольку распределение отличалось от нормального, статистическую значимость различий между группами, с уровнем значимости не менее 95% оценивали с помо-

щью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Данные представлены в виде среднего значения ( $M$ ) и стандартной ошибки среднего ( $m$ ).

### Результаты и обсуждение

У молодых  $\gamma$ -КО мышей была обнаружена выраженная асимметрия уровня ВГД ( $\Delta_a$ ВГД) между глазами ( $\Delta_a$ ВГД  $\gamma$ -КО мышей –  $2,3 \pm 0,3$  мм рт. ст.,  $n=5$ ) в отличие от контрольных мышей ( $\Delta_a$ ВГД –  $0,3 \pm 0,1$  мм рт. ст.,  $n=5$ ). У более взрослых  $\gamma$ -КО мышей (5 мес) асимметрия в значениях ВГД между глазами снижалась и существенно не отличалась от таковой группы диких мышей ( $\gamma$ -КО мыши ( $n=5$ ) в возрасте 5 мес –  $\Delta_a$ ВГД –  $1,7 \pm 0,6$  мм рт. ст.; 7 мес ( $n=5$ ) –  $1,4 \pm 0,5$  мм рт. ст.; контрольные мыши в возрасте 5 мес –  $0,8 \pm 0,2$  мм рт. ст.,  $n=5$ ; 7 мес –  $0,8 \pm 0,3$  мм рт. ст.,  $n=5$ ). Вероятно, более значительная асимметрия уровня ВГД между глазами у молодых (3 мес)  $\gamma$ -КО мышей связана с ранней стадией нейродегенеративного процесса, который может затрагивать вначале только одну сторону тела, в том числе и один глаз. В дальнейшем (в возрасте 5, 7 мес) асимметричность патологических проявлений сохраняется, хотя и несколько менее выражена, так как и на другой стороне тела, хотя и с отставанием, также происходит развитие нейродегенеративного процесса [22, 23].

Установлено, что с увеличением возраста повышается уровень ВГД как у здоровых мышей, так и у  $\gamma$ -КО мышей (табл., рис. 1). Наиболее выраженные различия уровня ВГД между опытной и контрольной группой наблюдались в возрасте 3 мес (рис. 1). Воз-



**Рис. 1.** Изменение уровня ВГД в группе мышей при генетической инактивации гамма-синуклеина ( $\gamma$ -КО) и в группе мышей дикого типа в зависимости от возраста. По оси абсцисс – возраст животных (месяцы); по оси ординат – ВГД (мм рт. ст.). Данные представлены на диаграмме  $M \pm m$ . 1 – группы контроля (мыши дикого типа), 2 – опытная группа ( $\gamma$ -КО мыши):

\* –  $p < 0,000005$  статистически значимые отличия группы  $\gamma$ -КО (3 мес) от группы контроля соответствующего возраста (3 мес); \*\* –  $p < 0,005$  статистически значимые отличия группы контроля (5 мес) от группы (3 мес); \*\*\* –  $p < 0,01$  статистически значимые отличия группы  $\gamma$ -КО (5 мес) от группы контроля (3 мес); # –  $p < 0,0006$  статистически значимые отличия группы  $\gamma$ -КО (3 мес) от группы  $\gamma$ -КО (7 мес); ## –  $p < 0,01$  статистически значимые отличия группы  $\gamma$ -КО (5 мес) от группы  $\gamma$ -КО (7 мес).

Таблица

Максимальные и минимальные значения ВГД в опытной и контрольной группе в зависимости от возраста

Возраст мышей	3 мес		5 мес		7 мес	
	γ-КО	контроль	γ-КО	контроль	γ-КО	контроль
ВГД <sub>max</sub> мм рт. ст.	11	8	12	10	14	12
ВГД <sub>min</sub> мм рт. ст.	8	6	9	8	11	9

можно, наибольшая разница ВГД у γ-КО мышей в молодом возрасте по сравнению с дикими мышами является ранним симптомом заболевания. В связи с этим дальнейшие исследования проводили на мышах в возрасте 2,5–3,5 мес.

Далее было проведено исследование влияния инстилляций препаратов-регуляторов дофаминергической системы на уровень ВГД у молодых мышей. После инстилляций Мелатонина 0,1% у γ-КО мышей через 30–60 мин отмечалось статистически значимое снижение (на 5–6 мм рт. ст.) уровня ВГД по сравнению с исходным. ВГД оставалось сниженным в течение 2 ч. В группе контроля уровень ВГД снижался незначительно – в среднем на 2 мм рт. ст. через 30 мин, и через 2 ч возвращалось к исходному уровню (рис. 2, а).

После инстилляций дофамина 10% у γ-КО мышей через 30 мин выявлено статистически значимое снижение уровня ВГД в среднем на 6 мм рт. ст., через 60 и 90 мин – на 5 мм рт. ст. В группе контроля через 30 мин отмечалось незначительное (в среднем на 1 мм рт. ст.) снижение уровня ВГД, при этом возврат

к исходным значениям наблюдался уже через 1 ч (рис. 2, б).

После инстилляций Галоперидола 0,2% у γ-КО мышей через 30 мин наблюдалось значимое (в среднем на 5 мм рт. ст.) снижение, уровня ВГД сохранявшееся в течение 2 ч. При этом в группе контроля уровень ВГД снижался в среднем на 3 мм рт. ст. и через 2 ч возвращался к исходным значениям (рис. 2, в).

Таким образом, препараты-регуляторы дофаминергической системы (Мелатонин 0,1%, дофамин 10%, Галоперидол 0,2%) у γ-КО мышей вызывали статистически значимо более выраженное снижение уровня ВГД, чем у диких мышей.

Иные результаты были получены при инстилляциях препаратов, влияющих на адренергическую систему. После применения Мезатона 0,1% значимых различий ΔВГД между группой опытных мышей и диких мышей не наблюдалось. Инстилляцией Тимолола 0,5% также не вызвали существенных различий ΔВГД между опытной и контрольной группой. И так, препараты-регуляторы адренергической системы вызывали схо-

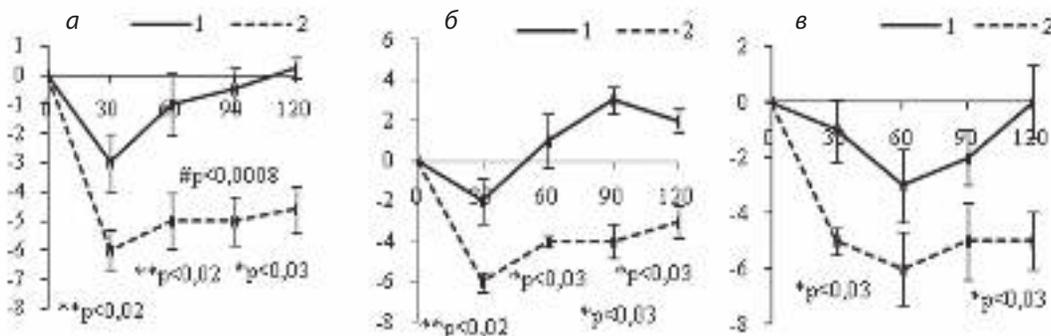
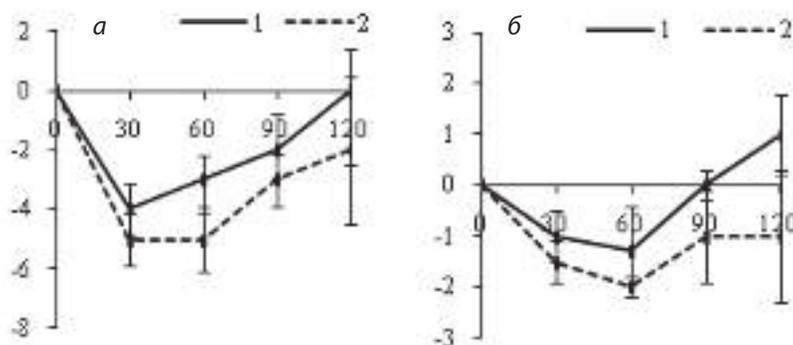


Рис. 2. Изменение ΔВГД в группе мышей при генетической инактивации гамма-синуклеина (γ-КО) и контрольных мышей дикого типа после инстилляций: а – мелатонина 0,1%; б – дофамина 10%; в – галоперидола 0,2%.

По оси абсцисс – время (мин); по оси ординат – ΔВГД (мм рт.ст).

Данные представлены на графиках  $M \pm m$ .

1 – группа контроля (мыши дикого типа), на каждом графике  $n=20$ ; 2 – опытная группа (γ-КО мыши), на каждом графике  $n=16$ . \* –  $p<0,03$ , \*\* –  $p<0,02$ , # –  $p<0,0008$  статистически значимые отличия группы γ-КО от группы контроля.



**Рис. 3.** Изменение ΔВГД в группе мышей при генетической инактивации гамма-синуклеина ( $\gamma$ -КО) и контрольных мышей дикого типа после инстилляций: а) Мезатона 0,1%, б) Тимолола 0,5%.

По оси абсцисс – время (мин); по оси ординат – ΔВГД (мм рт. ст.).

Данные представлены на графиках  $M \pm m$ . 1 – группа контроля (мыши дикого типа), на каждом графике  $n=20$ ; 2 – опытная группа ( $\gamma$ -КО мыши), на каждом графике  $n=14$ .

жее снижение уровня ВГД как в опытной, так и в контрольной группе, однако у  $\gamma$ -КО мышей наблюдалась более выраженная, чем у диких, тенденция к снижению уровня ВГД (рис. 3, а, б).

Результаты исследования показали, что у  $\gamma$ -КО мышей по сравнению с мышами дикого типа происходят более значительные изменения уровня ВГД при инстиляции регуляторов дофаминергической системы по сравнению с регуляторами адренергической системы. При отсутствии  $\gamma$ -синуклеина у мышей после инстилляций мелатонина, Галоперидола и дофамина уровень ВГД длительно и существенно снижается (более, чем на 4–5 мм рт. ст.). В связи с выпадением функции  $\gamma$ -синуклеина, участвующего в метаболизме дофамина у  $\gamma$ -КО мышей, может изменяться содержание дофамина в тканях глаза, в том числе, в переднем отделе, где дофаминергическая система активно участвует в регуляции ВГД [21, 24]. Вероятно, это объясняет тот факт, что дофаминергические регуляторы более существенно снижают ВГД у  $\gamma$ -КО мышей.

### Заключение

Таким образом, регуляторы дофаминергической системы вызывают более выраженное снижение уровня ВГД у  $\gamma$ -КО мышей по сравнению с регуляторами адренергической системы. Предложенный способ оценки динамики изменения ВГД после однократной инстиляции в глаз препаратов-регуляторов, влияющих на метаболизм дофамина (Галоперидол, дофамин, мелатонин), может выявлять и прогнозировать развитие дисфункции  $\gamma$ -синуклеина, развивающейся вследствие НДЗ или другого заболевания, связанного с патологией  $\gamma$ -синуклеина, что в свою очередь может быть

использовано для формирования групп риска для динамического наблюдения и выбора превентивных лечебных мероприятий.

### Литература

(п.п. 1; 3; 4; 6-21; 24 см. References)

1. Угрюмов М.В. *Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма*. М.: Научный мир; 2014: 22-44.
2. Тарасова Т.В., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Скворцова В.И. Новая линия генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения дофаминергических нейронов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(3): 4–9.
22. Страхов В.В., Ермакова А.В., Попова А.А., Корчагин Н.В. Исследование межкокулярной асимметрии – важный инструмент в диагностике и мониторинге первичной глаукомы. *РМЖ «Клиническая Офтальмология»*. 2014; 2: 93.
23. Пизова Н.В., Быканова М.А. Функциональные асимметрии у пациентов с болезнью Паркинсона. *Фундаментальные исследования*. 2011; 9(3): 473-6.

### References

1. Overk C.R., Masliah E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochem. Pharmacol.* 2014; 88: 508-16.
2. Ugryumov M.V. *Neurodegenerative diseases: from genome to the whole organism. [Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма]*. Moscow: Nauchny mir; 2014: 22-44. (in Russian)
3. Collier T.J., Redmond D.E., Steece-Collier K., Lipton J.W., Manfredsson F.P. Is Alpha-Synuclein Loss-of-Function a Contributor to Parkinsonian Pathology? Evidence from Non-human Primates. *Front Neurosci.* 2016; 29: 10-2. doi: 10.3389/fnins.2016.00012
4. Sanjeev A., Mattaparthi V.K. Computational Study on the Role of  $\gamma$ -Synuclein in Inhibiting the  $\alpha$ -Synuclein Aggregation. *Cent Nerv*

- Syst Agents Med Chem.* 2019; 19(1): 24-30. doi: 10.2174/1871524918666181012160439
5. Tarasova T.V., Ustyugov A.A., Ninkina N.N., Skvortsova V.I. The new line of genetically modified mice with constitutive knock out of the gene alpha synuclein to study pathogenetic aspects of differential loss of dopaminergic neurons. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2016; 60(3): 4-9. (in Russian)
  6. Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N. et al. Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J Neurosci.* 2011; 31(20): 7264-74. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6194-10.2011
  7. Burré J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherton M.R., Südhof T.C. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science.* 2010; 329:1663-7. doi: 10.1126/science.1195227
  8. Millership S., Ninkina N., Guschina I.A., Norton J., Brambilla R., Oort P.J. et al. Increased lipolysis and altered lipid homeostasis protect  $\gamma$ -synuclein null mutant mice from diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 118: 109(51): 20943-8. doi: 10.1073/pnas.1210022110
  9. Vargas K.J., Makani S., Davis T., Westphal C.H., Castillo P.E., Chandra S.S. Synucleins regulate the kinetics of synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci.* 2014; 34(28): 9364-76. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4787-13.2014
  10. Buchman V.L., Adu J., Pinon L.G., Ninkina N.N., Davies A.M. Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity. *Nat Neurosci.* 1998; 1(2): 101-3. doi: 10.1038/349
  11. Ninkina N., Papachroni K., Robertson D.C., Schmidt O., Delaney L., O'Neill F. et al. Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(22): 8233-45. doi: 10.1128/mcb.23.22.8233-8245.2003
  12. Peters O.M., Shelkownikova T., Highley J.R., Cooper-Knock J., Hortobágyi T., Troakes C. et al. Gamma-synuclein pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015; 2(1): 29-37. doi: 10.1002/acn3.143
  13. Peters O.M., Millership S., Shelkownikova T.A., Soto I., Keeling L., Hann A. et al. Selective pattern of motor system damage in gamma-synuclein transgenic mice mirrors the respective pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2012; 48(1): 124-31. doi: 10.1016/j.nbd.2012.06.016
  14. Ninkina N., Peters O., Millership S., Salem H., van der Putten H., Buchman V.L. Gamma-synucleinopathy: neurodegeneration associated with overexpression of the mouse protein. *Hum Mol Genet.* 2009; 15; 18(10): 1779-94. doi: 10.1093/hmg/ddp090
  15. Galvin J.E., Giasson B., Hurtig H.I., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Neurodegeneration with brain iron accumulation, type 1 is characterized by alpha-, beta-, and gamma-synuclein neuropathology. *Am J Pathol.* 2000; 157(2): 361-8. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64548-8
  16. Galvin J.E., Uryu K., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains alpha-, beta-, and gamma-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(23): 13450-5. doi: 10.1073/pnas.96.23.13450
  17. Surgucheva I., McMahan B., Ahmed F., Tomarev S., Wax M.B., Surguchov A. Synucleins in glaucoma: implication of gamma-synuclein in glaucomatous alterations in the optic nerve. *J Neurosci Res.* 2002; 68(1): 97-106. doi: 10.1002/jnr.10198
  18. Surgucheva I., Ninkina N., Buchman V.L., Grasing K., Surguchov A. Protein aggregation in retinal cells and approaches to cell protection. *Cell Mol Neurobiol.* 2005; 25(6): 1051-66.
  19. Surguchov A., McMahan B., Masliah E., Surgucheva I. Synucleins in ocular tissues. *J Neurosci Res.* 2001; 65(1): 68-77. doi: 10.1002/jnr.1129
  20. Senior S.L., Ninkina N., Deacon R., Bannerman D., Buchman V.L., Cragg S.J. et al. Increased striatal dopamine release and hyperdopaminergic-like behaviour in mice lacking both alpha-synuclein and gamma-synuclein. *Eur J Neurosci.* 2008; 27(4): 947-57. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06055.x
  21. Pescosolido N., Parisi F., Russo P., Buompriso G., Nebbioso M. Role of dopaminergic receptors in glaucomatous disease modulation. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 193048. doi: 10.1155/2013/193048
  22. Strahov V.V., Ermakova A.V., Popova A.A., Korchagin N.V. Study of interocular asymmetry is an important tool in diagnostics and monitoring of primary glaucoma. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal «Klinicheskaya Oftalmologiya».* 2014; 2: 93. (in Russian)
  23. Pizova N.V., Bykanova M.A. Functional asymmetries in patients with Parkinson's disease. *Fundamentalnye issledovaniya.* 2011; 9(3): 473-6. (in Russian)
  24. Oaks A.W., Marsh-Armstrong N., Jones J.M., Credle J.J., Sidhu A. Synucleins antagonize endoplasmic reticulum function to modulate dopamine transporter trafficking. *PLoS One.* 2013; 8(8): e70872. doi: 10.1371/journal.pone.0070872

**Сведения об авторах:**

**Павленко Татьяна Аркадьевна**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России, e-mail: tanya1975\_@inbox.ru;

**Кухарский Михаил Сергеевич**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. генетического моделирования нейродегенеративных процессов ФГБУ ИФВ РАН, доцент каф. общей и клеточной биологии ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, e-mail: kukharskym@gmail.com;

**Григорьев Андрей Владимирович**, канд. мед. наук, зав. клин. лаб. диагн. отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России, e-mail: op62-64@yandex.ru;

**Стручкова Стефана Владимировна**, мл. науч. сотр. отд. отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России, e-mail: fanya13@yandex.ru;

**Безнос Ольга Валерьевна**, науч. сотр. отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России, e-mail: olval2011@mail.ru;

**Чеснокова Наталья Борисовна**, доктор биол. наук, проф., глав. науч. сотр., начальник отдела патофизиологии и биохимии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России, e-mail: nchesnokova2012@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

**Борзенко С.А., Мушкова И.А., Шкандина Ю.В., Соболева М.А.**

## Изучение биосовместимости интракорнеальных линз в экспериментально-морфологическом исследовании *ex vivo*

ФГАУ НМИЦ «МНТК "Микрохирургия Глаза" им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, 127486, Москва, Россия, Бескудниковский бульвар, 59А

В настоящее время в клинической практике с целью коррекции пресбиопии применяются несколько видов интракорнеальных линз (ИКЛ) [5]. Актуальным представляется поиск биосовместимого материала, инертного по отношению к ткани стромы роговицы, в присутствии которого клетки стромы роговицы обладают сниженной тенденцией к адгезии и пролиферации. В исследовании были использованы 2 различных полимера на основе гидроксипропилметакрилата (ГЭМА) и олигоуретанметакрилата (ОУМА), потенциально пригодных для их изготовления.

**Цель работы** – изучение *ex vivo* реакции роговицы донора-трупа на имплантацию интракорнеальных линз, изготовленных из полимерных материалов на основе ГЭМА и ОУМА.

**Методика.** Для моделирования процесса интракорнеальной имплантации использовали глазные яблоки доноров-трупов (ГЯДТ). Сформированы 4 экспериментальные группы (по 3 глазных яблока в каждой): 1-я – опытная группа «ГЭМА»; 2-я – опытная группа «ОУМА»; 3-я – группа сравнения «Хронический контроль» и 4-я – группа сравнения «Острый контроль». По окончании исследования оценивали морфологическими методами наличие на изучаемых поверхностях клеток волокнистых соединительнотканых элементов, степень деформации ИКЛ. Качественно в опытных и контрольных группах оценивали изображения полученные различными методами — флуоресцентной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии.

**Результаты.** Согласно результатам исследования *ex vivo* изучаемые линзы не имели тенденции к инкапсуляции. По окончании исследования на поверхности ИКЛ в опытных группах обнаруживались адгезировавшие клеточно-волокнистые элементы, которые, однако не образовывали единого монослоя ни в группе ГЭМА, ни в группе ОУМА, в связи с чем можно предположить наличие у исследуемых полимерных материалов минимальных адгезивных свойств.

**Заключение.** Результаты экспериментально-морфологического исследования *ex vivo* позволяют заключить, что изделия из данных полимерных материалов (ГЭМА и ОУМА) биологически совместимы, представляются потенциально пригодными для интракорнеальной имплантации и могут быть рекомендованы к дальнейшему изучению в клинических условиях.

**Ключевые слова:** интракорнеальные линзы; имплантация; пресбиопия; гидроксипропилметакрилат; олигоуретанметакрилат; биосовместимость

**Для цитирования:** Борзенко С.А., Мушкова И.А., Шкандина Ю.В., Соболева М.А. Изучение биосовместимости интракорнеальных линз в экспериментально-морфологическом исследовании *ex vivo*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(4): 12-19.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.12-19

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Борзенко С.А., Мушкова И.А.; Сбор и обработка материала – Шкандина Ю.В., Соболева М.А.; подготовка иллюстративного материала – Шкандина Ю.В., Соболева М.А.; написание текста – Шкандина Ю.В., Соболева М.А.; редактирование – Борзенко С.А., Мушкова И.А.

**Для корреспонденции:** Соболева Мария Александровна, e-mail: dr.soboleva.MA@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, грант № 15-29-03882

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

Поступила 13.05.2020

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

**Borzenok S.A., Mushkova I.A., Shkandina Yu.V., Soboleva M.A.**

### Biocompatibility of intracorneal lenses in an *ex vivo* experimental study

S.N. Fedorov NMRC «MNTK "Eye Microsurgery"»,  
Beskudnikovsky Boulevard, 59A, Moscow, 127486, Russia

Currently, several types of intracorneal lenses (ICL) are used in clinical practice to correct presbyopia. It seems relevant to search for a biocompatible material that is inert with respect to corneal stromal tissue, in the presence of which corneal stromal cells

would less tend to adhesion and proliferation. This study used two different polymers based on hydroxyethylmethacrylate (HEMA) and olygouretanmethacrylate (OUMA).

**The aim** was to study the *ex vivo* reaction of cadaver corneas to implantation of ICLs made of polymeric materials based on HEMA and OUMA.

**Methods.** The process of intracorneal implantation was modeled on eyeballs from cadaver donors (EBCD). Four experimental groups were formed: 1) «HEMA» experimental group (3 EBCD); 2) «OUMA» experimental group (3 EBCD); 3) «chronic control» comparison group (4 EBCD); and 4) «acute control» comparison group (3 EBCD). The presence of fibrous connective tissue elements on the studied surfaces and the degree of ICL deformation were evaluated at the end of the study. Images obtained with different methods, fluorescence microscopy and scanning electron microscopy, were qualitatively compared in the experimental and control groups.

**Results.** According to results of the *ex vivo* study, the developed lenses did not tend to encapsulate. In experimental groups, cellular-fibrous elements were found on the surface of the ICL. However, there was no monolayer of cells or fibrous elements on the ICL in experimental groups, which suggested that the adhesive properties of studied polymeric materials are minimal.

**Conclusions.** Results of this experimental *ex vivo* study showed that ICLs made of either polymeric material (HEMA or OUMA) are potentially suitable for intracorneal implantation and can be recommended for further study in clinical conditions due to their biological compatibility.

**Keywords:** intracorneal lens; implantation; presbyopia; hydroxyethylmethacrylate; olygouretanmethacrylate; inlay; biocompatibility.

**For citation:** Borzenok S.A., Mushkova I.A., Shkandina Yu.V., Soboleva M.A. Biocompatibility of intracorneal lenses in an *ex vivo* experimental study. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 12-19. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.12-19

**Contribution:** research concept and design – Borzenok S.A., Mushkova I.A.; material collecting and processing – Shkandina Yu.V., Soboleva M.A.; preparation of illustrative material – Shkandina Yu.V., Soboleva M.A.; writing text – Shkandina Yu.V., Soboleva M.A.; text editin – Borzenok S.A., Mushkova I.A.

**For correspondence:** **Maria A. Soboleva**, Resident of S.N. Fedorov NMRC «MNTK “Eye Microsurgery”», Beskudnikovsky Boulevard, 59A, Moscow, 127486, Russian Federation, e-mail: dr.soboleva.MA@yandex.ru

**Acknowledgment.** Research was sponsored by Russian Fund of Fundamental Research (RFFR), research grant № 15-29-03882.

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

#### Information about the authors:

Borzenok S.A., <https://orcid.org/0000-0001-9160-6240>

Mushkova I.A., <https://orcid.org/0000-0003-0941-4974>

Shkandina Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-4447-6599>

Soboleva M.A., <http://orcid.org/0000-0002-7124-709X>

Received 13.05.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

В настоящее время в клинической практике с целью коррекции пресбиопии применяются несколько видов интракорнеальных линз (ИКЛ). Одним из основных требований, предъявляемых к современным ИКЛ, является высокая биосовместимость материала, из которого изготовлена линза, для обеспечения оптимального естественного движения питательных веществ через роговицу [1–5]. Материал ИКЛ не должен быть токсичным, биорезорбируемым и не должен инкапсулироваться, иными словами, изделие должно находиться в строме роговицы сколько угодно долго без провокации помутнения и расплавления последней, сохраняя изначально заданную форму и оптические свойства. Выраженность инкапсуляции напрямую связана с адгезивными свойствами поверхности имплантата. Чем выше адгезивная

способность клеток стромы роговицы (КСР) к поверхности изделия, тем более выражен фибропластический процесс [6]. При этом происходит образование плотной капсулы и, как следствие, снижение прозрачности роговицы. Актуальным представляется поиск биосовместимого материала, инертного по отношению к ткани стромы роговицы, в присутствии которого КСР обладают сниженной тенденцией к адгезии и пролиферации [7–10]. Среди доступных эластичных материалов, имеющих положительный опыт применения в офтальмохирургии (ИОЛ, интрастромальные роговичные сегменты, внутрикапсульные кольца и др.), в данном исследовании были выбраны 2 различных полимера на основе гидроксипропилметакрилата (ГЭМА) и олигоуретанметакрилата (ОУМА) [11–14].

**Цель работы** – изучение в экспериментально-морфологическом исследовании *ex vivo* реакцию роговицы донора-трупа на имплантацию ИКЛ, изготовленных из полимерных материалов на основе ГЭМА и ОУМА.

### Методика

Исследование выполнено на базе лаборатории Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ НМИЦ «МНТК "Микрохирургия глаза"» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Сканирующая электронная микроскопия выполнена на базе лаборатории анатомии микроорганизмов ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи». Протокол исследования одобрен этической комиссией ФГАУ НМИЦ «МНТК "Микрохирургия глаза"» им. акад. С.Н. Федорова».

Изучение тканевой реактивности роговицы донора трупа в ответ на имплантацию разработанных ИКЛ осуществлялось в условиях органного нормотермического культивирования с использованием визуализирующих методов исследования: флуоресцентной микроскопии (ФМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Впервые для изучения биосовместимости полимерных материалов, потенциально пригодных для интракорнеальной имплантации, в нашем исследовании была выбрана модель органной культуры роговицы человека.

В качестве ИКЛ были изготовлены экспериментальные изделия из полимерных материалов на основе ГЭМА (ООО «НЭП МГ» г. Москва) и ОУМА (ООО «Репер-НН» г. Нижний Новгород) с параметрами (таблица), рассчитанными в процессе математического моделирования.

Для моделирования процесса интракорнеальной имплантации использовали глазные яблоки доноров-трупов (ГЯДТ), с максимально возможными параметрами жизнеспособности всех слоев роговицы.

Были сформированы 4 экспериментальные группы:

1. Опытная группа «ГЭМА» (3 ГЯДТ) — в строме роговицы ГЯДТ формировали внутрироговичный карман (ВРК), внутрь которого имплантировали ИКЛ из материала ГЭМА. После имплантации роговично-склеральный диск (РСД) выкраивали и культивировали в стандартных условиях в течение 3 мес. По окончании культивирования проводили морфологические исследования<sup>1</sup>;

2. Опытная группа «ОУМА» (3 ГЯДТ) — те же этапы, что и в группе «ГЭМА», но имплантировали ИКЛ из материала ОУМА;

3. Группа сравнения «Хронический контроль» (ХК) (4 ГЯДТ) — те же этапы, что и в первых двух группах, но без имплантации ИКЛ;

4. Группа сравнения «Острый контроль» (3 ГЯДТ) — те же этапы, что и в группе «Хронический контроль», но без культивирования.

В строме роговицы всех ГЯДТ формировали внутрироговичный карман для ИКЛ и в опытных группах имплантировали ИКЛ (рис. 1) согласно Протоколу имплантации ИКЛ.

**Органное культивирование.** Сразу после хирургического этапа роговично-склеральный диск выкраивали и культивировали *in vitro*, для чего его переносили в культуральный флакон с площадью дна 25 см<sup>2</sup> (Corning, США) в положении боуменовой мембраной вниз. Добавляли в флакон 25 мл питательной среды состава: среда Игла в модификации Дульбекко в смеси с средой Хэма F12 1:1 (DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), эмбриональная телячья сыворотка 5% (HyClone, США), смесь антибиотиков 1% (MP Biomedicals, США), L-глутамин 2 ммоль/л (ПанЭко, Россия). Далее про-

<sup>1</sup>Борзенко С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: – дис. д-ра мед. наук. Москва, 2008. 306 с.

Таблица

Параметры ИКЛ изготовленных для проведения экспериментально-морфологического исследования *ex vivo*

Материал ИКЛ	ГЭМА	ОУМА
Форма	Менискообразная	Менискообразная
Диаметр	2,5 мм	2,5 мм
Оптическая сила	3 дптр	3 дптр
Показатель преломления материала	1,430	1,505
Радиус кривизны задней поверхности	7,8 мм	7,8 мм
Радиус кривизны передней поверхности	5,4 мм	6,6 мм
Количество	3	3

водили инкубацию в стандартных условиях (37 °С; 5% концентрация CO<sub>2</sub>; 95% влажность; инкубатор NU-5510 (NuAire, США) в течение 3 мес. Питательную среду заменяли каждые 3 сут.

**Морфологическое исследование.** Для доступа к зоне интереса все роговично-склеральные диски готовили к микроскопии (рис. 2) согласно Протоколу вскрытия внутрироговичного кармана (ВРК).

После вскрытия внутрироговичного кармана во всех исследуемых группах изучали с помощью флуоресцентной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии «крышку» и «ложе» роговицы. По окончании исследования оценивали наличие на изучаемых поверхностях клеток, волокнистых соединительнотканых элементов и степень деформации ИКЛ. Качественно сравнивали изображения, полученные различными методами, в опытных и контрольных группах.

### Результаты

**Флуоресцентная микроскопия.** После окраски Hoechst 33258 в группах ГЭМА, ОУМА и «хронический контроль» на поверхности «ложа» роговицы и «крышки» определяли с помощью флуоресцентного микроскопа скопления клеточных элементов, предположительно клеток стромы роговицы (рис. 3 а, б, в). Наибольшее количество клеток располагалось в проекции основания внутрироговичного кармана. В опытных группах (ГЭМА и ОУМА) скопления клеток на поверхности «ложа» визуально были более плотными, чем в контрольной группе «хронического контроля». Кроме того, на поверхности имплантированных ИКЛ обнаруживали единичные клеточные элементы, однако определить значимые различия в плотности адгезиро-

ванных элементов в группах ГЭМА и ОУМА не представлялось возможным. В группе сравнения «острый контроль» на поверхности «ложа» и «крышки» внутрироговичного кармана клеточные элементы не визуализировались.

**Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).** При СЭМ в группах ГЭМА, ОУМА и «хронический контроль» на поверхности «ложа» роговицы определялись клетки стромы роговицы в виде скоплений и отдельных элементов, волокнистые мембраны, по форме напоминающие соединительнотканые волокна, и волокнисто-клеточные ассоциаты. На электронограммах «крышки» обнаруживали аналогичные структуры, однако в значительно меньшем количестве, чем на поверхности «ложа». Наибольшее количество клеток в группах ГЭМА, ОУМА и «хронический контроль» локализовалось в проекции основания внутрироговичного кармана в виде выпуклых элементов округлой формы (рис. 4).

На поверхности имплантированных ИКЛ в опытных группах визуализировались клеточные элементы и немногочисленные волокнистые структуры. Клетки отличались по форме от обнаруженных у основания внутрироговичного кармана (выпуклых и округлых). Адгезированные к импланту клетки по форме напоминали фибробласты — уплощенные, с наличием ядер и нескольких отростков (рис. 5). Значимых визуальных отличий в плотности адгезированных клеток в группах ГЭМА и ОУМА методом СЭМ обнаружить не удалось.

В группе ГЭМА на поверхности имплантированной ИКЛ определялись многочисленные волокнистые мембраны в виде «нежной сеточки», имеющие тенденцию к сворачиванию в «трубочку» (рис. 6, а). В группе ОУМА мембраны визуализировались более «грубыми»



Рис. 1. Имплантированная ИКЛ в строму донорской роговицы.

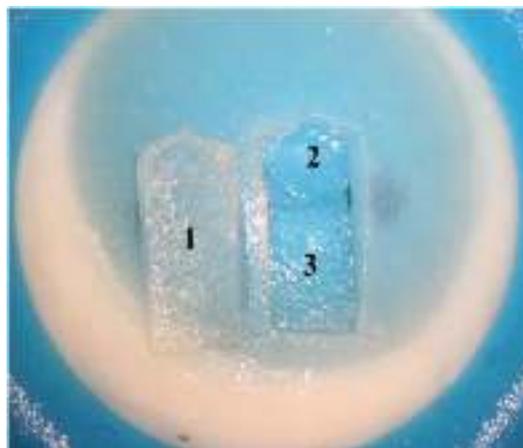
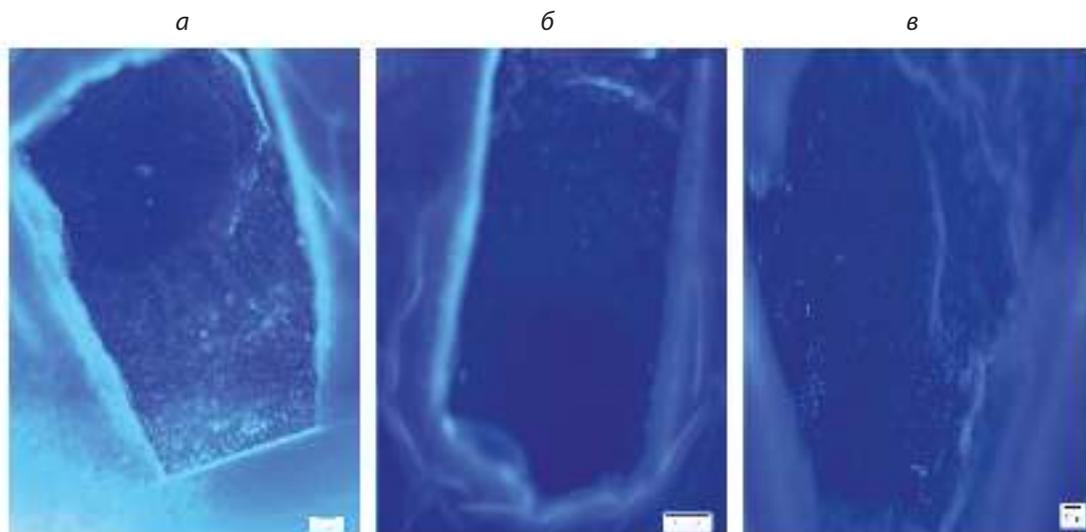


Рис. 2. Вскрытие внутрироговичного кармана (ВРК). «Крышка» ВРК (1) отсечена, визуализируется ИКЛ (2), располагающаяся на «ложе» (3).

и «плотными», однако были не так многочисленны, как в группе ГЭМА (рис. 6, б). В ходе исследования формирование грубой соединительнотканной капсулы вокруг импланта в опытных группах отмечено не было. На электронограммах поверхности «ложа» и «крышки» в группе «острый контроль» клеточно-волоконные структуры не визуализировались (рис. 7).

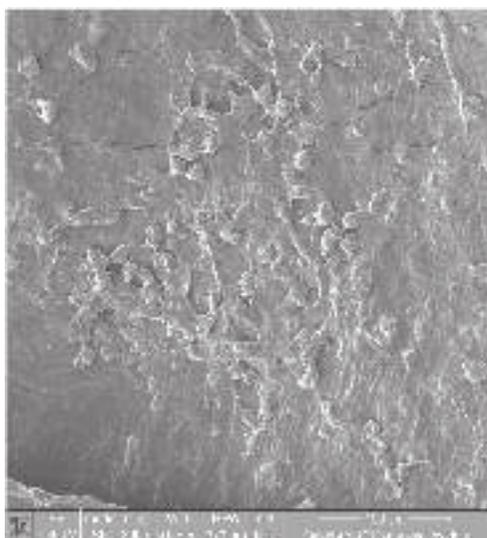
### Обсуждение

По результатам проведенных морфологических исследований в группах ГЭМА, ОУМА и ХЭ на внутренних поверхностях внутрироговичного кармана были обнаружены клеточно-волоконные структуры, появление которых, вероятно, было обусловлено реакцией ткани роговицы на хирургическую трав-

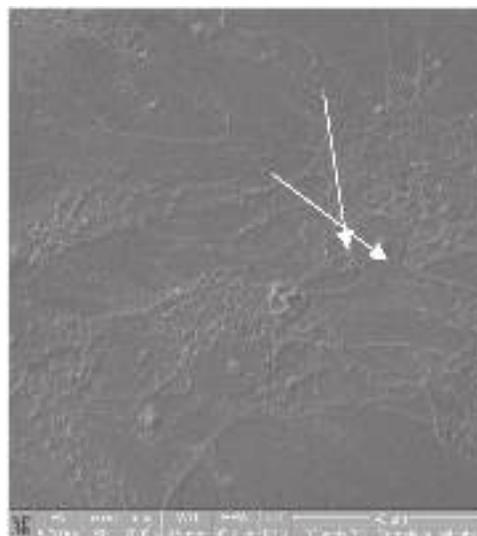


**Рис. 3.** Флуоресцентная микроскопия, ув. 40.

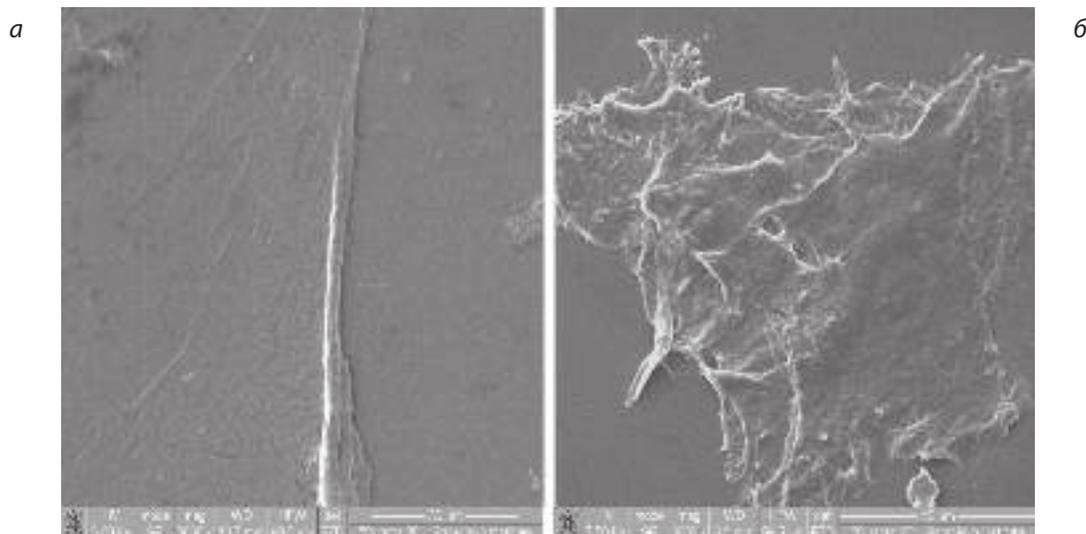
*a* – «ложе» роговицы прямоугольной формы. ИКЛ группы «ГЭМА» в «ложе». Скопления клеточных элементов; *б* – «ложе» внутрироговичного кармана прямоугольной формы. ИКЛ группы «ОУМА» в «ложе». Клеточные элементы на поверхности имплантированной ИКЛ; *в* – «ложе» группы «хронический контроль». Слепой конец внутрироговичного кармана. Поверхность покрыта клетками.



**Рис. 4.** Сканирующая электронная микроскопия. Группа «ГЭМА». Поверхность «ложа» внутрироговичного кармана. Волокнисто-клеточные ассоциаты, ув. 800.



**Рис. 5.** Сканирующая электронная микроскопия. Группа «ГЭМА». Поверхность ИКЛ. Адгезированные волокнисто-клеточные структуры на поверхности ИКЛ. Уплотненные клетки с множеством отростков (указаны стрелками),  $\times 3000$ .



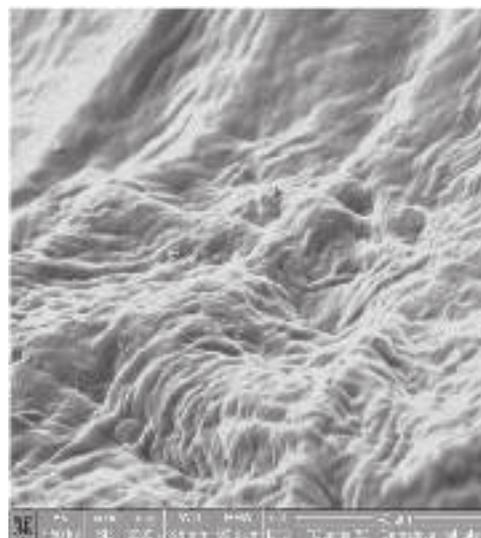
**Рис. 6.** Сканирующая электронная микроскопия. Поверхность ИКЛ; а – группа «ГЭМА». Волокнистая мембрана в виде «нежной сеточки», сворачивающаяся в «трубочку», ув. 3000; б – группа «ОУМА». Волокнистая структура в виде «плотной сеточки», ув. 800.

му. Наибольшее количество клеток в указанных группах располагалось в проекции основания внутрироговичного кармана, что возможно было обусловлено близостью лимбальной зоны. Отсутствие клеток стромы роговицы (КСР) на поверхности «ложки» и «крышки» в контрольной группе «острый контроль» было связано с тем, что препараты этой группы фиксировали сразу же по окончании хирургического этапа, исключая возможность клеточной миграции и пролиферации.

Обнаружение клеточных и волокнистых элементов на внутренней поверхности «крышки» в меньшем количестве, чем на «ложе», по всей вероятности, было обусловлено механическим вскрытием внутрироговичного кармана и последующими манипуляциями с тонким слоем ткани в виде передних слоев стромы роговицы.

На поверхности ИКЛ в опытных группах обнаруживались адгезированные клеточно-волокнистые элементы, которые, однако, не образовывали единого монослоя ни в группе ГЭМА, ни в группе ОУМА, в связи с чем можно предположить наличие у исследуемых полимерных материалов минимальных адгезивных свойств. Экспериментальные образцы ИКЛ не имели тенденции к инкапсуляции. В группе ГЭМА волокнистые мембраны визуально были менее плотными, чем в группе ОУМА, что представляется важным для имплантации в оптическую зону и потенциально может влиять на зрительные функции пациен-

та. Однако, обнаруженные мембраны в виде «нежной сеточки» были многочисленны в группе ГЭМА, в то время как «плотные» волокнистые образования на поверхности ИКЛ из ОУМА были единичны, что затрудняло определение предпочтительности материала.



**Рис. 7.** Сканирующая электронная микроскопия. Группа «ОК». Поверхность вскрытого внутрироговичного кармана. Поверхность «крышки» без видимых клеток и волокнистых мембран, увеличение ув. 3000.

Согласно результатам проведенного экспериментально-морфологического исследования, разработанные ИКЛ из полимерных материалов на основе ГЭМА и ОУМА потенциально пригодны для интракорнеальной имплантации поскольку являются биологически совместимыми, однако требуют дополнительного изучения в клинических условиях.

### Выводы

При имплантации полимерной ИКЛ с рефракционной целью не должно происходить образования грубой соединительнотканной капсулы, при этом минимальная адгезия клеточно-волоконистых структур на поверхности импланта также является необходимым условием для сохранения оптических свойств роговицы. Согласно результатам проведенного исследования *ex vivo* разработанные линзы не имели тенденции к инкапсуляции.

По окончании исследования на поверхности ИКЛ в опытных группах обнаруживались адгезированные клеточно-волоконистые элементы, которые, однако, не образовывали единого монослоя ни в группе ГЭМА, ни в группе ОУМА, в связи с чем можно предположить наличие у исследуемых полимерных материалов минимальных адгезивных свойств. В группе ГЭМА волоконистые мембраны визуально были менее плотными, чем в группе ОУМА, что представляется на наш взгляд важным для имплантации в оптическую зону. Однако, обнаруженные мембраны в виде «нежной сеточки» были многочисленны в группе ГЭМА, в то время как «плотные» волоконистые образования на поверхности ИКЛ из ОУМА были единичны.

Согласно данным проведенного исследования нахождение разработанных ИКЛ в строме роговиц вызвало клеточно-тканевую реакцию, сопоставимую по уровню с таковой, вызываемой идентичным хирургическим вмешательством, но без имплантации ИКЛ.

Изделия из полимерных материалов (ГЭМА и ОУМА) представляются потенциально пригодными для интракорнеальной имплантации и могут быть рекомендованы к дальнейшему изучению в клинических условиях, поскольку являются биологически совместимыми.

Клеточно-тканевая реакция ткани роговицы донора трупа на имплантацию разработанных ИКЛ сопоставима с реакцией на формирование ВРК без введения линзы, что подтверждает инертность разработанных ИКЛ.

### Литература

(п.п. 3-5; 7-10; 12 см. References)

1. Проскурина О.В. Пресбиопия. Современный подход к очковой коррекции. Часть 3. Определение и обозначение расстояния между оптическими центрами корректирующих линз в пресбиопических очках. *Российский офтальмологический журнал*. 2010; 3 (2): 49-52.
2. Розанова О.И., Шуко А.Г., Михалевиц И.М., Малышев В.В. Закономерности структурно-функциональных изменений глаза при развитии пресбиопии. *Вестник офтальмологии*. 2011; (3): 17-20.
6. Хенч Л., Джонс Д. *Биоматериалы, искусственные органы и инженеринг тканей*. М.: Техносфера, 2007.
11. Мороз З.И., Леонтьева Г.Д., Новиков С.В., Гурбанов Р.С. Рефракционные результаты имплантации интрастромальных роговичных сегментов на основе гидрогеля у пациентов с кератоконусом. *Офтальмохирургия*. 2009; (1): 14-7.
13. Фрешни Р.Я. *Культура животных клеток. Практическое руководство*. М.: Бином. 2010.
14. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Мушкова И.А., Островский Д.С., Попов И.А., Шкандина Ю.В. Исследование биосовместимости материалов для внутрироговичных линз на модели культуры клеток стромы роговицы человека *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2017; 19 (1): 74-81.

### References

1. Proskurina O.V. Presbyopia. A modern approach to spectacle correction. Part 3. Determination and designation of the distance between the optical centers of corrective lenses in presbyopic glasses. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal*. 2010; 3(2): 49-52. (in Russian)
2. Rozanova O.I., Shchuko A.G., Mikhalevich I.M., Malyshev V.V. Patterns of structural and functional changes in the eye with the development of presbyopia. *Vestnik oftal'mologii*. 2011; (3): 17-20. (in Russian)
3. Arlt E., Krall E., Moussa S., Grabner G., Dexl A. Implantable inlay devices for presbyopia: the evidence to date. *Clinical ophthalmology*. 2015; 14(9): 129- 37.
4. Atchison D.A. Accommodation and presbyopia. *Ophthalmic and Physiological Optic*. 1995; 15(4): 255-72.
5. Baily C., Kohnen, O'Keefe M. Preloaded refractive-addition corneal inlay to compensate for presbyopia implanted using a femtosecond laser: one-year visual outcomes and safety – 4. *J Cataract Refract. Surg*. 2014; 40(8): 1341–8.
6. Khench L., Dzhons D. *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering. [Biomaterialy, iskusstvennye organy i inzhiniring tkaney]*. Moscow; Tekhnosfera; 2007. (in Russian)
7. Charman W.N. Developments in the correction of presbyopia I: spectacle and contact lenses. *Ophthalmic and Physiological Optic*. 2014; 34: 8–29.
8. Charman W.N. Developments in the correction of presbyopia II: surgical approaches *Ophthalmic and Physiological Optic*. 2014; 34: 1-30.
9. Chayet A., Barragan Garza E. Combined hydrogel inlay and laser in situ keratomileusis to compensate for presbyopia in hyperopic patients: one-year safety and efficacy. *J Cataract Refract. Surg*. 2013; 39(11): 1713–21.

10. Stojanovic N.R., Panagopoulou S.I., Pallikaris I.G. Cataract Surgery with a Refractive Corneal Inlay in Place. *Ophthalmological Medicine*. 2015; 4.
11. Moroz Z.I., Leont'eva G.D., Novikov S.V., Gurbanov R.S. Refractive results of implantation of intrastromal corneal segments based on hydrogel in patients with keratoconus. *Oftal'mokhirurgiya*. 2009; (1): 14-7. (in Russian)
12. Gil-Cazorla R., Shah S., Naroo S.A. A review of the surgical options for the correction of presbyopia. *Br J. Ophthalmology*. 2016; 100: 62–70.
13. Freshni R.Ya. *Culture of animal cells. Practical guide. [Kul'tura zhivotnykh kletok. Prakticheskoe rukovodstvo]*. Moscow; Binom; 2010. (in Russian)
14. Malyugin B.E., Borzenok S.A., Mushkova I.A., Ostrovskiy D.S., Popov I.A., Shkandina Yu.V. Investigation on the intracorneal lens material biocompatibility using the model of the corneal stromal cell culture. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2017; 19 (1): 74-8.

**Сведения об авторах:**

**Борзенко Сергей Анатольевич**, доктор мед. наук, проф., акад. РАЕН, руководитель Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ НМИЦ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова»;

**Мушкова Ирина Альфредовна**, доктор мед. наук, врач-офтальмохирург, зав. отделом лазерной рефракционной хирургии ФГАУ НМИЦ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова»;

**Шкандина Юлия Викторовна**, канд. мед. наук, науч. сотр. отдела хирургии хрусталика и интраокулярной коррекции ФГАУ НМИЦ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова»;

**Соболева Мария Александровна**, врач – офтальмолог, аспирант ФГАУ НМИЦ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.13.002.2-004.6

Богданов Л.А., Великанова Е.А., Шишкова Д.К., Шабает А.Р., Кутихин А.Г.

## Ремоделирование неоинтимы при каротидном атеросклерозе: влияние матриксных металлопротеиназ-2 и -9 и сосудистых гладкомышечных клеток различного фенотипа

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

**Цель исследования** – изучение распространенности и локализации сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) различного фенотипа в составе атеросклеротических бляшек сонной артерии, а также взаимосвязи различных клеточных популяций неоинтимы с экспрессией матриксных металлопротеиназ (ММП)-2 и ММП-9 в зависимости от степени стабильности бляшки.

**Методы.** Проведено иммуногистохимическое исследование 16 атеросклеротических бляшек (8 клинически нестабильных и 8 стабильных), полученных при каротидной эндартерэктомии в связи с гемодинамически значимым стенозом. Оценка сократительной способности СГМК проводилась при использовании метода иммуногистохимического типирования альфа-актина гладких мышц ( $\alpha$ -SMA), синтетического, макрофагального и остеогенного фенотипов СГМК посредством типирования виментина, CD68 и RUNX2 соответственно. Активность ремоделирования определялась посредством выявления ММП-2 и ММП-9.

**Результаты.** Показано, что около трети каротидных бляшек характеризовались высокой экспрессией ММП-9 CD68-положительными клетками, что не коррелировало с их нестабильностью. Локализация, содержание и соотношение СГМК различного фенотипа и макрофагов значительно варьировали в зависимости от бляшки. Общей закономерностью было преимущественное послойное типирование на  $\alpha$ -SMA в зоне интактных эластических волокон меди и, реже, в фиброзной крышке или прилегающих участках. CD68-положительные клетки визуализировались в толще неоинтимы; некоторая их доля была колокализована с  $\alpha$ -SMA, отражая СГМК макрофагального фенотипа. Положительное отношение к виментину наблюдалось на границе с эластическими волокнами меди, либо с основной клеточной массой неоинтимы и характеризовалась прилегающим бесклеточным экстрацеллюлярным матриксом, что свидетельствовало об активном синтезе его соответствующими клетками. Также в неоинтиме обнаруживались клетки положительные как на RUNX2 и  $\alpha$ -SMA, так и исключительно RUNX2-положительные клетки.

**Заключение.** Каротидные атеросклеротические бляшки характеризуются различной локализацией, содержанием и соотношением СГМК сократительного, синтетического, макрофагального и остеогенного фенотипов, при этом экспрессия ММП-2 и ММП-9 была ограничена CD68-положительными макрофагами и СГМК макрофагального фенотипа.

**Ключевые слова:** каротидный атеросклероз; сосудистое ремоделирование; гладкомышечные клетки; матриксные металлопротеиназы; ММП-2; ММП-9; CD68; RUNX2

**Для цитирования:** Богданов Л.А., Великанова Е.А., Шишкова Д.К., Шабает А.Р., Кутихин А.Г. Ремоделирование неоинтимы при каротидном атеросклерозе: влияние матриксных металлопротеиназ-2 и -9 и сосудистых гладкомышечных клеток различного фенотипа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 20-30.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.20-30

**Для корреспонденции:** Богданов Лев Александрович, e-mail: bogdanovleone@gmail.com

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

**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 02.02.2020

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Bogdanov L.A., Velikanova E.A., Shishkova D.K., Shabaev A.R., Kutikhin A.G.

## Neointimal remodeling in carotid atherosclerosis: roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 and different phenotypes of vascular smooth muscle cells

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,  
Sosnovy Blvd. 6, Kemerovo 650002

**Aim.** To study prevalence and localization of different phenotypes of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in carotid atherosclerotic plaques and to examine expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in relation to different cell populations within the neointima.

**Methods.** The immunohistochemical examination was performed on 16 atherosclerotic plaques (8 unstable and 8 stable) excised during carotid endarterectomy for critical stenosis. VSMCs of contractile, synthetic, macrophagic, and osteogenic phenotypes were identified by staining for  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), vimentin, CD68, and RUNX2, respectively. Activity of neointimal remodeling was assessed by staining for MMP-2 and MMP-9.

**Results.** Approximately one-third of atherosclerotic plaques was positively stained for MMP-9 exclusively expressed in CD68-positive cells, which however, did not correlate with plaque ruptures. Localization, content, and ratio of different VSMC phenotypes significantly varied in different plaques. Positive  $\alpha$ -SMA staining was found mainly in the intact media and fibrous cap. In contrast, both CD68-positive and CD68/ $\alpha$ -SMA double-positive cells were detected within the neointima but not in the media. Vimentin was expressed in the neointima between the medial layers and fibrous cap near the acellular extracellular matrix suggesting its active production by mesenchymal cells. Both RUNX2- and RUNX2  $\alpha$ -SMA double-positive cells indicative of VSMC osteogenic differentiation were also observed in the neointima. **Conclusion.** Carotid atherosclerotic plaques contained VSMCs of all phenotypes, which were differentially localized within the neointima; however, the MMP-2 and MMP-9 expression was restricted to CD68-positive macrophages and CD68/ $\alpha$ -SMA-positive VSMCs of the macrophagal phenotype.

**Keywords:** carotid atherosclerosis; vascular remodeling; smooth muscle cells; matrix metalloproteinases; MMP-2; MMP-9; CD68; RUNX2

**For citation:** Bogdanov L.A., Velikanova E.A., Shishkova D.K., Shabaev A.R., Kutikhin A.G. Neointimal remodeling in carotid atherosclerosis: roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 and different phenotypes of vascular smooth muscle cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'nyayaterapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 20-30. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.20-30

**For corresponding:** Leo A. Bogdanov, Junior Researcher, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, e-mail: bogdanovleone@gmail.com

**Contribution:** research concept and design, statistical processing of the material, writing text – Kutikhin A.G.; material collecting and processing, statistical processing of the material; preparation of illustrative material – Bogdanov L.A.; material collecting and processing – Shabaev A.R.; preparation of illustrative material – Velikanova E.A.; text editin – Shishkova D.K.

**Acknowledgment.** The study was supported by a complex basic research program of the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, as a part of a basic research project of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases #0546-2019-0002 "Pathogenetic Justification of the Development of Implants for Cardiovascular Surgery Based on Biocompatible Materials Using a Patient-Oriented Approach with Mathematical Modeling, Tissue Engineering and Genomic Predictors."

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

### Information about the authors:

Bogdanov L.A., <https://orcid.org/0000-0003-4124-2316>

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

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

Received 02.02.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

Ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) представляет собой универсальный физиологический процесс, в норме поддерживающий гомеостаз в различных органах и тканях посредством адаптации внеклеточного микроокружения к механическим и биологическим воздействиям [1]. Динамически

изменяющийся ЭЦМ, в свою очередь, аналогичным образом воздействует на клетки, регулируя как механически опосредованную передачу сигнала (механотрансдукцию), так и запуская или ингибируя различные внутриклеточные сигнальные пути при помощи специфических лигандов [2, 3].

Динамика и структура ремоделирования ЭЦМ определяются соотношением активности и вариантами течения двух противоположных процессов – депонирования и деградации ЭЦМ [4]. Депонирование ЭЦМ происходит в результате синтеза его компонентов (коллагенов, гликопротеинов, протеогликанов, регуляторов, секретируемых факторов и непосредственно связанных с ЭЦМ молекул) синтетически активными клетками, в то время как деградация ЭЦМ осуществляется в основном за счет протеолиза вследствие действия матриксных металлопротеиназ (ММП), дезинтегринов-металлопротеаз (ADAMs и ADAMTS), катепсинов, гепараназы и других [4]. Из представленных типов регуляторов ЭЦМ наиболее обильно и универсально секретируемыми различными типами клеток являются матриксные металлопротеиназы (ММП) [5-9]. В норме регулируя физиологические изменения ЭЦМ, ММП в незначительном количестве присутствуют и в здоровых тканях [7, 9], однако при развитии ряда связанных с воспалением патологических процессов секреция ММП клетками мезенхимального ряда и иммунокомпетентными клетками значительно повышается, что вызывает соответствующее ремоделирование ЭЦМ [4, 5-8].

Из всех ММП в изучении атеросклероза наибольший интерес представляют ММП-2 и ММП-9 (желатиназы А и В), поскольку они секретируются гладкими миоцитами меди сосудов или сосудистыми гладкомышечными клетками (СГМК) и макрофагами, а их специфичными субстратами являются компоненты базальной мембраны сосудов (коллаген IV типа и ламинин) и основной белок эластических волокон средней оболочки сосудов (меди) эластин [5, 9].

Принято считать, что ММП-2 и ММП-9 секретируется в большом количестве как макрофагами, так и сосудистые гладкомышечные клетки (СГМК) [6, 10-12], однако распространенная в атеросклеротических бляшках трансдифференцировка СГМК с приобретением ими синтетического, макрофагального и остеогенного фенотипа [10–12] существенно затрудняет точную идентификацию ответственных за синтез ММП-2 и ММП-9 клеточных популяций. В то же время можно предположить, что локализация и роль различных популяций неоинтимальных СГМК в ремоделировании ЭЦМ будет значительно различаться.

Целью данной работы является исследование распространенности и локализации различных фенотипов СГМК в составе атеросклеротических бляшек из сонной артерии, а также связь различных клеточных популяций неоинтимы с секрецией ММП-2 и ММП-9 в клинически нестабильных вызвавших

острое нарушение мозгового кровообращения и стабильных бляшках.

### Методика

В качестве объектов исследования были выбраны 16 атеросклеротических бляшек, удаленных во время каротидной эндартерэктомии по причине гемодинамически значимого стеноза сонной артерии, который в половине случаев (8 бляшек) приводил к острому нарушению мозгового кровообращения (ОНМК). Таким образом, атеросклеротические бляшки были клинически разделены на нестабильные (вызвавшие ОНМК вследствие своего разрыва) и стабильные (обуславливающие хроническую ишемию головного мозга, но не ставшие причиной ОНМК). Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. До включения в исследование от всех пациентов было получено письменное информированное согласие.

После выполнения оперативного вмешательства бляшки, помещенные в пластмассовый контейнер с 0,9% раствором хлорида натрия, на льду доставляли в лабораторию и моментально замораживали в металлической цилиндрической форме в криосреде Tissue-Tek (каталожный номер 4583, Sakura) при помощи погружения металлической формы в сосуд Дьюара с жидким азотом. Такая методика позволяла обеспечить лучшую сохранность ткани, препятствуя кристаллизации при ее заморозке. Замороженные атеросклеротические бляшки хранили в морозильной камере при температуре  $-140^{\circ}\text{C}$ . Производили серийную резку образцов на криотоме (Microm HM 525, Thermo Scientific), помещая на стекло 8 срезов толщиной 5 мкм, толщина отсекаемого материала между серийными срезами составляла 400 мкм.

На первом этапе для оценки общей микроструктуры атеросклеротической бляшки производили окрашивание гематоксилин-эозином, для этого использовали гематоксилин Джилла (БиоВитрум, Россия) и водно-спиртовой концентрированный эозин, разбавленный в 25% этиловом спирте (БиоВитрум, Россия).

Фиксацию криозамороженных образцов после их резки для иммунотипирования проводили в течение 10 мин 4% параформальдегидом при использовании внутриклеточных маркеров, и ацетоном для поверхностных маркеров, с последующей трехкратной отмывкой (5 мин) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) на шейкере (Polymax 1040, Heidolph, 25 об/мин) при комнатной температуре.

Иммуногистохимическую реакцию выполняли с использованием набора Novolink Polymer Detection

Systems Novocastra (RE7150-CE, Leica Biosystems) согласно модифицированному протоколу производителя. После блокировки эндогенной пероксидазы 4% раствором пероксида водорода (Peroxidase Block) срезы дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере, производили блокировку неспецифического связывания антител 0,4% соевым раствором казеина со вспомогательными реагентами (Protein Block) в течение 1 ч. Отмывки после этой стадии перед обработкой срезов первичными антителами не выполняли. В качестве первичных антител использовали антитела Abcam к маркерам: эндопептидаз ЭЦМ ММП-2 (ab92536, 1:1000) и ММП-9 (ab38898, 1:1000); фенотипа остеогенной дифференцировки – RUNX2 (ab76956, 1:500); клеток мезенхимального ряда и синтетического фенотипа СГМК – виментин (ab16700, 1:1000); макрофагов CD68 (ab955 мышинное и ab125212 кроличье). Антитела разводили согласно протоколу производителя в 1% соевом растворе бычьего сывороточного альбумина. Инкубация с первичными антителами производилась в течение ночи в накрытом влажном коробе при температуре +4 °С. На следующий день срезы трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере и инкубировали с вторичными антителами против кролика (Novolink Polymer) в течение 30 мин. В случае с первичным антителом мыши (ab955) перед добавлением антител против кролика добавляли вторичное антитело кролика против мыши (Post Primary) и также инкубировали в течение 30 мин с последующей трехкратной отмывкой в фосфатно-солевом буфере. На каждом стекле выделяли по одному срезу с отрицательным контролем первичного и вторичного антител.

После трехкратной отмывки фосфатно-солевым буфером срезы обрабатывали 0,087% раствором диаминобензидина (после разведения 1,74% диаминобензидина в его растворителе из набора) в течение 2 мин. Затем срезы отмывали бидистиллированной водой и помещали в гематоксилин Джилла (БиоВитрум) на 10 мин. После подсинения срезов в проточной воде их обезвоживали в трех сменах 95% этанола (5 мин каждая), просветляли в 3 сменах ксилола (5 мин каждая), и заключали под покровное стекло (Витрогель, БиоВитрум). Готовые микропрепараты анализировали при помощи светового микроскопа (Axio Imager.A1, Carl Zeiss) и объектива EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27 (Carl Zeiss) на увеличении x200.

Для иммунофлуоресцентной реакции вышеуказанных 5 бляшек применяли следующие первичные кроличьи и мышинные антитела компании Abcam, разведенные в 1% соевом растворе бычьего сывороточного альбумина:  $\alpha$ -SMA (ab5694, 1:100) в сочетании с CD68

(ab955, 1:100), RUNX2 (ab76956, 1:100) или липофильным красителем Нильским красным (Nile Red, 1 мкг/мл),  $\alpha$ -SMA (ab7817, 1:200) в сочетании с виментином (ab16700, 1:1000), а также CD68 (ab955, 1:100) в сочетании с липофильным красителем Нильским красным (Nile Red, 1 мкг/мл). Типирование первичными антителами проводилось после фиксации тканей в ацетоне (10 мин), трехкратной отмывки в фосфатно-солевом буфере и блокирования неспецифического связывания 1% соевым раствором бычьего сывороточного альбумина (1 ч), продолжительность инкубации составляла 16 ч. Все указанные клеточные антигены после трехкратной отмывки в фосфатно-солевом буфере визуализировались при помощи меченных флюорофорами Alexa Fluor (488 и 555) вторичных антител козла против кролика (ab150077 или ab150078) и мыши (ab150113 или ab150114), разведенных в 1% соевом растворе бычьего сывороточного альбумина в соотношении 1:500 (инкубация в течение 1 ч при комнатной температуре). Для заключения использовалась среда ProLong Gold Antifade (Invitrogen). Готовые микропрепараты анализировали при помощи конфокального микроскопа (LSM 700, Carl Zeiss), ув. 200.

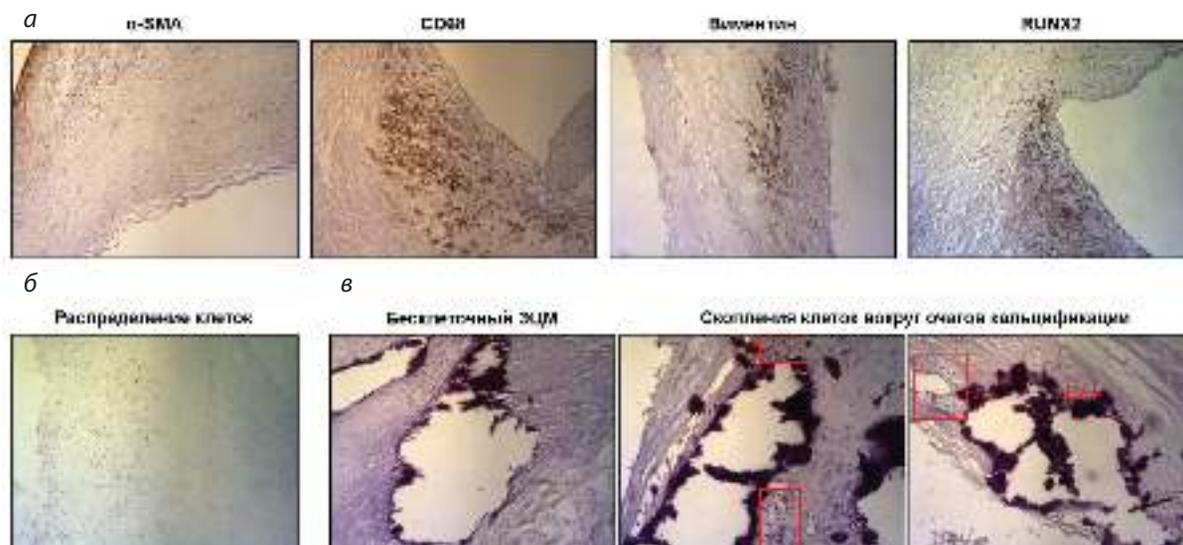
Подсчет доли положительных клеток на снимках проводился в программе ImageJ (National Institutes of Health) по следующему алгоритму: 1) разбиение изображения по каналам (Image -> Color -> Split Channels); 2) бинаризация изображения по каналу интереса (Image – Adjust – Threshold); 3) подсчет общего количества клеток по числу ядер на синем канале (Analyze -> Analyze Particles (size from 50 to infinity)); 4) подсчет соотношения положительно окрашенных клеток (по ко-локализации ядер клеток на синем канале с окрашиванием на красном или зеленом канале в зависимости от антитела) к общему количеству клеток (ядра, синий канал).

## Результаты и обсуждение

Иммуногистохимическое типирование показало наличие различных клеточных популяций, гетерогенно локализованных в составе атеросклеротической бляшки (рис. 1, а). В бляшках присутствовали как богатые клетками участки, так и обширные зоны, заполненные лишенным клеток массивом ЭЦМ (рис. 1, б). Наибольшую концентрацию клеток наблюдали в зоне, прилегающей к фиброзной покрывке (рис. 1, б). В некоторых бляшках визуализировались пустоты неправильной формы, образовавшиеся в результате выпадения кальция при ИГХ реакции (рис. 1, в). Вокруг этих полостей располагался как бесклеточный ЭЦМ, так и скопления клеток (рис. 1, б).

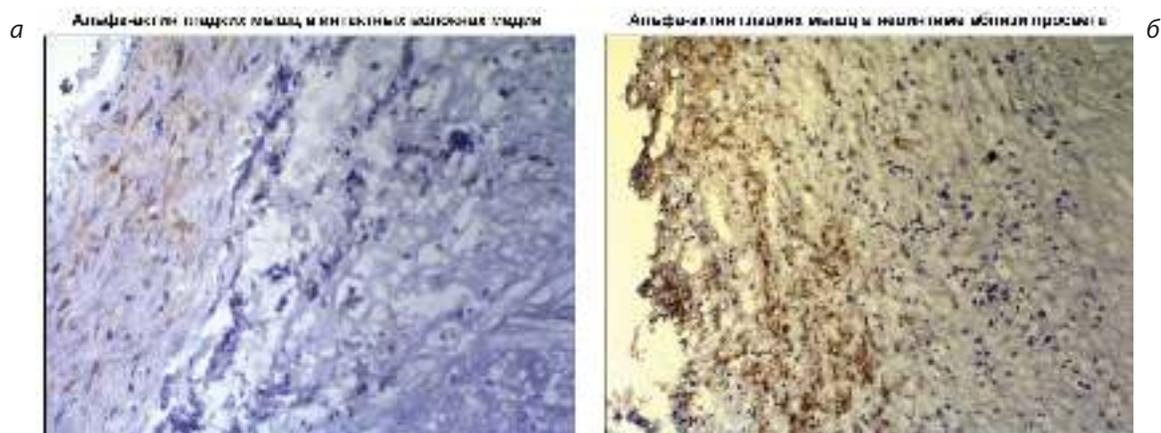
На первоначальном этапе развития атеросклероза после его запуска при нарушении целостности эндотелия и/или воспаления в адвентиции основной клеточной популяцией, вносящей вклад в формирование неинтимы, являются  $\alpha$ -SMA-положительные СГМК [10–12]. Положительно окрашенные на  $\alpha$ -SMA клетки были визуализированы во всех атеросклеро-

тических бляшках, они располагались послойно между эластическими волокнами интактной, эксплантированной при эндартерэктомии вместе с неинтимой меди (рис. 2, а), либо обнаруживались в виде скоплений в фиброзной покрывке или вблизи нее (рис. 2, б). Визуализация  $\alpha$ -SMA было ассоциировано с клетками и располагалось вокруг ядер либо диф-



**Рис. 1.** Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Иммуногистохимическое типирование клеточных популяций с окрашиванием ядер гематоксилином Джилла. Ув. 200.

а – различные клеточные популяции ( $\alpha$ -SMA-положительные клетки с сократительным фенотипом, CD68-положительные клетки с макрофагальным фенотипом, виментин-положительные клетки с синтетическим фенотипом, RUNX2-положительные клетки с остеогенным фенотипом) в составе атеросклеротической бляшки; б – участки богатые клеточными популяциями и полностью лишенные их; в – пустоты, образовавшиеся вследствие выпадения кальция при резке тканей и типировании.



**Рис. 2.** Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Иммуногистохимическое типирование антителами к маркеру сократительного фенотипа  $\alpha$ -SMA, с контрастированием ядер гематоксилином Джилла. Ув. 200.

а –  $\alpha$ -SMA-положительные клетки в составе интактных эластических волокон меди; б –  $\alpha$ -SMA-положительные клетки в составе фиброзной покрывки.

фузно по всей клетке, что отражало его специфичность (рис. 2, а, б).

В составе атеросклеротической бляшки СГМК постепенно меняют свой фенотип с сократительного на синтетический, что способствует синтезу ими образующих неоинтиму компонентов ЭЦМ и сопровождается постепенной утратой секреции  $\alpha$ -SMA [10–12]. Кроме того, этот же процесс способствует и формированию фиброзной покрывки, которая сдерживает ядро из содержащих липиды пенистых клеток, внеклеточных липидов и образовавшегося вследствие массивной гибели клеток детрита [10–12]. Классическими маркерами синтетического фенотипа *in vitro* являются коллаген I типа, ММП-2 и ММП-9 [10–12], однако эти белки входят в состав ЭЦМ и при иммуногистохимическом типировании не ассоциированы с клетками напрямую; кроме того, ММП также секретируются и другими клеточными популяциями, в особенности макрофагами [6]. Поэтому в качестве маркера синтетического фенотипа СГМК был выбран виментин, секреция которого в целом характерна для всех клеток мезенхимального ряда, но усиливается в СГМК при смене их фенотипа на синтетический [13, 14]. Секреция виментина наблюдалась в клетках, локализованных на границе с эластическими волокнами меди (рис. 3, а), либо, напротив, ближе к основной клеточной массе в неоинтиме (рис. 3, б), что сочеталось с располагавшейся вблизи бесклеточной массой ЭЦМ и может отражать активный синтез ЭЦМ на различных стадиях развития атеросклероза мигрировавшими из меди СГМК.

Работы последних лет показывают, что в зависимости от преобладания того или иного стимула дифференцировки СГМК способны приобретать не только синтетический, но также и макрофагальный, остео/хондрогенный и адипоцитарный фенотипы [10–12, 15]. С целью оценки данного феномена было выполнено иммуногистохимическое типирование маркера макрофагов сквенджер-рецептор CD68 и транскрипционный фактор остеогенной дифференцировки RUNX2.

На начальной стадии развития атеросклероза вследствие развития дисфункции и повреждения эндотелия моноциты мигрируют в неоинтиму, дифференцируются в макрофаги и поглощают задерживаемые вследствие связи с отрицательно заряженными протеогликанами ЭЦМ положительно заряженные апоВ-содержащие липопротеины [16, 17]. Мигрирующие в неоинтиму СГМК меди также контактируют с данными липопротеинами, поглощают их и оказываются вовлеченными в развитие провоспалительного микроокружения [18–20]. В то же время, в отличие от клеток миелоидного ряда, СГМК с прогрессированием атеросклеротического процесса теряют изначально более низкую способность к выбросу холестерина за счет снижения экспрессии мембранного транспортера ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1), гипосекретируют маркер сократительного фенотипа  $\alpha$ -SMA и начинают секретировать маркер макрофагов CD68 [18–20]. Считается, что около 20–40% СГМК в составе неоинтимы характеризуются детектируемой экспрессией CD68 [18–20].

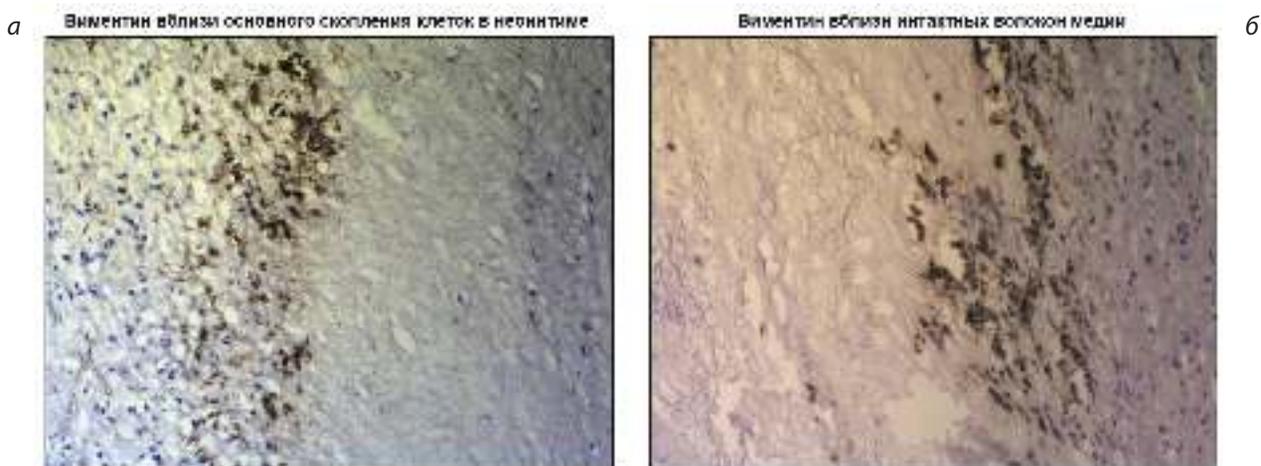


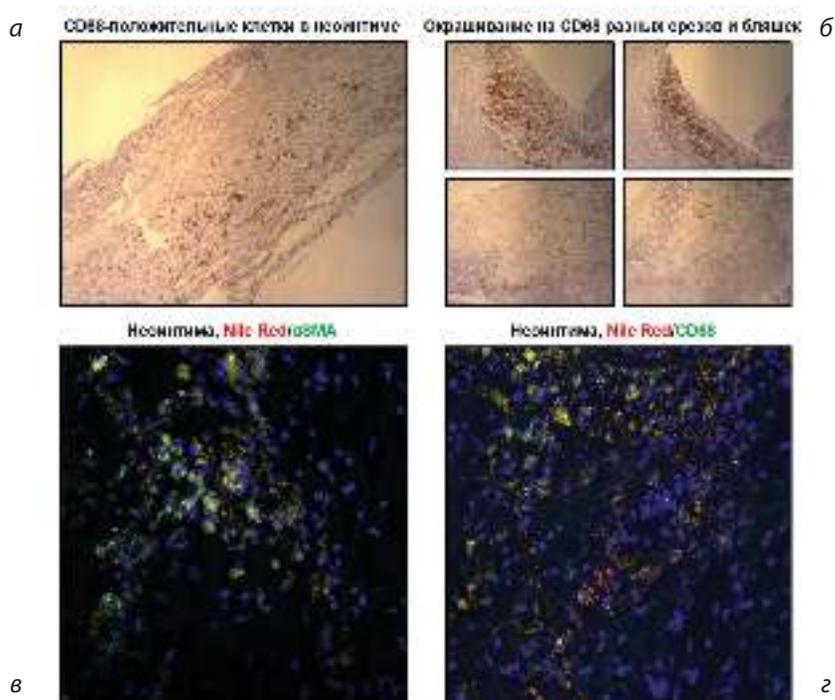
Рис. 3. Иммуногистохимическое типирование антителами к маркеру синтетического фенотипа виментину, с контрастированием ядер гематоксилином Джилла. Ув. 200.

а – секреция виментина в клетках, локализованных на границе с эластическими волокнами меди; б – секреция виментина в неоинтиме вблизи массивов бесклеточного экстрацеллюлярного матрикса.

CD68-положительные клетки наблюдали в толще атеросклеротической бляшки, в том числе вблизи фиброзной покрышки, но не между эластическими волокнами меди (рис. 4, а). Степень инфильтрации CD68-положительными клетками существенно варьировала между различными бляшками и относительно незначительно варьировала между различными срезами одной и той же бляшки по толщине (рис. 4, б). Как и в случае с  $\alpha$ -SMA, положительное типирование на CD68 наблюдалось исключительно возле ядер клеток и, как правило, отмечалось вокруг ядра либо было распределено по всей клетке, но не было локализовано изолированно внутри ядра, что подтверждает его специфичность (рис. 4, а, б). Однако, поскольку разные маркеры макрофагального фенотипа обладают различной чувствительностью и специфичностью, в особенности на различных стадиях макрофагальной дифференцировки СГМК, более правильным представляется использование липофильного красителя Нильского

красного (Nile Red), при помощи которого непосредственно визуализируется поглощение липидов СГМК, что является основой, а не отражением их макрофагального фенотипа. При сочетанном типировании бляшек антителами к  $\alpha$ -SMA либо CD68 и Нильским красным последний, как правило, локализуется в цитоплазме поглотивших липиды СГМК (рис. 4, в, г). При этом доля неинтимальных клеток, секретирующих  $\alpha$ -SMA или CD68 и содержащих в цитоплазме Нильский красный, составила 22% для  $\alpha$ -SMA и 17% для CD68, что согласуется с данными литературы и свидетельствует о том, что существенная часть пенистых клеток представляет собой не детерминированные макрофаги, а дифференцировавшиеся в макрофагальном направлении СГМК [18–20].

Сравнивая паттерны типирования бляшек антителами к  $\alpha$ -SMA, CD68 и виментину, можно отметить их дифференциальное расположение в различных слоях патологически измененной ткани сосудов. Так,



**Рис. 4.** Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Иммунотипирование антителами к маркеру макрофагального фенотипа CD68 и маркеру сократительного фенотипа  $\alpha$ -SMA. Ув. 200.

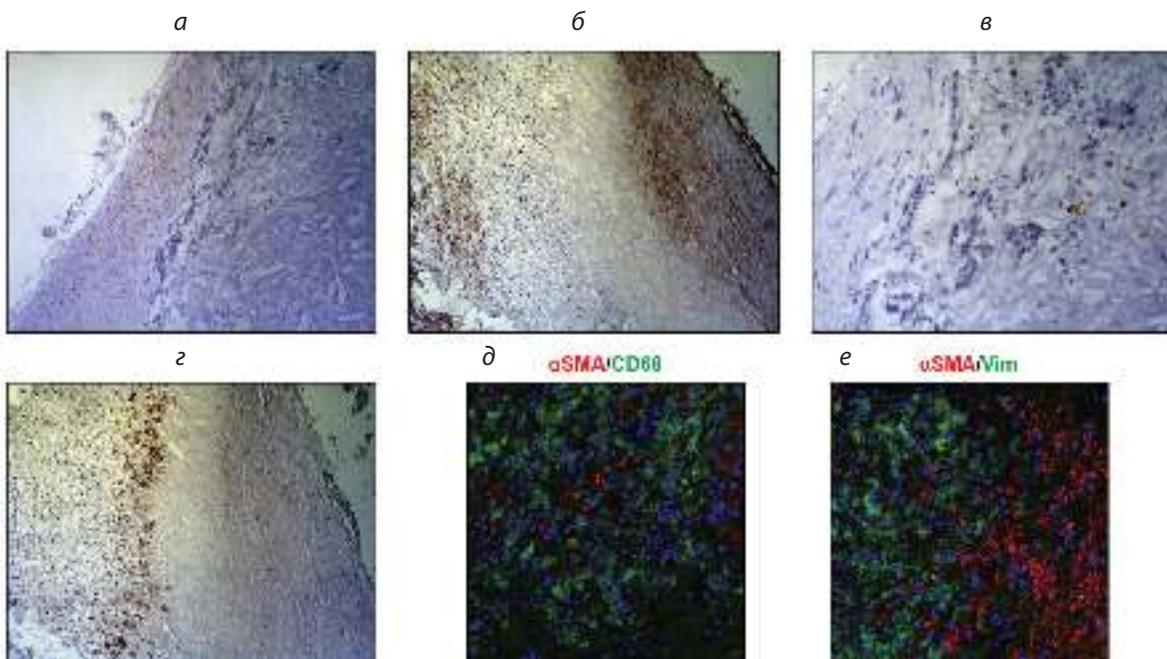
а – CD68-положительные клетки вблизи фиброзной покрышки, ядра контрастированы гематоксилином Джилла; б – разная степень инфильтрации CD68-положительными клетками в разных атеросклеротических бляшках, ядра контрастированы гематоксилином Джилла; в – сочетанное иммунофлуоресцентное типирование антителами к  $\alpha$ -SMA (зеленый цвет) и липофильным красителем Нильским красным (Nile Red, красный цвет). Ядра контрастированы 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (синий цвет); г – сочетанное иммунофлуоресцентное типирование антителами к CD68 (зеленый цвет) и липофильным красителем Нильским красным (Nile Red, красный цвет). Ядра контрастированы 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (синий цвет).

$\alpha$ -SMA в большинстве своем была локализована в зоне фиброзной покрышки (рис. 5, а) и послойно в области меди (рис. 5, б). Визуализация CD68, напротив, была характерна для неointимы и практически полностью отсутствовала в меди (рис. 5, в). Положительная реакция на виментин в наибольшем количестве отмечалась в прилегающей к меди либо к фиброзной покрышке неointиме (рис. 5, г). Следует подчеркнуть, что в составе неointимы присутствовало около 5% клеток, положительных на  $\alpha$ -SMA и CD68 (рис. 5, д), и около 9% клеток, положительных на  $\alpha$ -SMA и виментин (рис. 5, е), что свидетельствует о наличии переходного фенотипа у ряда клеток неointимы.

Остеогенная дифференцировка СГМК, сопровождающаяся развитием очагов кальцификации, также характерна для некоторых атеросклеротических бляшек. В экспериментах на апоЕ- и LDLR-нокаутных мышах было показано, что 30-55% от всех клеток неointимы положительны на транскрипционный фактор остеогенной дифференцировки RUNX2, при этом 75-90% из этих клеток происходят из сосудистого глад-

комышечного дифферона [21, 22]. В данном исследовании количество RUNX2 позитивно окрашенных клеток, также существенно варьировала в зависимости от степени кальцификации бляшки, локализуясь в толще неointимы ближе к просвету, но не в фиброзной покрышке или интактной меди (рис. 6, а). В составе бляшек наблюдались как клеточные популяции, положительные на RUNX2 и на  $\alpha$ -SMA (рис. 6, б), так и RUNX2-положительные клетки без признаков сократительного фенотипа (рис. 6, в).

ММП-9 наблюдалась в 5 бляшках из 16 проанализированных (31%), прямой связи секреции ММП-9 с нестабильностью бляшки, отражаемой вызываемой ОНМК, не наблюдалось (3/8 нестабильных бляшек и 2/8 стабильных). Следует отметить, что по данным литературы секреция как ММП-9, так и ММП-2 отмечается приблизительно в половине атеросклеротических бляшек сонных артерий, также без существенных различий в распространенности у пациентов с ОНМК и хронической ишемией головного мозга, не ставшей причиной ОНМК до каротидной эндартерэктомии [23].



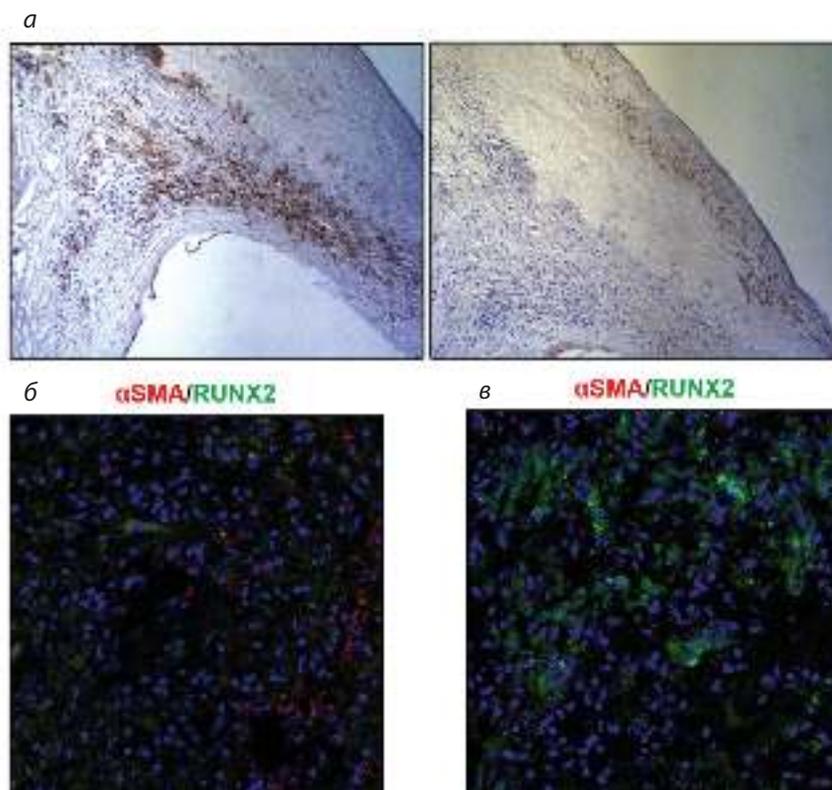
**Рис. 5.** Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Сравнение паттернов типирования бляшек антителами к  $\alpha$ -SMA, CD68 и VIM, с контрастированием ядер гематоксилином Джилла или DAPI. Ув. 200.

а –  $\alpha$ -SMA-положительные клетки в зоне фиброзной покрышки; б –  $\alpha$ -SMA-положительные клетки в области интактной меди; в – CD68 – положительные клетки в неointиме; г – виментин-положительные клетки в неointиме, прилегающей к фиброзной покрышке, и меди; д – клетки с переходным  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>-фенотипом в составе неointимы (макрофагальная дифференцировка сосудистых гладкомышечных клеток); е – клетки с переходным  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>виментин<sup>+</sup>-фенотипом в составе неointимы (синтетическая дифференцировка сосудистых гладкомышечных клеток).

Микроскопически, однако, визуализация ММП-2 и ММП-9 в таких бляшках колокализована с CD68-положительными клетками и ассоциирована с разрывом фиброзной покрышки [23]. В проведенном исследовании в ряде случаев наличие ММП-2 и ММП-9 было колокализовано с CD68-положительными клетками (рис. 7, а), однако это отмечалось далеко не всегда — приблизительно в половине полей зрения с большим количеством CD68-положительных клеток секреции указанных ММП не отмечалось (рис. 7, б). Колокализации ММП-2 и ММП-9 с  $\alpha$ -SMA- или виментин-положительными клетками выявлено не было (рис. 7, в).

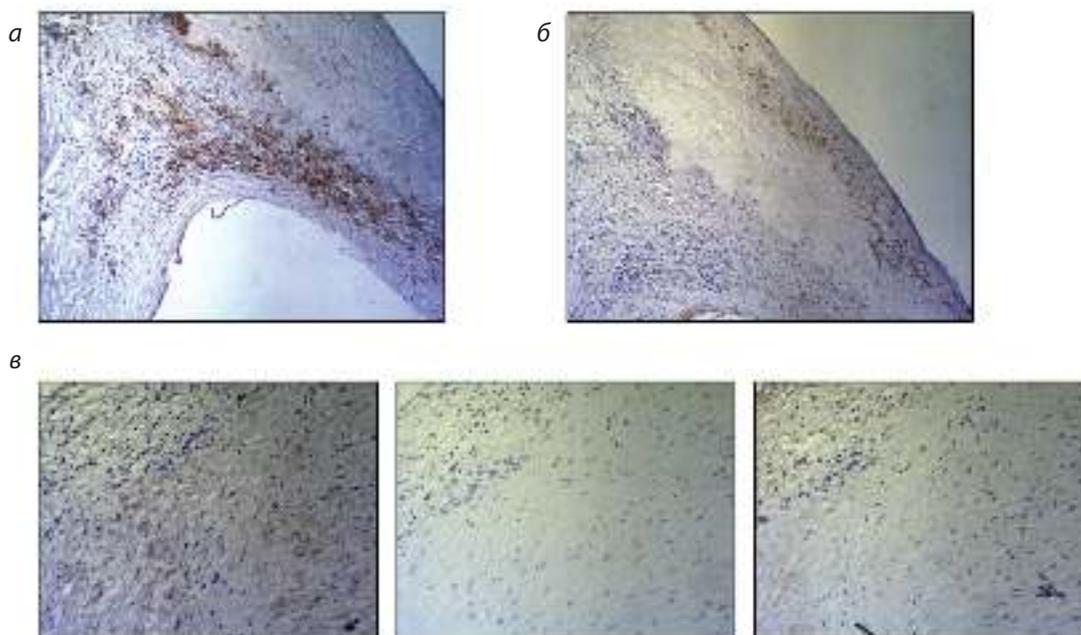
Результаты изучавших роль ММП-2 и ММП-9 в развитии атеросклероза работ оказались противоречивыми: с одной стороны, апоЕ- и ММП-2-нокаутные мыши характеризовались более медленным развитием атеросклероза [24], с другой стороны, богатые гладкомышечными клетками сегменты атеросклеротических

бляшек содержали большее количество ММП-2, что может свидетельствовать о стабилизирующей роли данной металлопротеиназы [25]. Аналогичное несоответствие результатов исследований было выявлено в отношении ММП-9: с одной стороны, апоЕ- и ММП-9-нокаутные мыши имели меньшее количество и объем атеросклеротических очагов с менее выраженными процессами инфильтрации макрофагами, депонирования коллагена и деградации эластических волокон [26], а высокая концентрация ММП-9 в атеросклеротических бляшках сонных артерий была ассоциирована с их нестабильностью, при этом ММП-9 в основном была локализована в области фиброзной покрышки и «плеч» бляшки [27]. В то же время в другой работе апоЕ- и ММП-9-нокаутные мыши, напротив, характеризовались большим объемом атеросклеротических бляшек и более высокой их нестабильностью, отражаемой количеством богатых гладкомышечными клетками глубоких фиброзных слоев [28].



**Рис. 6.** Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Иммунотипирование антителами к транскрипционному фактору остеогенной дифференцировки RUNX2. Ув. 200.

а – RUNX2 положительные клетки в толще неоинтимы; б – клетки с переходным  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>RUNX2<sup>+</sup>-фенотипом в составе неоинтимы (остеогенная дифференцировка сосудистых гладкомышечных клеток); в – RUNX2-положительные клетки без признаков сократительного фенотипа.



**Рис. 7.** Атеросклеротическая бляшка из сонной артерии. Иммуногистохимическая реакция на ММП-2 и ММП-9, с окрашиванием ядер гематоксилином Джилла. Ув. 200.

*а* – пример колокализации ММП-2 и ММП-9 с CD68- положительными клетками; *б* – ММП-2 и ММП-9, не колокализованные с CD68-положительными клетками; *в* – отсутствие колокализации ММП-2 и ММП-9 с  $\alpha$ -SMA- или виментин-положительными клетками.

### Заключение

Около трети каротидных атеросклеротических бляшек характеризуются повышенной секрецией эндопептидазами исключительно макрофагами, что отражает активно идущее ремоделирование неоинтимы. Несмотря на преимущественную локализацию СГМК сократительного фенотипа в интактной меди, а макрофагов – в зоне фиброзной покрышки, в неоинтиме детектируется определенное количество клеток, с двойным фенотипом сократительным и макрофагальным. Кроме того, существенная доля клеток в толще неоинтимы также имела двойной фенотип: сократительный и синтетический либо сократительный и остеогенный.

### Литература/References

- Hoffmann G.A., Wong J.Y., Smith M.L. On Force and Form: Mechano-Biochemical Regulation of Extracellular Matrix. *Biochemistry*. 2019; 58(47): 4710-20. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00219
- van Helvert S., Storm C., Friedl P. Mechanoreciprocity in cell migration. *Nat. Cell Biol.* 2018; 20(1): 8-20. doi: 10.1038/s41556-017-0012-0
- Kechagia J.Z., Ivaska J., Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20(8): 457-73. doi: 10.1038/s41580-019-0134-2
- Yuzhalin A.E., Lim S.Y., Kutikhin A.G., Gordon-Weeks A.N. Dynamic matrixome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. 2018; 1870(2): 207-28. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.09.002
- Ruddy J.M., Ikonomidis J.S., Jones J.A. Multidimensional Contribution of Matrix Metalloproteinases to Atherosclerotic Plaque Vulnerability: Multiple Mechanisms of Inhibition to Promote Stability. *J. Vasc. Res.* 2016; 53(1-2): 1-16. doi: 10.1159/000446703
- Johnson J.L. Metalloproteinases in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2017; 816: 93-106. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.09.007
- Loffek S., Schilling O., Franzke C.W. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”: Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur. Respir. J.* 2011; 38(1): 191-208. doi: 10.1183/09031936.00146510.
- Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8(3): 221-33. doi: 10.1038/nrm2125
- Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 2006; 69(3): 562-73. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002
- Durham A.L., Speer M.Y., Scatena M., Giachelli C.M., Shanahan C.M. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc. Res.* 2018; 114(4): 590-600. doi: 10.1093/cvr/cvy010
- Allahverdian S., Chaabane C., Boukais K., Francis G.A., Bochaton-Piallat M.L. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 2018; 114(4): 540-50. doi: 10.1093/cvr/cvy022
- Chistiakov D.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol. (Oxf)*. 2015; 214(1): 33-50. doi: 10.1111/apha.12466

13. Beamish J.A., He P., Kottke-Marchant K., Marchant R.E. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2010; 16(5): 467-91. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0630
14. Salabei J.K., Hill B.G. Autophagic regulation of smooth muscle cell biology. *Redox Biol.* 2015; 4: 97-103. doi: 10.1016/j.redox.2014.12.007
15. Chaabane C., Coen M., Bochaton-Piallat M.L. Smooth muscle cell phenotypic switch: implications for foam cell formation. *Curr. Opin. Lipidol.* 2014; 25(5): 374-9. doi: 10.1097/MOL.0000000000000113
16. Skalen K., Gustafsson M., Rydberg E.K., Hulten L.M., Wiklund O., Innerarity T.L. et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002; 417(6890): 750-4. doi: 10.1038/nature00804
17. Öörni K., Rajamäki K., Nguyen S.D., Lähdesmäki K., Plihtari R., Lee-Rueckert M. et al. Acidification of the intimal fluid: the perfect storm for atherogenesis. *J. Lipid Res.* 2015; 56(2): 203-14. doi: 10.1194/jlr.R050252
18. Allahverdian S., Chehroudi A.C., McManus B.M., Abraham T., Francis G.A. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation.* 2014; 129(15): 1551-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005015
19. Shankman L.S., Gomez D., Cherepanova O.A., Salmon M., Alencar G.F., Haskins R.M. et al. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat. Med.* 2015; 21(6): 628-37. doi: 10.1038/nm.3866
20. Pryma C.S., Ortega C., Dubland J.A., Francis G.A. Pathways of smooth muscle foam cell formation in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 2019; 30(2): 117-124. doi: 10.1097/MOL.0000000000000574
21. Naik V., Leaf E.M., Hu J.H., Yang H.Y., Nguyen N.B., Giachelli C.M. et al. Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an in vivo genetic fate mapping study. *Cardiovasc. Res.* 2012; 94(3): 545-54. doi: 10.1093/cvr/cvs126
22. Nguyen N., Naik V., Speer M.Y. Diabetes mellitus accelerates cartilaginous metaplasia and calcification in atherosclerotic vessels of LDLr mutant mice. *Cardiovasc. Pathol.* 2013; 22(2): 167-75. doi: 10.1016/j.carpath.2012.06.007
23. Heo S.H., Cho C.H., Kim H.O., Jo Y.H., Yoon K.S., Lee J.H. et al. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9. *J. Clin. Neurol.* 2011; 7(2): 69-76. doi: 10.3988/jcn.2011.7.2.69
24. Kuzuya M., Nakamura K., Sasaki T., Cheng X.W., Itoharu S., Iguuchi A. Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26(5): 1120-5. doi: 10.1161/01.ATV.0000218496.60097.e0
25. Sluijter J.P., Pulskens W.P., Schoneveld A.H., Velema E., Strijder C.F., Moll F. et al. Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. *Stroke.* 2006; 37(1): 235-9. doi: 10.1161/01.STR.0000196986.50059.e0
26. Luttun A., Lutgens E., Manderveld A., Maris K., Collen D., Carmeliet P. et al. Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation.* 2004; 109(11): 1408-14. doi: 10.1161/01.CIR.0000121728.14930.DE
27. Loftus I.M., Naylor A.R., Goodall S., Crowther M., Jones L., Bell P.R. et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke.* 2000; 31(1): 40-7. doi: 10.1161/01.STR.31.1.40
28. Johnson J.L., George S.J., Newby A.C., Jackson C.L. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005; 102(43): 15575-80. doi: 10.1073/pnas.0506201102

#### Сведения об авторах:

**Богданов Лев Александрович**, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза, отдел экспериментальной медицины НИИ КПССЗ, e-mail: bogdanovleone@gmail.com;

**Великанова Елена Анатольевна**, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины НИИ КПССЗ, e-mail: veliea@kemcardio.ru;

**Шшикова Дарья Кирилловна**, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза, отдел экспериментальной медицины НИИ КПССЗ, e-mail: shishkovadk@gmail.com;

**Шабарев Амин Рашитович**, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза, отдел экспериментальной медицины НИИ КПССЗ, e-mail: shabar@kemcardio.ru;

**Кутихин Антон Геннадьевич**, канд. мед. наук, зав. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза, отдел экспериментальной медицины НИИ КПССЗ, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.36-003.826+616.153.915]-092

Гуляева И.Л., Булатова И.А., Пестренин Л.Д.

## Роль васкулоэндотелиального фактора роста в патогенезе стеатоза печени и дислипидемии

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614000, Пермь, Россия, ул. Петропавловская, д. 26

**Цель исследования** – изучение роли васкулоэндотелиального фактора роста в патогенезе неалкогольного стеатоза печени и дислипидемии при метаболическом синдроме.

**Методика.** Обследовано 35 пациентов с неалкогольным стеатозом печени, в том числе 22 женщины и 13 мужчин. Группу контроля составили 12 сопоставимых по полу и возрасту лиц без патологии печени и признаков метаболического синдрома. Наличие жирового гепатоза подтверждали методом ультразвукового исследования. У пациентов с патологией печени рассчитывали индексы-предикторы стеатоза: Fatty Liver Index (FLI) и Hepatic Steatosis Index (HSI). У всех участников исследования определяли уровни провоспалительных цитокинов и васкулоэндотелиального фактора роста (ВЭФР), оценивали также липидный спектр крови и функциональные печеночные пробы.

**Результаты.** У пациентов со стеатозом печени наблюдалось значимое увеличение уровней провоспалительных цитокинов, ВЭФР, общего холестерина и липопротеинов низкой и очень низкой плотности. Индекс атерогенности также был значимо выше, чем в контрольной группе. Концентрация ВЭФР положительно коррелировала с показателями окружности талии, тимоловой пробы, уровнями общего холестерина, липопротеинов низкой плотности и индексом атерогенности. Чувствительность FLI составила 91,4%, HSI – 97,1%. При этом, значения FLI и HSI значимо коррелировали с уровнем ВЭФР.

**Заключение.** Полученные данные позволяют предположить, что ВЭФР, один из основных маркеров эндотелиальной дисфункции, может играть немаловажную роль в патогенезе неалкогольного стеатоза печени и дислипидемии у пациентов с метаболическим синдромом

**Ключевые слова:** неалкогольный стеатоз печени; атеросклероз; эндотелиальная дисфункция; метаболический синдром; васкулоэндотелиальный фактор роста

**Для цитирования:** Гуляева И.Л., Булатова И.А., Пестренин Л.Д. Роль васкулоэндотелиального фактора роста в патогенезе стеатоза печени и дислипидемии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 31-36.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.31-36

**Участие авторов:** концепция дизайн исследования – Гуляева И.Л., Булатова И.А., Пестренин Л.Д.; сбор материала – Пестренин Л.Д.; анализ и интерпретация данных – Гуляева И.Л., Булатова И.А., Пестренин Л.Д.; написание текста – Гуляева И.Л., Булатова И.А., Пестренин Л.Д.; редактирование текста – Гуляева И.Л., Булатова И.А.; Обсуждение окончательной версии статьи – Гуляева И.Л., Булатова И.А.

**Для корреспонденции:** Гуляева Инна Леонидовна, e-mail: pimenova774@yandex.ru

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

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

Поступила 10.01.2020

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Gulyaeva I.L., Bulatova I.A., Pestrenin L.D.

### Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of hepatic steatosis and dyslipidemia

Academician E.A Vagner Perm State Medical University,  
Petropavlovskaya Str. 26, Perm 614000, Russia

**The aim** of the study was to assess the role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of nonalcoholic hepatic steatosis and dyslipidemia in patients with signs of metabolic syndrome.

**Methods.** 35 patients with nonalcoholic fatty liver disease, including 22 women and 13 men, were evaluated. The sex- and age-matched control group consisted of 12 people without liver pathology and metabolic syndrome criteria. Presence of hepatic steatosis was confirmed by an ultrasound examination. The Fatty Liver Index (FLI) and the Hepatic Steatosis Index (HSI) were calculated for patients with hepatic steatosis. Concentrations of proinflammatory cytokines and VEGF were measured for all participants. Also, blood biochemistry, including the lipid profile and liver function tests, was analyzed.

**Results.** In patients with hepatic steatosis, levels of proinflammatory cytokines and VEGF were significantly increased. Also, concentrations of total cholesterol, low-density lipoproteins, and very low-density lipoproteins were higher in patients with the liver pathology than in the control group. Atherogenic coefficient was increased in hepatic steatosis. Significant correlations were observed between VEGF and waist circumference, thymol test, total cholesterol, low-density lipoproteins, very low-density lipoproteins, and atherogenic coefficient. Sensitivity of FLI and HIS was 91.4% and 97.1%, respectively. Also, FLI significantly correlated with HSI and VEGF level.

**Conclusion.** The study suggested that VEGF, of the main markers of endothelial dysfunction, plays an important role in the pathogenesis of nonalcoholic hepatic steatosis and dyslipidemia in patients with signs of metabolic syndrome.

**Keywords:** nonalcoholic fatty liver disease; atherosclerosis; endothelial dysfunction; metabolic syndrome; vascular endothelial growth factor

**For citation:** Gulyaeva I.L., Bulatova I.A., Pestrenin L.D. Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of hepatic steatosis and dyslipidemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 31-36. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.31-36

**Contribution:** research concept and design – Gulyaeva I.L., Bulatova I.A., Pestrenin L.D.; material collecting – Pestrenin L.D.; data analysis and interpretation – Gulyaeva I.L., Bulatova I.A., Pestrenin L.D.; writing text – Gulyaeva I.L., Bulatova I.A., Pestrenin L.D.; text editing – Gulyaeva I.L., Bulatova I.A. Approval of the final version of the article – all co-authors.

**For correspondence:** Inna L. Gulyaeva, Doctor of Medical Sciences, Professor, head of pathological physiology department, «Federal State Budgetary Educational Institution «Vagner Perm State Medical University»; 26 Petropavlovskaya Str., Perm 614000, Russia, e-mail: pimenova774@yandex.ru

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

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

#### Information about the authors:

Gulyaeva I.L., <https://orcid.org/0000-0001-7521-1732>

Bulatova I.A., <https://orcid.org/0000-0002-1112-6966>

Pestrenin L.D., <https://orcid.org/0000-0002-1786-4329>

Received 10.01.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

Согласно результатам Всероссийского исследования DIREG 2, неалкогольная жировая болезнь печени встречается более чем у трети взрослого населения. В то же время у больных с метаболическим синдромом распространенность стеатоза печени значительно выше и достигает 70-90%.

Известно, что печень играет важную роль в липидном обмене, в том числе в обмене холестерина. Это позволяет предположить, что нарушение функции печени при жировом гепатозе может способствовать формированию дислипидемии. Также было установлено, что неалкогольная жировая болезнь печени сопровождается развитием эндотелиальной дисфункции, которая, в свою очередь, является одним из основных патогенетических факторов развития атеросклероза [1]. Особенно интересным представляется тот факт, что нарушения функции эндотелия выявляются еще до формирования морфологических изменений, характерных для стеатоза печени и атеросклероза. Таким образом, представляются актуальными исследования, направленные на изучение роли дисфункции эндотелия

в формировании неалкогольного жирового гепатоза и дислипидемии.

**Цель исследования** – оценка васкулоэндотелиального фактора роста как маркера дисфункции эндотелия, и определение его роли в формировании и прогрессировании неалкогольного стеатоза печени и дислипидемии в рамках метаболического синдрома.

## Методика

Обследованы 35 больных (22 женщины и 13 мужчин) с неалкогольной жировой болезнью печени – стеатозом печени. Средний возраст пациентов –  $43,9 \pm 10,8$  года. У всех пациентов был выявлен метаболический синдром. Наличие метаболического синдрома у пациентов подтверждали в соответствии с Российскими клиническими рекомендациями: основной критерий – окружность талии более 80 см у женщин и более 94 см у мужчин; дополнительные критерии: уровень АД >140 и 90 мм рт. ст.; повышение уровня триглицеридов (>1,7 ммоль/л); снижение уровня ХС ЛПВП (<1,0 ммоль/л у мужчин; <1,2 ммоль/л у женщин); повышение уровня ХС ЛПНП <3 ммоль/л;

нарушение толерантности к глюкозе; гликемия натощак. В группу контроля вошли 12 человек сопоставимых по полу и возрасту с группой пациентов без патологии печени, дислипидемии и иной патологии, ассоциированной с метаболическим синдромом. Все участники получили необходимые сведения о методике и результатах обследования и подписали информированное добровольное согласие.

Наличие стеатоза печени подтверждали методом ультразвукового исследования. В исследование не включали пациентов с жировым гепатозом алкогольной и лекарственной этиологии, которая устанавливалась во время сбора анамнеза.

У пациентов с патологией печени также рассчитывали индексы-предикторы стеатоза печени: Fatty Liver Index [2] и Hepatic Steatosis Index [2].

Формула для расчета Fatty Liver Index (FLI) включает такие показатели, как индекс массы тела (ИМТ), окружность талии, уровень триглицеридов и гамма-глутамилтранспептидазы. Значение FLI < 30 исключает наличие стеатоза печени, 30–60 – устанавливает наличие стеатоза вероятно, > 60 – подтверждает наличие стеатоза. Согласно исследованию Bedogni с соавт., чувствительность FLI составляет 87,0%, специфичность – 64,0% [2].

Для вычисления Hepatic Steatosis Index (HSI) необходимы АЛТ/АСТ соотношение, ИМТ, пол обследуемого и информации о наличии или отсутствии сахарного диабета у пациента. HSI < 30 исключает наличие стеатоза, > 36 – подтверждает жировой гепатоз печени. Согласно данным Lee с соавт., чувствительность метода составляет 93,1%, специфичность – 92,4% [3]. Для оценки наличия и выраженности ожирения рассчитывали индекс массы тела, а также измеряли окружность талии.

Биохимическое исследование крови включало оценку показателей липидного спектра (общий холе-

стерин, триглицериды, липопротеины высокой плотности, липопротеины низкой плотности и липопротеины очень низкой плотности) и функциональных печеночных проб (аланиновая аминотрансфераза (АЛТ), аспарагиновая аминотрансфераза (АСТ), общий билирубин, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтранспептидаза и тимоловая проба). На основании полученных данных рассчитывали коэффициент атерогенности по общепринятой формуле.

Для оценки функционального состояния эндотелия определяли уровни фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкина 6 (ИЛ6) и васкулоэндотелиального фактора роста (ВЭФР). Для этого проводили иммуноферментный анализ крови на планшетном фотометре Stat-Fax-2100» (США) с использованием соответствующих наборов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Статистическая обработка данных проведена в программе «STATISTICA» (версия 7.0). Количественные параметры представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (25% – 75%). Значимость различий независимых групп оценивали с помощью критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Для изучения взаимосвязей вычисляли коэффициенты корреляции Спирмена с определением уровней значимости.

### Результаты исследования

Концентрация ФНО- $\alpha$  и ИЛ6 у пациентов с неалкогольным жировым гепатозом была значимо выше, чем у здоровых обследуемых ( $p=0,03$  и  $p=0,009$  соответственно). Уровень ВЭФР у больных с патологией печени также был значимо выше, чем в контрольной группе ( $p=0,04$ ). Содержание провоспалительных цитокинов и ВЭФР представлено в табл. 1.

Показатели липидного спектра у пациентов с жировым гепатозом значимо отличались от соответствующих показателей контрольной группы. У обследо-

Таблица 1

**Провоспалительные цитокины и васкулоэндотелиальный фактор роста в контрольной группе и у пациентов со стеатозом печени (Me, 25 и 75 перцентили)**

Показатели	Контрольная группа (n=12)	Пациенты со стеатозом печени (n=35)	p
ФНО- $\alpha$ , пг/мл	0 (0; 0,02)	1,1 (0; 3,45)	0,03*
Интерлейкин, пг/мл	0 0	0,8 (0; 2,4)	0,009*
Васкулоэндотелиальный фактор роста	96,3 (6,6; 187,4)	161,0 (82,2; 260,5)	0,04*

Примечание. \* – статистически значимые различия.

ванных больных наблюдался атерогенный тип дислипидемии, характеризующийся увеличением уровня общего холестерина, триглицеридов, ЛПНП и ЛПОНП, а также снижением содержания ЛПВП. Медиана коэффициента атерогенности у пациентов с патологией печени оказалась выше 3,0, что свидетельствует о наличии риска развития атеросклероза более, чем у половины обследованных (табл. 2).

В нашем исследовании у 91,4% пациентов с патологией печени показатель FLI был выше 60, что подтверждает наличие жирового гепатоза. У остальных 8,6% FLI находился в диапазоне от 30 до 60, т.е. стеатоз печени был вероятен. Полученные результаты согласуются с данными литературы [2]. Hepatic Steatosis Index (HSI) был выше 36 и, таким образом, подтвердил наличие стеатоза печени у 34 человек из 35 (97,1%). У одного пациента HSI находился в диапазоне от 30 до 36, что не исключает жировой гепатоз. Чувствительность данного индекса оказалась сопоставима с данными литературы [3].

Уровень ВЭФР статистически значимо коррелировал с окружностью талии ( $r=0,44$ ;  $p=0,02$ ), тимоловой пробой ( $r=0,9$ ;  $p=0,02$ ) и уровнем общего холестерина ( $r=0,42$ ;  $p=0,02$ ). В то же время, у пациентов с HSI > 36 концентрация васкулоэндотелиального роста коррелировала с значением HSI ( $r=0,46$ ;  $p=0,02$ ). Также наблюдалась значимая взаимосвязь FLI и содержания ВЭФР ( $r=0,88$ ;  $p=0,04$ ). Корреляции между уровнем ВЭФР и такими антропометрическими показателями, как масса тела и индекс массы тела, выявлено не было (табл. 3).

Также была выделена группа пациентов (32 человека) с окружностью талии, соответствующей критериям метаболического синдрома (более 88 см у женщин и более 102 см у мужчин). У этих больных уровень показатель ВЭФР статистически значимо коррелировал с содержанием общего холестерина ( $r=0,46$ ;  $p=0,02$ ), ЛПНП ( $r=0,44$ ;  $p=0,03$ ) и индексом атерогенности ( $r=0,49$ ;  $p=0,03$ ).

### Обсуждение

*Дисфункция эндотелия и стеатоз печени.* В нашем исследовании у пациентов с неалкогольным стеатозом печени уровни провоспалительных цитокинов и ВЭФР были значимо повышены, что может свидетельствовать о развитии дисфункции эндотелия при этой патологии. Полученные нами данные согласуются с результатами ряда других исследований, подтвердивших наличие эндотелиальной дисфункции при стеатозе печени и функциональными методами [4, 5]. Положительная корреляция концентрации ВЭФР и тимоловой пробы, ВЭФР и Hepatic Steatosis Index также может свидетельствовать о взаимосвязи эндотелиальной дисфункции и стеатоза печени.

Основным механизмом, участвующим в развитии эндотелиальной дисфункции при метаболическом синдроме, является инсулинорезистентность. В норме инсулин стимулирует высвобождение эндотелиального NO через  $Ca^{2+}$  – независимый путь. Нарушение этого механизма при инсулинорезистентности приводит к повреждению эндотелия и невозможности эффективной вазодилатации [6]. В ряде исследований, про-

Таблица 2

#### Показатели липидного спектра в контрольной группе и у пациентов со стеатозом печени (Me, 25 и 75 перцентили)

Показатели (в ммоль/л)	Контрольная группа (n=12)	Пациенты с стеатозом печени (n=35)	p
Общий холестерин,	4,24 (3,27;4,82)	5,58 (4,64;6,28)	<0,001*
Триглицериды	0,86 (0,77;1,32)	1,64 (1,30;2,29)	<0,001*
Липопротеины высокой плотности	1,56 (1,37;1,79)	1,26 (1,11;1,41)	0,005*
Липопротеины низкой плотности	2,71 (2,19;3,15)	3,42 (3,0;4,30)	0,004*
Липопротеины очень низкой плотности	0,39 (0,35;0,60)	0,90 (0,70;0,97)	<0,001*
Коэффициент атерогенности	1,75 (1,50;1,91)	3,20 (2,80;3,90)	<0,001*

Примечание. \* – статистически значимые различия.

веденных на крысах с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) и метаболическим синдромом, было показано, что дисфункция эндотелия возникает еще до начала развития воспаления и фиброза в печени. Нарушение функции синусоидального эндотелия, сопровождающееся снижением продукции оксида азота (NO), приводит к увеличению внутрипеченочного сосудистого сопротивления и активации звездчатых клеток печени [6].

В то же время, гиперпродукция ВЭФР с активацией ангиогенеза в печени, также способствует увеличению внутрипеченочного сосудистого сопротивления [7]. Формирующаяся портальная гипертензия препятствует нормальной регенерации печени и способствует прогрессированию НАЖБП [6]. При этом в исследовании, выполненном на модели НАЖБП у мышей, было обнаружено, что повреждение эндотелиоцитов печеночных синусоидов присутствует уже на стадии стеатоза, т.е., до активации клеток Купфера и звездчатых клеток печени, которые играют важнейшую роль в развитии воспаления и фиброза в печени. Это свидетельствует о том, что синусоидальные эндотелиальные клетки могут выступать в качестве «привратника» в процессе перехода стеатоза в стеатогепатит. Кроме того, недавно было установлено, что фиброз может быть вызван аномальной гиперкоагуляцией. Это указывает на теоретически возможный сценарий, при котором потеря антикоагулянтных свойств эндотелия (как проявление эндотелиальной дисфункции) может играть роль в фиброгенезе даже при НАЖБП [8]. Переход стеатоза в стеатогепатит в настоящее время объясняется увеличением уровней ФНО- $\alpha$  и свободных жирных кислот, активацией цитохрома P450 и перекисного окисления липидов, накоплением свободных радикалов. Кроме этого, повышенные концентрации ВЭФР также могут играть немаловажную роль в развитии и поддержании воспаления путем увеличения сосудистой проницаемости и хемотаксиса гранулоцитов и макрофагов.

*Влияние НАЖБП на дисфункцию эндотелия.* Образование свободных радикалов и перекисное окисление липидов при НАЖБП приводят к повреждению митохондрий с последующим развитием гипоксии. При этом, как свободнорадикальное повреждение, так и гипоксия являются одними из основных причин эндотелиальной дисфункции.

Также в эксперименте было показано, что стеатоз вызывает увеличение механической резистентности внутрипеченочных сосудов, независимо от функциональных изменений, индуцированных инсулинорезистентностью. У крыс с жировым гепатозом микроцир-

куляция и тканевая оксигенация в печени были значительно снижены [8].

*Дисфункция эндотелия и атеросклероз.* В ходе нашего исследования также было установлено, что у пациентов со стеатозом печени и окружностью талии, соответствующей критериям метаболического синдрома, уровни ВЭФР значимо коррелировали с некоторыми показателями липидного спектра, в том числе и с индексом атерогенности. Роль дисфункции эндотелия в атерогенезе уже была установлена [1, 9]. Однако наши данные позволяют предположить, что и ВЭФР, как один из маркеров эндотелиальной дисфункции, может играть роль в патогенезе атеросклероза.

Как известно, развитие атеросклероза связано с увеличением фракции липопротеинов низкой плотности, особенно модифицированных путем перекисного окисления липидов (которое является одним из важнейших компонентов развития и прогрессирования НАЖБП), гликозилирования белковой части (при сахарном диабете) и др. Модифицированные ЛПНП поглощаются макрофагами, поступают в интиму сосудов и разрушаются лизосомальными ферментами фагоцитов. Холестерин накапливается в виде эфиров, образуются пенистые клетки и так называемое липидное пятно. Далее под влиянием цитокинов и факторов роста происходит миграция гладкомышечных клеток в липидное пятно, их пролиферация и синтез коллагена. Таким образом, можно предположить, что более высокие концентрации ВЭФР способствуют более быстрой трансформации липидного пятна в атеросклеротическую бляшку. При этом в ряде исследований было установлено, что повышение содержания ВЭФР увеличивает неоваскуляризацию бляшки, приводя к ее нестабильности [10].

*Влияние дислипидемии на дисфункцию эндотелия.* A.D. Blann и соавт. обследовали здоровых людей, паци-

Таблица 3

**Взаимосвязи ВЭФР, биохимических показателей и данных антропометрии у пациентов с неалкогольным жировым гепатозом, n=35**

Показатели	r	p
ВЭФР и окружность талии	0,44	0,02*
ВЭФР и масса тела	0,35	0,7
ВЭФР и индекс массы тела	0,3	0,13
ВЭФР и холестерин	0,42	0,02*
ВЭФР и тимоловая проба	0,9	0,02*

Примечание. \* – статистически значимые различия.

ентов с неосложненной гиперлипидемией и атеросклерозом. В результате проведенного исследования было установлено, что уровни ВЭФР были значимо повышены при неосложненной гиперлипидемии и атеросклерозе по сравнению с группой контроля. Кроме того, у пациентов с неосложненной гиперлипидемией уровни общего холестерина и ВЭФР значимо уменьшились после гиполипидемической терапии, что может свидетельствовать о влиянии дислипидемии на дисфункцию эндотелия [9].

### Выводы

1. Увеличение уровня васкулоэндотелиального фактора роста — один из значимых элементов патогенеза неалкогольного стеатоза печени.

2. Взаимосвязь концентрации васкулоэндотелиального фактора роста и дислипидемии может свидетельствовать как о потенциальной роли атеросклероза в стимуляции ангиогенеза и ремоделирования сосудов, так и о роли дисфункции эндотелия в развитии атеросклероза.

### Литература

1. Воробьева Е.Н., Воробьев Р.И., Шарлаева Е.А. и др. Дисфункция эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях: факторы риска, методы диагностики и коррекции. *Сибирский биологический журнал*. 2016; 2(1): 21-40.
2. Bedogni G., Bellentani S., Miglioli L., Masutti F., Passalacqua M., Castiglione A. et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC gastroenterology*. 2006; 6(33). doi: 10.1186/1471-230X-6-33.
3. Lee J.-H., Kim D., Kim H.J. et al. Hepatic steatosis index: A simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive and Liver Disease*. 2010; 42(7): 503-8.
4. Пивторак Е.В. Нарушения функции эндотелия у больных неалкогольной жировой болезнью печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2014; 2: 63.
5. Cetindagli I., Kara M., Tanoglu A. et al. Evaluation of endothelial dysfunction in patients with nonalcoholic fatty liver disease: Association of selenoprotein P with carotid intima-media thickness and endothelium-dependent vasodilation. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2017; 28(3): 290-1.
6. Драпкина О.М., Деева Т.А., Ивашкин В.Т. Оценка эндотелиальной функции и степени апоптоза у пациентов с метаболическим синдромом и неалкогольной жировой болезнью печени. *Терапевтический архив*. 2015; 87(5): 76-83.
7. Bosch J., Abraldes J.G., Fernández M., García-Pagán J.C. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in

the treatment of portal hypertension. *Journal of Hepatology*. 2010; 53(3): 558-67.

8. Pasarin M., Abraldes J.G., Liguori E. et al. Intrahepatic vascular changes in non-alcoholic fatty liver disease: Potential role of insulin-resistance and endothelial dysfunction. *World Journal of Gastroenterology*. 2017; 23(37): 6777-87.
9. Mazidi M., Rezaiee, P. Kengned A.P. et al. VEGF, the underlying factor for metabolic syndrome; fact or fiction? *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2017; 11(1): 61-64.
10. Захарова Н.Б., Воскресенская О.Н., Тарасова Ю. Ангиогенез и фактор роста эндотелия сосудов при цереброваскулярной патологии. *Врач*. 2014; 10: 12-14. P. et al. VEGF, the underlying factor for metabolic syndrome; fact or fiction? *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2017; 11(1): 61-4.

### References

1. Vorob'eva E.N., Vorob'ev R.I., Sharlaeva E.A. et al. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: risk factors, methods of diagnosis and correction. *Sibirskij biologicheskij zhurnal*. 2016; 2(1): 21-40. (in Russian)
2. Bedogni G., Bellentani S., Miglioli L. et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterology*. 2006; 6: 33.
3. Lee J.-H., Kim D., Kim H.J. et al. Hepatic steatosis index: A simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive and Liver Disease*. 2010; 42(7): 503-8.
4. Pivtorak E.V. Disorders of endothelium function in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2014; 2: 63. (in Russian)
5. Cetindagli I., Kara M., Tanoglu A. et al. Evaluation of endothelial dysfunction in patients with nonalcoholic fatty liver disease: Association of selenoprotein P with carotid intima-media thickness and endothelium-dependent vasodilation. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2017; 28(3): 290-1.
6. Драпкина О.М., Деева Т.А., Ивашкин В.Т. Assessment of endothelium function and degree of apoptosis in patients with metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Терапевтический архив*. 2015; 87(5): 76-83. (in Russian)
7. Bosch J., Abraldes J.G., Fernández M., García-Pagán J.C. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension. *Journal of Hepatology*. 2010; 53(3): 558-67.
8. Pasarin M., Abraldes J.G., Liguori E. et al. Intrahepatic vascular changes in non-alcoholic fatty liver disease: Potential role of insulin-resistance and endothelial dysfunction. *World Journal of Gastroenterology*. 2017; 23(37): 6777-87.
9. Mazidi M., Rezaiee, P. Kengned A.P. et al. VEGF, the underlying factor for metabolic syndrome; fact or fiction? *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2017; 11(1): 61-4.
10. Zaharova N.B., Voskresenskaya O.N., Tarasova YU. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor in cerebrovascular pathology. *Vrach*. 2014; 10: 12-14. (in Russian)

### Сведения об авторах:

**Гуляева Инна Леонидовна**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии, e-mail: pimenova774@yandex.ru;  
**Булатова Ирина Анатольевна**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нормальной физиологии, e-mail: bula.1977@mail.ru;  
**Пестренин Лев Дмитриевич**, аспирант каф. патологической физиологии, e-mail: levpestrenin@gmail.com

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Геворкян Н.М.<sup>1</sup>, Тишевская Н.В.<sup>2</sup>, Бабаева А.Г.<sup>3</sup>

## Парадоксальная рефрактерность, возникающая при аллогенном переносе животным с аллоксановым диабетом суммарной РНК лимфоцитов селезенки вылеченных особей

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Россия, 119121, Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8;

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

<sup>3</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», 117418, Москва, Россия, ул. Цюрупы, д. 3

Ранее нами было показано, что препараты аллогенной суммарной РНК, выделенной из лимфоидных и стволовых клеток здоровых животных, вызывают нормализацию уровня глюкозы крови у крыс со стойким аллоксановым сахарным диабетом.

**Цель исследования** – выяснение влияния суммарной РНК лимфоцитов селезенки крыс, ранее перенесших стойкий аллоксановый диабет, на особенности течения экспериментального аллоксанового диабета у животных.

**Методика.** Эксперимент выполнен на 35 белых беспородных крысах-самках массой 250–280 г: 5 интактных животных, 20 – с экспериментальным аллоксановым сахарным диабетом и 10 животных, ранее перенесших стойкий аллоксановый диабет, у которых уровень глюкозы крови был полностью нормализован введением суммарных РНК клеток костного мозга, селезенки и поджелудочной железы. Диабет у этих животных моделировали однократным подкожным введением полного адьюванта Фрейнда (0,5 мл на крысу) и последующим подкожным введением аллоксана тригидрата в дозе 200 мг/кг. Достигнутая нормогликемия у животных подтверждалась в течение последующих 60 сут. Из селезенки и костного мозга этих животных методом фенол-хлороформной экстракции была выделена суммарная РНК. На 20 крысах с экспериментальным аллоксановым сахарным диабетом изучали эффекты однократного внутрибрюшинного введения полученной суммарной РНК (15 мкг/100 г массы тела животного).

**Результаты.** Обнаружено, что при введении суммарной РНК селезенки крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, животным с аллоксановым диабетом у последних развивалась стойкая и длительная рефрактерность к лечению терапевтическими препаратами РНК.

**Заключение.** 1. Выявлен феномен повышенной чувствительности крыс с аллоксановым диабетом к действию суммарной РНК селезенки животных, ранее перенесших аллоксановый диабет. 2. Предполагаемой причиной рефрактерности является клональный компонент суммарной РНК CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитов памяти из селезенки животных, ранее перенесших аллоксановый диабет. 3. Предполагается наличие механизма адресного взаимодействия отдельных компонентов суммарной РНК селезенки крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, с их лимфоцитами-мишенями в организме реципиентов с аллоксановым диабетом.

**Ключевые слова:** рефрактерность; экспериментальный сахарный диабет; аллоксан, лимфоидные клетки; суммарная РНК; адоптивная иммунотерапия; аллогенный перенос; селезенка; костный мозг

**Для цитирования:** Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г. Парадоксальная рефрактерность, возникающая при аллогенном переносе животным с аллоксановым диабетом суммарной РНК лимфоцитов селезенки вылеченных особей.

*Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 37-46.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.37-46

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

**Для корреспонденции:** Геворкян Нина Михайловна, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

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

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

Поступила 03.06.2020

Принята к печати 16.10.2020.

Опубликована 26.11.2020

Gevorkyan N.M.<sup>1</sup>, Tishevskaya N.V.<sup>2</sup>, Babaeva A.G.<sup>3</sup>**Paradoxical refractoriness developing with the allogeneic transfer of splenic lymphocyte total RNA from animals with treated alloxan diabetes to animals with untreated diabetes**<sup>1</sup>V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry,  
Pogodinskaya Str. 10, Moscow, 119121, Russia;<sup>2</sup>South Ural State Medical University,  
Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk, 454092, Russia;<sup>3</sup>Research Institute of Human Morphology,  
Tsuruyupy Str. 3, Moscow, 117418, Russia

**Introduction.** Earlier we have shown that preparations of allogeneic total RNA from lymphoid and stem cells of healthy animals contribute to normalization of blood glucose levels in white outbred rats with persistent alloxan-induced diabetes mellitus.

**The aim** of this study was to find out whether allogeneic total RNA isolated from the spleen of rats treated for alloxan diabetes affects its course, as determined by changes in blood glucose, in animals with persistent alloxan diabetes.

**Methods.** Experiments were performed on 35 white outbred female rats weighing 250-280 g. Rats were divided into intact animals (n=5), rats with experimental alloxan diabetes mellitus (n=20), and rats after persistent alloxan diabetes (n=10) whose blood glucose level had been completely normalized by administering total RNA of bone marrow, splenic, and pancreatic cells (post-diabetes group). Diabetes mellitus was modeled with a single subcutaneous (s.c.) injection of complete Freund's adjuvant (0.5 ml) followed by a s.c. injection of alloxan trihydrate (200 mg/kg). Achievement of normoglycemia in animals of the post-diabetes group was confirmed over the next 60 days. Then total RNA was isolated from their spleen and bone marrow by phenol-chloroform extraction, and the effect of a single intraperitoneal injection of total RNA (15 µg/100 g body weight) was studied.

**Results.** Administration of splenic total RNA from rats previously treated for alloxan diabetes to animals with alloxan diabetes resulted in development of stable and prolonged refractoriness of diabetic rats to the treatment with therapeutic RNA preparations [11].

**Conclusions.** This study discovered a phenomenon of hypersensitivity of rats with alloxan diabetes to the diabetogenic effect of total RNA from animals that had previously had alloxan diabetes. Apparently, this refractoriness was caused by the clonal component of the total RNA of CD8<sup>+</sup> T memory lymphocytes from the spleen of post-diabetes animals. A mechanism is proposed for the interaction between individual components of splenic total RNA from post-diabetes rats and their target lymphocytes in recipients with alloxan diabetes.

**Keywords:** refractoriness; experimental diabetes mellitus; alloxan; total RNA; allogeneic transfer; lymphoid cells; spleen; bone marrow

**For citation:** Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. Paradoxical refractoriness developing with the allogeneic transfer of splenic lymphocyte total RNA from animals with treated alloxan diabetes to animals with untreated diabetes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 37-46. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.37-46

**For correspondence:** *Nina M. Gevorkyan*, Researcher, Laboratory for Protein Biosynthesis of V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya Str., Moscow 119121, Russian Federation, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

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

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

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

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

Received 03.06.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

**Введение**

В настоящее время можно с полным основанием утверждать, что лимфоидная ткань, помимо осуществ-

вления в организме иммунной функции, является также важнейшим регулятором процессов пролиферации и дифференцировки соматических клеток различных

гистотипов. Это свойство лимфоидных клеток, получившее название морфогенетической функции, было установлено и экспериментально обосновано А.Г. Бабаевой путем адоптивного переноса лимфоцитов селезенки оперированных животных неоперированным сингенным реципиентам [1]. В результате такого переноса в организме последних был получен морфогенетический органоспецифический ответ, и было доказано, что к регуляторной функции причастны лимфоциты именно Т-ряда [1, 2].

Морфогенетическая функция Т-лимфоцитов является неотъемлемой частью единой системы регулирования морфогенеза. Т-лимфоциты обладают многими средствами воздействия на восстановительные процессы, необходимыми для сохранения качественной сущности и анатомической целостности тканей, органов и организма в целом. Эти мобильные клетки наделены мощным рецепторным аппаратом и способны синтезировать целый ряд классических гормонов и тканевых факторов роста, обеспечивая информационный обмен между клетками не только паракринным путем, но и дистантно [3-5].

Одними из посредников в межклеточной сигнальной системе управления репаративной регенерацией являются чрезвычайно разнообразные по своим функциональным свойствам молекулы РНК, способные копировать и транспортировать информацию, регулировать экспрессию генов, катализировать образование химических связей [6].

Именно поэтому с целью выхода за рамки опытов с сингенными реципиентами и приближения возможности управления регенерационными процессами в медицине, а также в поисках адекватной субклеточной субстанции, способной реализовывать морфогенетические эффекты Т-лимфоцитов, имеющие место при их адоптивном переносе, мы остановили свой выбор на препаратах суммарной РНК, выделенных из клеток центральных и периферических лимфоидных органов [2, 7].

К настоящему времени нами доказано, что экзогенная суммарная РНК лимфоидных клеток, так же, как и сами Т-лимфоциты, обладает высоким морфогенетическим потенциалом, но при этом, в отличие от самих лимфоцитов, с ее помощью можно беспрепятственно осуществлять эффективный аллогенный и ксеногенный перенос оперативной морфогенетической информации между здоровыми особями и подопытными животными в модельных экспериментах. Так, нами установлено наличие выраженной восстановительной способности у суммарных РНК, выделенных из лимфоцитов периферической крови, селезенки, ти-

муса, суммарных РНК костного мозга, плаценты и пуповины здоровых животных в экспериментальных моделях токсической гипопластической анемии [8], аплазии костного мозга, вызванной гамма-излучением [9, 10], сахарного диабета [11], доброкачественной гиперплазии предстательной железы [12]. В моделях *in vivo* и *in vitro* была доказана регуляторная гемопоэтическая активность вышеперечисленных суммарных РНК при кровопотере, экспериментальной и истинной полицитемии [13-17].

В целях дальнейшего изучения особенностей морфогенетических свойств лимфоидных клеток на уровне выделенных из них суммарных РНК, задачей настоящего исследования было выяснение возможного влияния лимфоидных клеток животных, перенесших неинфекционное заболевание, ассоциированное с ослаблением или утратой нарушенных функций, на течение этого заболевания у больных животных. Исследование проводили на крысиной модели аллоксанового сахарного диабета с целью выяснения того, влияет ли, и как именно, суммарная РНК селезенки крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, на уровень глюкозы в крови интактных животных и животных с аллоксановым диабетом. Результаты сопоставляли с данными, полученными нами ранее при устранении гипергликемии и нормализации уровня глюкозы в крови животных с аллоксановым диабетом [11], а также при изучении действия суммарной РНК селезенки крыс с аллоксановым диабетом на уровень глюкозы в крови интактных животных и животных, ранее перенесших аллоксановый диабет [18].

### Методика

Эксперименты с животными, содержащимися в стандартных условиях вивария, на стандартном рационе и при свободном доступе к воде, проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ «Принципы надлежащей лабораторной практики» от 02.12.2009. Протокол исследований одобрен Этической комиссией Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича. Работа выполнена на 35 белых нелинейных крысах-самках массой 250-280 г. 5 интактных животных, 20 – с экспериментальным аллоксановым сахарным диабетом и 10 животных, ранее перенесших аллоксановый сахарный диабет, у которых уровень глюкозы крови был полностью нормализован в результате введения терапевтических доз суммарных РНК (по 15 мкг/100 г массы) клеток костного мозга, селезенки и поджелудочной железы [11]. Достигнутая нормогликемия у этих животных подтверждалась в течение последующих 60 сут, после чего из селезенки и

костного мозга этих животных методом фенол-хлороформной экстракции по Хомчинскому была выделена суммарная РНК, эффекты однократного внутрибрюшинного введения которой (в дозе 15 мкг/100 г массы тела животного) изучали в данной работе.

Стойкий аллоксановый сахарный диабет моделировали предварительным однократным подкожным введением полного адьюванта Фрейнда в дозе 0,5 мл/крысу, а через 24 ч (на фоне 24-часового голодания и свободного доступа к воде) — однократным подкожным введением аллоксана тригидрата («La Chema», Чехия) в дозе 200 мг/кг (4% раствор в 0,9% NaCl). Начиная с 3-х сут после введения аллоксана, все животные получали базисную инсулинотерапию [19].

Статистическая обработка результатов была выполнена с помощью компьютерной программы IBM SPSS Statistics 19,0. Статистическую значимость различий оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и Уилкоксона (различия считались статистически значимыми при вероятности ошибки 1 рода  $< 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

Так же, как и при иммунном ответе, при реализации морфогенетического ответа Т-лимфоциты способны запоминать происходящие в организме морфологические и физиологические изменения, и при возникновении повторного ответа реагировать быстрее и интенсивнее [7].

Это послужило нам основанием для выяснения того, может ли суммарная РНК лимфоцитов селезенки крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, ускорить восстановление нормального уровня глюкозы в крови животных с аллоксановым диабетом, и влияет ли она на уровень глюкозы крови интактных животных.

Ранее нами было обнаружено, что однократное одновременное или последовательное — с 7-суточным интервалом — введение препаратов суммарных РНК костного мозга, поджелудочной железы и лимфоцитов селезенки (каждого в дозе 15 мкг/100 г массы тела животного) к 21-м сут приводит к стойкой нормализации уровня глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом [11]. Такой же, но ускоренный, результат уже к 17-м сут достигался при введении всего лишь 10 мкг/100 г массы тела суммарной РНК, выделенной из культуры мультипотентных мезенхимных стволовых клеток стромы пуповины человека.

Помимо перечисленных суммарных РНК, в настоящей работе был использован также препарат суммарной РНК плаценты — ткани, особо обогащенной ство-

ловыми клетками [20]. Ранее нами было выявлено выраженное стимулирующее эритропоэз воздействие крысиной плацентарной суммарной РНК в культуре эритробластических островков костного мозга крыс [17].

В данном исследовании у крыс-доноров селезенки и костного мозга, через 21 сут после введения им аллоксана, уровень глюкозы крови составлял в среднем  $21,98 \pm 0,45$  ммоль/л, а через 60 сут после полной нормализации уровня глюкозы крови под действием соответствующих препаратов суммарной РНК, когда крыс выводили из эксперимента, —  $5,20 \pm 0,11$  ммоль/л.

Внутрибрюшинное введение интактным крысам по 15 мкг/100 г суммарной РНК, выделенной из лимфоцитов селезенки животных, вылеченных от аллоксанового диабета (РНКсвд) не сказалось на их нормогликемическом статусе. При ежедневном измерении уровень глюкозы в крови этих животных на протяжении 5 сут колебался в интервале 4,7–5,6 ммоль/л.

В отличие от этого результата и вопреки ожидаемому, введение РНКсвд животным с аллоксановым диабетом не только не ускоряло нормализацию уровня глюкозы крови, но и активно препятствовало его снижению, тогда как в отсутствие РНКсвд препарат суммарной РНК из селезенки нормальных животных в кратчайшие сроки приводил к существенному уменьшению гипергликемии [11]. В **таблице 1** приведены результаты исследования влияния суммарной РНКсвд на динамику уровня глюкозы крови у крыс с аллоксановым диабетом (группа 1). Этой группе животных по прошествии 28 сут после однократного введения 15 мкг РНК селезенки «вылеченных диабетиков» ввели по 45 мкг суммарной РНК крысиной плаценты, а ещё через 28 сут — по 15 мкг суммарной РНК пуповины человека. Группа 2 представляла собой группу животных также с аллоксановым диабетом, которым сначала однократно ввели по 45 мкг суммарной РНК крысиной плаценты, а через 28 сут — еще по 15 мкг суммарной РНК пуповины человека. Таким образом, в **таблице 1** — для удобства сравнения — представлены результаты изменения динамики уровня глюкозы крови в двух группах животных с аллоксановым диабетом, с той лишь разницей, что в группе 1 лечение с помощью препаратов РНК плаценты и пуповины осуществляется на фоне предварительно введенной суммарной РНКсвд.

Из **таблицы 1** видно, что введение суммарной РНКсвд крысам с аллоксановым диабетом на первых порах не только не способствует нормализации, но даже вызывает дополнительное повышение уровня глюкозы крови, который возвращается к исходным пока-

зателям лишь к 7-м сут после введения. Это неожиданный результат. Согласно нашим данным [11], именно в те же сроки, то есть в течение первых 7 сут, достигается максимальный эффект статистически значимого снижения уровня глюкозы крови у крыс с аллоксановым диабетом, обеспечиваемый однократным введением суммарной РНК лимфоцитов селезенки интактных животных в указанной дозе. В отличие от этого,

под действием РНКсвд эффект снижения достигается лишь к 28-м сут, начинаясь не сразу, а только через неделю после воздействия (в течение которой гипергликемия возрастает), и достигает своего предела на 2–3 нед позже.

Усиление гипергликемии в течение первой недели после введения РНКсвд крысам с аллоксановым диабетом тем более интересно, что введение этого пре-

Таблица 1

**Влияние РНК селезенки вылеченных от диабета животных (РНКсвд), плаценты и пуповины на динамику уровня глюкозы в крови у крыс с аллоксановым диабетом**

Показатели	Группа 1 РНКсвд (15 мкг)	Группа 2
Исходный уровень глюкозы крови (ммоль/л)	20,2±0,6	20,3±0,6
Сутки эксперимента (в скобках – сутки после введения очередного препарата)		
3 сут	22,8±0,6	
5 сут	21,5±0,9	
7 сут	20,7±0,5	
10 сут	18,6±0,3	
14 сут	18,9±0,5	
17 сут	18,5±1,1	
21 сут	18,2±0,6	
28 сут	17,5±0,9	(20,3±0,6)
	<b>+ РНКплаценты (45 мкг)</b>	<b>РНКплаценты (45 мкг)</b>
31 (3) сут	17,1±0,5	18,7±0,5
33 (5) сут	-	-
35 (7) сут	17,9±0,5	16,0±0,6
38 (10) сут	16,8±0,4■	13,9±0,5
42 (14) сут	17,0±0,5■	13,1±0,6
45 (17) сут	17,0±0,5 ■	11,6±0,5
49 (21) сут	-	-
56 (28) сут	17,4±0,4 ■	11,5±0,6
	<b>+ РНКпуповины (15 мкг)</b>	<b>+ РНКпуповины (15 мкг)</b>
59 (3) сут	15,3±0,4 ■	10,3±0,6
61 (5) сут	13,6±0,6 ■	8,7±0,4
63 (7) сут	12,7±0,3 ■	8,4±0,6
66 (10) сут	10,9±0,7 ■	8,1±0,4
70 (14) сут	11,2±0,6 ■	8,3±0,3
73 (17) сут	9,4±0,6 ■	7,6±0,3
77 (21) сут	9,5±0,4 ■	7,8±0,5
84 (28) сут	8,5±0,6 ■	6,8±0,4

**Примечание.** В скобках после названия препарата РНК – его доза в мкг/100 г массы «■» – статистическая значимость различий между группами 1 и 2.

парата интактным животным гипергликемии у них не вызывало. По всей вероятности, речь здесь может идти об адресном взаимодействии отдельных компонентов суммарной РНКсвд (которая получена из всей совокупности клонов лимфоцитов селезенки донора) с их лимфоцитами-мишенями в организме реципиента, поскольку полученный результат позволяет думать о реакции, которую вызывает РНК донорских лимфоцитов памяти на аллоксановую ситуацию в организме реципиента (как если бы встреча лимфоцитов донора с аллоксаном произошла повторно!).

В подтверждение такого вывода можно привести симметричный эффект, обнаруженный нами ранее [18]: введение суммарной РНК селезенки крыс с аллоксановым диабетом (РНКсад) животным, ранее перенесшим аллоксановый диабет, вызывало у последних гипергликемию, статистически значимо более выраженную, чем у интактных животных (табл. 2).

Здесь ситуация зеркальная, и результат опять же напоминает картину вторичного ответа, но теперь это ответ лимфоцитов памяти в организме животного, уже перенесшего аллоксановый диабет, на суммарную РНК лимфоцитов селезенки больного аллоксановым диабетом донора.

Таблица 2

**Влияние суммарной РНК крыс с аллоксановым диабетом (РНКсад) на уровень глюкозы в крови у интактных и ранее перенесших аллоксановый диабет животных**

	Интактные крысы (n=6)	Крысы, ранее перенесшие аллоксановый диабет (n=6)
	РНКсад (15 мкг/100г)	РНКсад (15 мкг/100г)
Исходный уровень глюкозы крови (ммоль/л)	5,7±0,1	5,4±0,2
Сутки после введения препарата		
3 сут	8,0±0,5	11,6±0,6■
5 сут	14,3±0,6	18,6±0,3■
7 сут	17,8±0,3	19,1±0,4
10 сут	16,7±0,5	19,3±0,5■
14 сут	15,7±0,4	19,9±0,3■
17 сут	13,2±0,5	17,5±0,2■
21 сут	9,2±0,3	15,3±0,5■
28 сут	6,1±0,3	11,6±0,5■

**Примечание.** ■ – статистически значимые различия между группами.

В этой связи нельзя мимоходом не отметить то, до чего наглядно описанные реакции демонстрируют приспособительный характер гипергликемического ответа организма на аллоксан!

Наконец, третий эффект, который обращает на себя внимание, – это полная резистентность (в отношении уровня гипергликемии) животных с аллоксановым диабетом к терапевтическому действию суммарной РНК плаценты на протяжении последующих 28 дней после введения им РНКсвд (29–56 сут эксперимента, табл. 1)! И это – несмотря на известную обогащенность плаценты стволовыми клетками [20] и доказанную нами эффективность действия РНК плаценты (также как и РНК стволовых клеток) в опытах по стимуляции морфогенетических процессов [7, 16, 17].

Приспособительные реакции, развивающиеся на клеточном, органном и системном уровнях, связанные с морфологической и функциональной перестройкой многих органов и тканей, и формирование адаптивного ответа в конечном итоге зависят от направленности регуляторных процессов в системе иммуногенеза [1, 2, 7, 21–23], то есть от функционального состояния лимфоидных клеток на той или иной стадии регенерационного процесса.

Преимущественная органная и фазовая специфичность морфогенетической активности лимфоцитов, наблюдаемая в процессе регенерации, свидетельствует о наличии в иммунной системе разных клонов лимфоцитов, находящихся в особых отношениях с их тканями-мишенями. С этим связана возможность избирательного поражения отдельного клона (клонов) лимфоцитов с соответствующими нарушениями функции контролируемой им ткани-мишени. То есть морфогенетическая, так же как и иммунологическая, толерантность может представлять собой специфическое подавление морфогенетического ответа на уровне отдельных клонов лимфоцитов.

«Имунологическая толерантность представляет собой одну из форм активности иммунной системы. Классическая трактовка природы иммунологической толерантности состоит в том, что введенный антиген вызывает элиминацию или анергию клонов лимфоцитов, которые его распознают» [24]. То же относится и к морфогенетической функции лимфоцитов – период толерантности, или резистентности, как правило, сопровождается любой восстановительный процесс, который на заключительном этапе ассоциирован с супрессорной фазой активности лимфоцитов. При этом начало периода супрессии зависит от органа, в котором происходит процесс регенерации, от характера и степени повреждения, а также от вида и возраста животного, тогда как

время окончания этого периода чаще всего неизвестно, поскольку изучение этого вопроса могло быть сопряжено только со специальной задачей. Можно лишь предполагать, что длительность супрессорного периода тоже в большой мере зависит от указанных факторов. Известно, например, что при резекции селезенки наблюдается быстрая и длительная реакция Т-супрессоров, выявляемая как в смешанной культуре спленоцитов, так и по способности этих клеток подавлять проявления регионарной реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Наиболее длительные сроки супрессии, определяемые по нормализации уровня пролиферативной активности спленоцитов, были ассоциированы с адреналэктомией (не более 21 сут) и термическим ожогом кожи с повреждением 30% поверхности тела (не более 25 сут) [25]. В нашем случае сроки рефрактерности к лечению, вызванной введением суммарной РНК спленоцитов крыс, перенесших аллоксановый диабет, значительно превосходили указанные, составляя 60 сут после полной нормализации глюкозы крови у доноров плюс 28 сут чрезвычайно замедленного процесса снижения глюкозы крови у реципиентов с аллоксановым диабетом под действием РНКсвд, плюс еще 28 сут абсолютной рефрактерности к действию РНК плаценты, и плюс еще 28 сут очень замедленного процесса восстановления в ответ на РНК пуповины (табл. 1)! Однако в контексте данного исследования, помимо столь длительного срока супрессии, интересны также сам факт и причина такого мощного сопротивления процессу восстановления нормального уровня глюкозы крови у животных с гипергликемией под действием РНК спленоцитов крыс, перенесших аллоксановый диабет.

Результаты данной серии экспериментов свидетельствуют о том, что наблюдаемая нами рефрактерность к лечению аллоксанового диабета эффективными препаратами суммарных РНК, полученных от интактных доноров, обусловлена именно лимфоцитами животных, перенесших это заболевание. Этот вывод обусловлен следующими соображениями. РНК костного мозга переболевших животных (РНК КМвд) в меньшей степени, но тоже вызывала существенное торможение процесса нормализации уровней глюкозы крови у больных реципиентов (данные не представлены). При этом, несмотря на торможение, терапевтический эффект был статистически значимо выше в группе животных, которым вводили по 15 мкг, чем у тех, которым вводили по 5 мкг РНК КМвд/100 г массы тела. Являясь центральным органом лимфопоэза, костный мозг содержит достаточное количество лимфоцитов. Однако морфогенетический эффект стволовых клеток в нем, по-видимому, превалирует, поэто-

му с увеличением объема вводимой РНК клеток костного мозга эффект нормализации уровня глюкозы крови преобладает над процессом торможения. Вообще создается впечатление, что не количество введенной РНКсвд, а сама природа лимфоцитов переболевших животных, то есть сам факт их наличия, является определяющим в развитии тормозящего эффекта. Это подтверждается и тем, что 5 мкг/100 г массы тела введенной РНКсвд (данные не приведены) и 15 мкг/100 г (см. табл. 1) практически в одинаково высокой степени и с одинаковой динамикой тормозят процесс нормализации гликемического статуса крыс, тогда как под действием РНК селезенки интактных животных нормализация происходит быстро и эффективно [11].

В отличие от эффекта РНК селезенки интактных животных, под действием 15 мкг/100 г которой уровень глюкозы крови крыс с аллоксановым диабетом за 7 сут снижается приблизительно на 30-35%, РНКсвд в том же количестве за 28 сут способна улучшить гликемический статус крыс всего лишь на 13-14%. То есть налицо выраженная супрессия, на фоне которой едва пробивается почти вчетверо сниженный терапевтический эффект РНКсвд. По всей видимости, речь здесь может идти не только о супрессии, но и о клональном снижении морфогенетического потенциала лимфоцитов селезенки переболевших животных.

Последующие 28 сут в группе больных животных наблюдается удивительное постоянство уровня глюкозы крови, несмотря на воздействие достаточно эффективной в норме суммарной РНК из пренатальной плаценты крыс. И только начиная с 56-х сут эксперимента, после введения животным суммарной РНК из постнатальной пуповины человека, начинается (тоже весьма замедленное) снижение содержания глюкозы в крови животных.

Возвращаясь к вопросу о механизмах повышения глюкозы крови в ответ на введение РНКсвд и РНКсад, напоминающего картину вторичного ответа, в дополнение к предполагаемому участию лимфоцитов памяти в этом процессе, можно привести данные, полученные китайскими исследователями при изучении роли Т-лимфоцитов и их субпопуляций в индукции аутоиммунного диабета у мышей BALB/c [26]. Развитие сахарного диабета у сингенных реципиентов вызывали адоптивным переносом  $3 \times 10^6$  диабетогенных Т-лимфоцитов, полученных из селезенок мышей-доноров после пятикратных внутрибрюшинных инъекций стрептозотоцина из расчета 40 мг/кг массы тела и последующего 7-суточного культивирования их Т-клеток в присутствии интерлейкина-2. Было показано, что отдельно взятая фракция CD4<sup>+</sup> из популяции диабетогенных

T-лимфоцитов не способна была вызвать сахарный диабет у реципиентов. Это может служить основанием для предположения, что и в нашем случае источником вызывающей рефрактерность РНКсвд является популяция CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитов памяти.

В этой связи, можно объяснить еще одно явление, вызывающее вопросы. Так, было обнаружено [27], что при адоптивном переносе сингенным реципиентам разных количеств (от 10<sup>3</sup> до 10<sup>7</sup>) T-лимфоцитов селезенки мышей BALB/c с стрептозотоциновым диабетом, наиболее выраженную гипергликемию вызывало наименьшее количество перенесенных клеток! Это тоже объяснимо. Как следует из результатов наших экспериментов (см. выше), для осуществления переноса важно лишь небольшое (пороговое) количество введенных клеток, дальнейшее повышение количества которых не отменяет факт переноса патологического состояния, но может содержать все больше супрессорных клеток, которые, по-видимому, играют еще и сдерживающую роль в развитии патологического процесса в организме донора. Далее, в этой же публикации [27] был описан эффект максимальной экспрессии гипергликемии у мышей-реципиентов при адоптивном переносе сингенных T-лимфоцитов мышей со стрептозотоциновым диабетом, предварительно подвергнутых гамма-облучению в низкой дозе (200 Рентген). Учитывая тот факт, что CD8<sup>+</sup> T-лимфоциты более чувствительны к гамма-облучению, а также на основании вышеизложенного, можно прийти к заключению, что результатом такого воздействия явилось повреждение части CD8<sup>+</sup> T-супрессоров, приблизившее количество оставшихся CD8<sup>+</sup> T-клеток к пороговому, то есть к их количеству, необходимому и достаточному для воспроизведения максимального гипергликемического статуса у реципиентов.

Полученные результаты не дают ответа на вопрос, почему РНК плаценты не вызвала никакого действия, тогда как под действием РНК пуповины продолжился процесс снижения уровня глюкозы крови. Не известно пока, связано ли это с большей эффективностью терапевтического действия РНК пуповины, чем плаценты, или же введение этого препарата совпало с окончанием фазы рефрактерности, вызванной гомеостатическим эффектом суммарной РНК селезенки перенесших диабет животных. Для выяснения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования, которые могут иметь определенное значение для терапии таких состояний.

В этой связи можно предположить, что известная клиницистам рефрактерность к лекарственной терапии, наблюдаемая у некоторой части больных, тоже в

определенных случаях может быть не конститутивным свойством, а временным явлением. Это состояние может возникнуть, например, из-за того, что организму удалось еще до манифестации болезни — бессимптомно или в стертой форме — преодолеть ее клинические проявления. В таком случае рефрактерность может объясняться клональным гомеостатическим эффектом лимфоцитов больного и носить временный характер.

В этой же связи, в качестве одной из предполагаемых причин того, что хронические заболевания труднее, чем острые, подлежат коррекции, может выступать рефрактерность, связанная с тенденцией поддержания CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитами памяти гомеостаза, достигнутого в результате сложного ряда адаптивных перестроек.

### Литература

1. Бабаева А.Г. *Регенерация и система иммуногенеза*. М.: Медицина. 1985.
2. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. *Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей*. М.: Изд-во РАМН. 2009.
3. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Роль T-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(2): 189–202.
4. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. T-лимфоциты и тканевые факторы роста. *Рос. физиол. журн. им. Сеченова*. 2015; 101(8): 865–84.
5. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Современный взгляд на роль T-лимфоцитов в регуляции эритропоэза. *Успехи современной биологии*. 2016; 136(1): 83–96.
6. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Рос. физиол. журн. им. Сеченова*. 2016; 102(11): 1280–301
7. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. *О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах*. М.: «Группа МДВ». 2016.
8. Тишевская Н. В., Бабаева А. Г., Геворкян Н. М. Сравнительный анализ гемопоэтической активности суммарной РНК костного мозга и лимфоидных клеток селезенки при хронической бензолной анемии у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(2): 56–64.
9. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Захаров Ю.М. Коррекция постлучевых нарушений эритропоэза суммарной РНК клеток костного мозга и тимуса. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2017; 57(4): 384–90.
10. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Болотов А.А. Влияние предварительного введения суммарной РНК клеток костного мозга на динамику восстановления эритропоэза у крыс после острого гамма-облучения. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(5): 670–3.
11. Геворкян Н. М., Тишевская Н. В., Бабаева А. Г. Роль суммарных РНК лимфоидных и стволовых клеток в коррекции уровня глюкозы в крови при экспериментальном сахарном диабете. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(3): 88–95.

## References

12. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Головнева Е.С., Максаков Д.А. Регресс экспериментальной гиперплазии предстательной железы под действием лимфоцитарных и органных РНК. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2018; 1(25): 61-6.
13. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова Ю.О., Рагимов А.А. О стимулирующих эритропоэз свойствах суммарной РНК лимфоцитов периферической крови при эритроемии. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2015; 1(13): 33-7.
14. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова Ю.О., Рагимов А.А. О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров. *Онкогематология*. 2015; 10(2): 58-62.
15. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки крыс на эритропоэз в культуре эритробластических островков крыс с полицитемией. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014; 4(12): 40-3.
16. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. Морфофункциональные особенности эритропоэза, наблюдаемые при воздействии суммарной РНК мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2018; 2(26): 31-5.
17. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. Эритропоэтическая активность суммарной РНК клеток плаценты in vitro. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2016; 4(20): 31-5.
18. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г. О феномене повышенной чувствительности крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, к диабетогенному воздействию суммарной РНК. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(2): 92-5.
19. Волчегорский И.А., Тишевская Н.В., Дементьева Е.В. Антианемическое действие реамберина в остром периоде аллоксанового диабета у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008; 71(6): 23-7.
20. Сериков В.Б., Куйперс Ф. Плацента человека как источник гемопоэтических стволовых клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2008; 2: 51-6.
21. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Влияние морфогенетической активности лимфоцитов на реактивность и резистентность организма. *Онтогенез*. 2018; 49(1): 54-66.
22. Бабаева А. Г., Геворкян Н. М., Тишевская Н. В. Адаптивная изменчивость суммарной РНК лимфоидных клеток как причина невоспроизводимости вызываемых ею эффектов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(1): 91-8.
23. Бабаева А. Г., Геворкян Н. М., Тишевская Н. В. *Очерки об особенностях изучения эффектов РНК и об РНК-терапии*. М.: 2019.
24. Ярилин А.А. *Иммунология*. М.: Гэотар-Медиа. 2010.
25. Бабаева А.Г., Зотиков Е.А. *Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений*. М.: Наука. 1987.
26. Zou X.L., Zhao Z.Y., Wang Y.Y., Su Z.Q., Xiang M. Diabetogenic T cells induce autoimmune diabetes in BALB/c mice. *Chin Med Sci J*. 2008; 23(2): 88-94.
27. Buschard K., Rygaard J. T-lymphocytes transfer streptozotocin induced diabetes mellitus in mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. C*. 1978; 86(6): 277-82.
1. Babaeva A.G. *Regeneration and the system of immunogenesis. [Regeneratsiya i sistema immunogeneza]*. Moscow: Meditsina. 1985.
2. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zotikov E.A. *The role of lymphocytes in the operative change in the program of tissue development. [Rol' limfotsitov v operativnom izmenenii programmy razvitiya tkaney]*. Moscow: RAMS. 2009. (In Russian)
3. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. The role of T-lymphocytes in hormonal regulation of morphogenetic processes. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(2): 189-202. (In Russian)
4. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. T-lymphocytes and tissue growth factors. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. Sechenova*. 2015; 101(8): 865-84. (In Russian)
5. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. A modern view of the role of T-lymphocytes in regulation of erythropoiesis. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2016; 136(1): 83-96. (In Russian)
6. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The role of lymphocytic RNA in the intercellular information exchange and in the regulation of regenerative processes. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. Sechenova*. 2016; 102(11): 1280-301. (In Russian)
7. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. *About the morphogenetic properties of RNA of lymphoid and stem cells during regenerative processes. [O morfogeneticheskikh svoystvakh RNK limfoidnykh i stvolovykh kletok pri vosstanovitel'nykh protsessakh]*. Moscow: «Gruppa MDV». 2016. (In Russian)
8. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. Comparative Analysis of Hematopoietic Activity of Bone Marrow and Splenocyte Total RNA in Chronic Benzene Anemia in Rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(2): 56-64. (In Russian)
9. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zakharov Y.M. Correction of post-radiation disorders of erythropoiesis with the total RNA of bone marrow and thymus cells. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2017; 57(4): 384-90. (In Russian)
10. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Bolotov A.A. Effect of preliminary introduction of bone marrow cell total RNA on the dynamics of erythropoiesis restoration in rats after acute gamma-irradiation. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 161(5): 670-3. (In Russian)
11. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. The role of lymphoid and stem cell total RNAs in correction of blood glucose levels in experimental diabetes mellitus. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(3): 88-95. (In Russian)
12. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Golovneva E.S., Maksakov D.A. Regression of experimental prostatic hyperplasia under the influence of lymphocytic and organ RNA. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2018; 1(25): 61-6. (In Russian)
13. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Golovkina L.L., Muratova Ju.O., Ragimov A.A. About erythropoiesis-stimulating properties of peripheral blood lymphocyte total RNA in erythremia. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2015; 1(13): 33-7. (In Russian)
14. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Golovkina L.L., Muratova Yu.O., Ragimov A.A. On the hematopoietic properties of ribonucleic acid of peripheral blood lymphocytes in patients with true polycythemia and healthy donors. *Oncogematologiya*. 2015; 10(2): 58-62. (In Russian)
15. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Komarova I.A. Influence of preparations of spleen lymphoid cell total RNA on

- erythropoiesis in culture of erythroblast islets of polycythemic animals. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2014; 4(12): 40-3. (In Russian)
16. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. Morphofunctional features of *in vitro* erythropoiesis observed under the influence of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cell total RNA. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2018; 2(26): 31-5. (In Russian)
  17. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V. In vitro erythropoietic activity of total RNA of placental cells. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2016; 4(20): 31-5. (In Russian)
  18. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. On the phenomenon of hypersensitivity of rats that previously underwent alloxan diabetes to the diabetogenic effect of total RNA. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2020; 64(2): 92-5. (In Russian)
  19. Volchegorskii I.A., Tishevskaya N.V., Dement'eva E.V. Antianemic effect of reamberin in rats with acute alloxan-induced diabetes. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2008; 71(6): 23-7. (In Russian)
  20. Serikov V., Kuypers F. Human placenta as a source of hematopoietic stem cells. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2008; (2): 51-6. (In Russian)
  21. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The effect of morphogenetic activity of lymphocytes on the reactivity and resistance of the body. *Ontogenez*. 2018; 49(1): 54-66. (In Russian)
  22. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V. Adaptive variability of total RNA in lymphoid cells as a cause for non-reproducibility of its effects. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(1): 91-8. (In Russian)
  23. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V. *Essays on features of study effects of RNA and RNA-therapy. [Ocherki ob osobennostyakh izucheniya ehffektov RNK i ob RNK-terapii]*. Moscow. 2019. (In Russian)
  24. Yarilin A.A. *Immunology*. Textbook. [Immunologiya. Uchebnik]. Moscow. GEOTAR-Media. 2010. (In Russian)
  25. Babaeva A.G., Zotikov E.A. *Immunology of the processes of adaptive growth, proliferation and their disorders. [Immunologiya protsessov adaptivnogo rosta, proliferatsii i ikh narusheniy]*. Moscow. Nauka. 1987. (In Russian)
  26. Zou X.L., Zhao Z.Y., Wang Y.Y., Su Z.Q., Xiang M. Diabetogenic T cells induce autoimmune diabetes in BALB/c mice. *Chin Med Sci J*. 2008; 23(2): 88-94.
  27. Buschard K., Rygaard J. T-lymphocytes transfer streptozotocin induced diabetes mellitus in mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 1978; 86(6): 277-82.

**Сведения об авторах:**

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

**Тишевская Наталья Викторовна**, доктор мед. наук, проф. каф. нормальной физиологии им. акад. Ю.М. Захарова Южно-Уральского государственного медицинского университета;

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

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Гребенчиков О.А.<sup>1</sup>, Касаткина И.С.<sup>1</sup>, Кузовлев А.Н.<sup>1</sup>, Лобанов А.В.<sup>2</sup>, Ершов А.В.<sup>1,3</sup>

## Влияние хлорида лития на активацию нейтрофилов при развитии синдрома системного воспалительного ответа у пациентов после операций на сердце с использованием аппарата искусственного кровообращения

<sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», 107031, Москва, Россия, ул. Петровка, д. 25, стр. 2;

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

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет),

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

**Цель исследования** – изучение *in vitro* действия хлорида лития на активность нейтрофилов человека при действии сывороток пациентов с синдромом системного воспалительного ответа, развившемся после операций на сердце с искусственным кровообращением.

**Методика.** Исследование проводили *in vitro* на нейтрофилах, выделенных из крови 6 здоровых доноров. Нейтрофилы активировали при помощи сыворотки пациентов с синдромом системного воспалительного ответа (ССВО), перенесших операции на сердце с искусственным кровообращением (ИК). Активность нейтрофилов оценивали с использованием флуоресцентных антител к маркерам дегрануляции CD11b и CD66b. Уровень апоптоза и некроза нейтрофилов оценивали через 22 ч после выделения из крови здоровых доноров; количественная оценка была проведена с использованием аннексина V и йодистого пропидия на проточном цитофлуориметре. Интактные и активированные нейтрофилы обрабатывали раствором хлорида лития в концентрациях 0,3; 3,0 и 9,0 мМ.

**Результаты.** Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО после операций на сердце с ИК увеличивала экспрессию CD11b в 1,5 раза и экспрессию CD66b в 1,4 раза в сравнении с экспрессией на интактных нейтрофилах. Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО и раствором хлорида лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ приводило к статистически значимому снижению уровня экспрессии CD11b и CD66b на поверхности нейтрофилов в сравнении с активированными контрольными. Установлено, что хлорид лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ возвращал уровни экспрессии CD11b и CD66b на активированных нейтрофилах к уровню экспрессии на интактных нейтрофилах. В концентрации 0,3 мМ хлорид лития, используемый при инкубации с активированными нейтрофилами, не вызывал значимого снижения экспрессии CD11b и CD66b относительно контрольных активированных нейтрофилов. Экспрессия CD11b и CD66b на активированных нейтрофилах при их инкубации с хлоридом лития в концентрации 0,3 мМ была значимо выше относительно экспрессии данных молекул на интактных нейтрофилах. Сыворотка пациентов с развившемся ССВО снижала спонтанный апоптоз нейтрофилов, а раствор хлорида лития в концентрации 3,0 или 9,0 мМ, добавленный в среду инкубации, увеличивал способность нейтрофилов к спонтанному апоптозу.

**Заключение.** Хлорид лития оказывал противовоспалительный эффект снижал дегрануляцию и активацию нейтрофилов посредством уменьшения уровня экспрессии молекул CD11b и CD66b на поверхности нейтрофилов, которые предварительно были активированы сыворотками пациентов с ССВО. В концентрации 3,0 мМ и выше хлорид лития индуцировал спонтанный апоптоз нейтрофилов, активированных сыворотками пациентов с ССВО после операций на сердце с ИК.

**Ключевые слова:** синдром системного воспалительного ответа; операции на сердце; апоптоз нейтрофилов; хлорид лития; активация нейтрофилов; CD11b; CD66b

**Для цитирования:** Гребенчиков О.А., Касаткина И.С., Кузовлев А.Н., Лобанов А.В., Ершов А.В. Влияние хлорида лития на активацию нейтрофилов при развитии синдрома системного воспалительного ответа у пациентов после операций на сердце с использованием аппарата искусственного кровообращения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 47-53.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.47-53

**Для корреспонденции:** Гребенчиков Олег Александрович, e-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн работы – Гребенчиков О.А., Касаткина И.С.; сбор данных – Касаткина И.С.; анализ и интерпретация данных – Касаткина И.С., Гребенчиков О.А.; написание статьи – Гребенчиков О.А., Касаткина И.С.; редактирование статьи – Гребенчиков О.А., Кузовлев А.Н., Лобанов А.В., Ершов А.В. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.  
**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
Поступила 23.05.2020  
Принята к печати 16.10.2020  
Опубликована 26.11.2020

**Grebenchikov O.A.<sup>1</sup>, Kasatkina I.S.<sup>1</sup>, Kuzovlev A.N.<sup>1</sup>, Lobanov A.V.<sup>2</sup>, Ershov A.V.<sup>1,3</sup>**

## **Influence of lithium chloride on neutrophil activation in the development of systemic inflammatory response syndrome in patients after on-pump cardiac surgery**

<sup>1</sup>FSBSI Federal Research and Clinical Center for Reanimatology and Rehabilitation, 25, p. 2, Petrovka St., 107031, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8 Baltiyskaya St., 125315 Moscow, Russia;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Trubetskaya St., 8, bld. 2, Moscow, 119991, Russia

**The aim** of this work was to study the anti-inflammatory effect of lithium chloride on human neutrophils in vitro under the action of the serum of patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS), which developed after on-pump cardiac surgery.

**Methods.** The study was performed on neutrophils isolated from the blood of five healthy donors, which was activated using serum from patients with SIRS. Neutrophil activity was assessed using fluorescent antibodies to CD11b and CD66b degranulation markers. The level of apoptosis and necrosis of human neutrophils was evaluated 22 hours after isolation. Quantification was performed using annexin V and propidium iodide on a flow cytometer. Intact and activated neutrophils were treated with 0.3, 3.0 and 9.0 mM lithium chlorides.

**Results.** Incubation of neutrophils with the blood serum of patients with SIRS after on-pump cardiac surgery increased the expression of CD11b by 1.5 times and the expression of CD66b by 1.4 times compared to expression on intact neutrophils. Incubation of neutrophils with blood serum of patients with SIRS and 3.0 and 9.0 mM lithium chloride solutions led to a statistically significant decrease in the level of expression of CD11b CD66b on the surface of neutrophils in comparison with control activated neutrophils. It was found that 3.0 and 9.0 mM lithium chloride solutions returned the expression levels of CD11b and CD66b on activated neutrophils to the expression level on intact neutrophils. 0.3 mM of lithium chloride, used during incubation with activated neutrophils, did not cause a significant decrease in the expression of CD11b and CD66b relative to control activated neutrophils. The expression of CD11b and CD66b on activated neutrophils during their incubation with 0.3 mM of lithium chloride was significantly higher relative to the expression of these molecules on intact neutrophils. The serum of patients with advanced SIRS decreased the ability of neutrophils to spontaneous apoptosis. 3.0 or 9.0 mM lithium chloride solutions added to the incubation medium increased the ability of neutrophils to spontaneous apoptosis.

**Conclusion.** Lithium chloride reduced the degranulation and activation of neutrophils by reducing the expression level of CD11b and CD66b molecules on the surface of neutrophils that were previously activated by the serum of patients with SIRS. This effect determines the anti-inflammatory influence of lithium chloride. Lithium chloride at 3.0 mM and higher induced spontaneous apoptosis of neutrophils activated by the serum of patients with SIRS after on-pump cardiac surgery.

**Keywords:** systemic inflammatory response syndrome; heart surgery; neutrophil apoptosis; lithium chloride; neutrophil activation; CD11b; CD66b

**For citation:** Grebenschikov O.A., Kasatkina I.S., Kuzovlev A.N., Lobanov A.V., Ershov A.V. Influence of lithium chloride on neutrophil activation in the development of systemic inflammatory response syndrome in patients after on-pump cardiac surgery. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 47-53. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.47-53

**For correspondence:** **Grebenschikov Oleg A.**, chief researcher of the laboratory of organoprotection in critical conditions of the V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, e-mail: oleg.grebenschikov@yandex.ru

**Contribution:** research concept and design - Grebenschikov O.A., Kasatkina I.S.; material collecting - Kasatkina I.S.; data analysis and interpretation - Kasatkina I.S., Grebenschikov O.A.; writing text Grebenschikov O.A., Kasatkina I.S.; text editig - Grebenschikov O.A., Kuzovlev A.N., Lobanov A.V., Ershov A.V. Approval of the final version of the article - all co-authors.

**Acknowledgments.** The study did not have sponsorship.

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

**Information about the authors:**Grebenchikov O.A., <http://orcid.org/0000-0001-9045-6017>Kasatkina I.S., <http://orcid.org/0000-0002-6177-3360>Kuzovlev A.N., <http://orcid.org/0000-0002-5930-0118>Lobanov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-5159-3227>Ershov A.V., <http://orcid.org/0000-0001-5758-8552>

Received 23.05.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

**Введение**

Не разрешаемое воспаление, сопровождаемое гибелью множества клеток и развитием полиорганной недостаточности, повышенная восприимчивость к инфекционным возбудителям являются основными причинами, лежащими в основе высокого риска смерти, характерного для критических состояний. Это определяет необходимость разработки новых подходов для патогенетического воздействия на данные причины. На сегодняшний день нет достаточно эффективных методов купирования гиперактивированного состояния иммунной системы. Поэтому одной из важнейших задач современной реаниматологии является поиск препаратов для профилактики и лечения пациентов с синдромом системного воспалительного ответа или предотвращения последующих осложнений. Операции на сердце в условиях искусственного кровообращения (ИК) представляют крайнюю степень хирургической агрессии к специфическим факторам, к которым относятся ишемические и реперфузионные повреждения органов, которые, в свою очередь, приводят к окислительному стрессу и развитию системной воспалительной реакции в послеоперационном периоде, что ведет к увеличению летальности. [1]. По данным Vall и соавторами 30-дневная летальность при операциях реваскуляризации миокарда составляет 4,0–5,4% и 6,5–9,1% при операциях на клапанах сердца [2].

Чувствительными маркерами системного воспалительного ответа являются молекулы CD11b и CD66b, которые находятся во внутриклеточных гранулах нейтрофилов. При действии воспалительных стимулов гранулы сливаются с цитоплазматической мембраной и эти молекулы экспонируются на поверхности клеток (рис. 1), этот процесс называется дегрануляцией. CD11b взаимодействует с рецепторами ICAM-1 на эндотелиальных клетках, что обеспечивает адгезию нейтрофилов и последующую их миграцию через эндотелиальный барьер к очагу воспаления [3], в то время как CD66b связан с агрегацией нейтрофилов [4].

Определение экспрессии молекул CD11b и CD66b широко используется в клинической диагностике. Из-

вестно, что их уровень значительно повышается у пациентов с различными видами бактериальных инфекций [5] и сепсисе [6].

Таблетированный препарат, основой которого являются соли лития (карбонат лития, седалит), ограниченно, но длительное время используется (в психиатрии), прежде всего для лечения маниакальных и гипоманиакальных фаз биполярного аффективного расстройства, а также в профилактике его депрессивных фаз и периодических депрессий. Однако, в последнее время накопилось достаточно новых сведений о его высокой эффективности для терапии некоторых других состояний, прежде всего, обусловленных ишемией/реперфузией. Основную роль ионам лития отводят в нейтрализации последствий окислительного дистресса, сопутствующего большому ряду генетических (нейро- и миопатии) и приобретенных (инфаркт, инсульт, сочетанные травмы) патологий. Препарат лития принадлежит к веществам, которые обладают выраженными цитопротективными свойствами вследствие способности фосфорилировать киназу 3-бета гликогенсинтетазы (GSK-3 $\beta$ ) и инактивировать этот фермент. Установлен значительный терапевтический потенциал хлорида лития для предотвращения гибели клеток в результате ишемии-реперфузии [7–9]. Экспериментальные исследования доказали реальные возможности лития для прекодиционирования (защиты от ишемии-реперфузии) ткани миокарда, почек, печени [10–12].

На сегодняшний день молекулярные механизмы реализации противовоспалительных свойств солей лития остаются неизученными и вполне оправданным представляется предположение, что хлорид лития способен модулировать воспалительный ответ организма, как на инфекционные, так и неинфекционные повреждающие агенты.

**Цель исследования** — изучение *in vitro* действия хлорида лития на активность нейтрофилов человека *при* действии сывороток пациентов с синдромом системного воспалительного ответа, развившемся после операций на сердце с искусственным кровообращением.

### Методика

Исследование проводили на нейтрофилах, полученных из крови здоровых доноров (мужчины,  $n=6$ , средний возраст 35,6 [28,7; 45,0] лет).

Для изучения противовоспалительных эффектов хлорида лития изучали его действие на дегрануляцию и апоптоз нейтрофилов. Дегрануляцию нейтрофилов определяли: 1) на нейтрофилах, полученных от здоровых доноров, без дополнительного воздействия – интактных нейтрофилах, 2) на нейтрофилах активированных сывороткой крови больных с ССВО, 3) нейтрофилах, активированных сывороткой крови больных с ССВО и инкубированных с раствором хлорида лития в разных концентрациях.

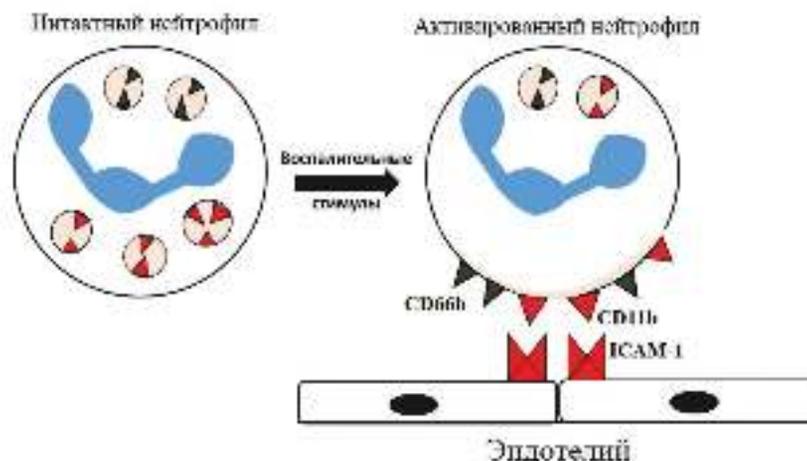
Для выделения нейтрофилов гепаринизированную венозную кровь смешивали с раствором декстрана Т-500 (Pharmacosmos, Дания) до конечной концентрации декстрана 1% и оставляли при комнатной температуре на 30 мин для осаждения эритроцитов. Верхний слой плазмы (обогащенный лейкоцитами и лишенный эритроцитов) наслаивали на Фиколл (ПанЭко, Россия) с плотностью 1,077 г\мл и центрифугировали при комнатной температуре при 300 g 30 мин в центрифуге с отключённым тормозом. Затем удаляли супернатант и все дальнейшие процедуры проводили на льду с использованием охлажденных растворов. Удаление эритроцитов проводили при помощи ресуспендирования осадка в 2 мл деионизированной стерильной воды в течение 45 с, к которой затем добавляли 2 мл двукратного фосфатного буфера (PBS) для восстановления точности и центрифугировали при 200g, +4 °C в течение 10 мин. Осаждённые нейтрофилы промывали PBS

и ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640 (Пан Эко, Россия), 10% FBS с низким содержанием эндотоксинов. Для изучения дегрануляции нейтрофилов использовали концентрат клеток 4 млн/мл.

Сыворотку крови, которую использовали для активации нейтрофилов, получали из крови больных с развившимся синдромом системного воспалительного ответа (ССВО). Забор крови проводили в первые и вторые сутки после проведения операций на сердце с ИК (мужчины,  $n=5$ ; средний возраст 38,4 [29,8–42,4] лет). Критериями выбора больных были параметры, предложенные Американской Коллегией Врачей (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference [13]): температура > 38 или <36 °C; ЧСС > 90 уд./мин; ЧДД > 20/мин или  $PCO_2$  <32 мм рт. ст.; лейкоцитоз > 12000 или лейкопения < 4000.

Для активации нейтрофилов к концентрату нейтрофилов от здоровых доноров добавляли сыворотку больных с ССВО и инкубировали 30 мин при +37 °C. Для определения влияния соли лития на дегрануляцию нейтрофилов к концентрату нейтрофилов от здоровых доноров добавляли сыворотку больных с ССВО и хлорид лития в концентрациях 0,3; 3,0 и 9,0 мМ и также инкубировали 30 мин при +37 °C. Затем добавляли антитела, конъюгированные с флуоресцентными красителями CD11b-FITC и CD66b-AlexaFluor647 (BD Biosciences, США), и инкубировали 30 мин на льду, после чего измеряли уровень флуоресценции (условные единицы флуоресценции) на проточном цитофлуориметре Beckman-Coulter FC 500.

Для определения апоптоза нейтрофилы от здоровых доноров с добавлением сыворотки больных с



**Рис. 1.** Активация нейтрофилов и экспрессия ими молекул адгезии CD11b (красный треугольник) и CD66b (зеленый треугольник) под действием воспалительного стимула. ICAM-1 – англ. Inter-Cellular Adhesion Molecule, молекула клеточной адгезии, которая экспрессируется эндотелием.

ССВО и нейтрофилы от здоровых доноров с добавлением сыворотки больных с ССВО и хлорида лития в разных концентрациях (0,3; 3,0 и 9,0 мМ) инкубировали в течение 22 ч при 37 °С в увлажнённом CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем клетки центрифугировали при 400 g в течение 5 мин и ресуспендировали осадок в 70 мкл буфера (10 мМ HEPES, 120 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH = 7,4). К каждой пробе добавляли 2,5 мкл аннексина V, конъюгированного с флуоресцентным красителем FITC (ThermoFisher, США) и оставляли на 25 мин при 37 °С. Далее добавляли иодид пропидия до конечной концентрации 5 мкг/мл, инкубировали ещё 5 мин, после чего анализировали не менее 50 тысяч клеток с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter CytoFLEX. Апоптотическими считали аннексин V-положительные и пропидий иодид-отрицательные клетки.

Для статистического анализа использовались программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software bvba). Средние значения представлены медианой с межквартильным интервалом. Межгрупповые различия показателей оценивались при помощи U-критерия Манна-Уитни и принимались статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

### Результаты

Активация нейтрофилов – одна из стадий развития воспаления, при которой под действием внешних сигналов у нейтрофилов наблюдаются морфологические и физиологические изменения (уплощение, дегрануляция, миграция, секреция цитокинов, окислительный взрыв и другие). Чувствительными маркерами активации и дегрануляции являются молекулы CD11b и CD66b, которые находятся во внутриклеточных гранулах нейтрофилов.

В проведенном исследовании уровень экспрессии CD11b на поверхности интактных нейтрофилов (здоровые доноры) составлял 3577,50 у.е.ф. Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО при ИК увеличивала экспрессию тех же молекул в 1,5 раза в сравнении с экспрессией на интактных нейтрофилах. Добавление раствора хлорида лития в концентрации 9,0 мМ к интактным нейтрофилам незначительно уменьшало экспрессию молекул CD11b (табл. 1). Хлорид лития в концентрации 0,3 мМ, используемый при инкубации нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО, вызывал снижение экспрессии CD11b на уровне тенденции относительно экспрессии данной молекулы на контрольных активированных нейтрофилах без добавления препарата. Добавление лития хлорида в среду инкубации нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с

ССВО в больших концентрациях 3,0 и 9,0 мМ приводило к статистически значимому снижению уровня экспрессии CD11b на поверхности нейтрофилов в сравнении с контрольными активированными нейтрофилами (табл. 1). Сравнение уровня экспрессии CD11b на активированных нейтрофилах, которые инкубировали с хлоридом лития в концентрации 0,3 мМ, с уровнем экспрессии данной молекулы на интактных нейтрофилах статистически значимого различия не выявило. Хлорид лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ возвращал уровни экспрессии CD11b на активированных нейтрофилах к уровню экспрессии, показанному на интактных нейтрофилах. Более того, использование максимальной концентрации 9,0 мМ не значимо (на 30 %) снижало экспрессию этих молекул в сравнении с интактными нейтрофилами (табл. 1).

Выявленные в эксперименте закономерности экспрессии CD11b на нейтрофилах были также характерны и для экспрессии CD66b в тех же условиях. Уровень экспрессии CD66b на поверхности интактных нейтрофилов (здоровые доноры) составлял 10778,0 у.е.ф (табл. 2).

Инкубация нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО при ИК увеличивала экспрессию

Таблица 1

**Уровень экспрессии CD11b на поверхности нейтрофилов при воздействии сыворотки пациентов с развившемся синдромом системного воспалительного ответа после операций на сердце с искусственным кровообращением и раствора хлорида лития**

Нейтрофилы	Инкубация с раствором хлорида лития, концентрация	Экспрессия CD11b, у.е.ф.
Интактные	-	3577,50 [3389,0–3889,0]
	9,0 мМ	2978,9 [2588,0–3778,0]
Активированные	-	5369,0 [5115,0–5456,0] *
	0,3 мМ	5098,0 [4527,0–5375,0]
	3,0 мМ	3688,50 [3200,0–3974,0] #
	9,0 мМ	2998,50 [1912,0–3194,0] #

**Примечание.** Здесь и в табл. 2 и 3 интактные нейтрофилы – нейтрофилы, полученные от здоровых доноров; активированные нейтрофилы – интактные нейтрофилы, инкубированные с сывороткой крови пациентов с развившемся ССВО после ИК. Данные представлены медианой и межквартильным интервалом, \* -  $p < 0,05$  в сравнении экспрессией CD66b на интактных нейтрофилах, # -  $p < 0,05$  в сравнении экспрессией CD66b на активированных нейтрофилах (по Манна-Уитни).

CD66b в 1,4 раза в сравнении с экспрессией на интактных нейтрофилах. Добавление раствора хлорида лития в концентрации 9,0 мМ к интактным нейтрофилам значимо уменьшало экспрессию молекул CD66b по отношению к интактным нейтрофилам (табл. 2). Добавление хлорида лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ в среду инкубации нейтрофилов, активированных сывороткой крови пациентов с ССВО, вызывало статистически значимое уменьшение экспрессии CD66b на поверхности нейтрофилов в сравнении с экспрессией CD66b на активированных нейтрофилах без добавления хлорида лития. Использование концентрации 0,3 мМ при инкубации активированных нейтрофилов значимо не влияло на экспрессию CD66b в сравнении с его экспрессией на активированных нейтрофилах без добавления препарата. Уровень экспрессии CD66b на активированных нейтрофилах, которые инкубировали с хлоридом лития в концентрации 0,3 мМ, был значимо выше, чем экспрессия данной молекулы на интактных нейтрофилах.

Хлорид лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ восстанавливал уровни экспрессии CD66b на активированных нейтрофилах до уровня экспрессии на интактных нейтрофилах. Использование максимальной концентрации 9,0 мМ не значимо (на 20 %) снижало экспрессию этих молекул при сравнении с интактными нейтрофилами (табл. 2).

Апоптоз – крайне важный и сложно регулируемый этап в жизненном цикле нейтрофилов, поскольку слишком быстрая и массовая гибель нейтрофилов приведёт к нейтропении и подверженности организма инфекциям, а излишне долгая жизнь – напротив, может вызвать хроническое воспаление [14].

Таблица 2

**Уровень экспрессии CD66b на поверхности интактных нейтрофилов при воздействии сыворотки пациентов с развившемся синдромом системного воспалительного ответа после операций на сердце с искусственным кровообращением и раствора лития хлорида**

Нейтрофилы	Инкубация с раствором хлорида лития, концентрация	Экспрессия CD66b, у.е.ф.
Интактные	-	10778,0 [10088,0–11555,0]
	9,0 мМ	7555,0 [6888,0–8545,0] *
Активированные	-	15105,0 [15658,0–15892,0] *
	0,3 мМ	14187,0 [13678,0–15877,0] *
	3,0 мМ	11712,0 [10587,0–11985,0] #
	9,0 мМ	8333,0 [6989,0–9845,0] #

Результаты исследования показали, что уровень апоптоза нейтрофилов человека через 22 ч после выделения составляет 57,70%. Инкубация нейтрофилов с сыворотками пациентов, у которых развился ССВО после операций на сердце с ИК, значимо в 1,6 раза уменьшает количество нейтрофилов, которые подверглись спонтанному апоптозу. Добавление раствора хлорида лития в концентрации 9,0 мМ к интактным нейтрофилам значимо на 31% уменьшало количество нейтрофилов, которые подверглись спонтанному апоптозу. Апоптоз активированных нейтрофилов, инкубированных с растворами хлорида лития в концентрациях 0,3; 3,0 или 9,0 мМ был значимо ниже, чем спонтанный апоптоз интактных нейтрофилов. Хлорид лития в концентрациях 3,0 и 9,0 мМ, добавленный в среду инкубации нейтрофилов с сывороткой крови пациентов с ССВО, значимо увеличивал количество нейтрофилов, подвергшихся спонтанному апоптозу в сравнении с апоптозом активированных нейтрофилов (табл. 3).

Эти данные свидетельствуют, что сыворотка пациентов с развившемся ССВО после операций на сердце с ИК снижает возможности нейтрофилов к спонтанному апоптозу, а раствор лития хлорида в концентрации 3,0 мМ и выше, добавленный в среду инкубации, способен увеличить способность нейтрофилов к спонтанному апоптозу.

### Заключение

Проведенные исследования показали, что реализация противовоспалительного эффекта солей лития на повреждающие агенты осуществляется, в том числе, через воздействие на нейтрофилы, что при-

Таблица 3

**Уровень апоптоза анексин-положительных (ап+) нейтрофилов при инкубации с сыворотками пациентов с развившемся синдромом системного воспалительного ответа после операций на сердце с искусственным кровообращением и раствором лития хлорида**

Нейтрофилы	Инкубация с раствором хлорида лития, концентрация	Уровень апоптоза и некроза, %
Интактные	-	57,70 [56,70–58,30]
	9,0 мМ	39,95 [39,50–43,50]
Активированные	-	35,80 [33,80–39,00] *
	0,3 мМ	34,45 [33,90–35,10] *
	3,0 мМ	46,55 [43,00–47,70] *.#
	9,0 мМ	44,40 [40,50–48,80] *.#

водит к снижению экспрессии на их поверхности маркеров дегрануляции CD11b и CD66b. В тоже время раствор лития хлорида увеличивает способность нейтрофилов к спонтанному апоптозу. Полученные результаты позволяют предположить возможные перспективы применения лития хлорида для профилактики и лечения ССВО после операций на сердце с ИК.

### Литература

(п.п. 2-9; 13; 14 см. References)

1. Гребенчиков О.А., Лихванцев В. В., Плотников Е. Ю., Силачев Д.Н., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д. и др. Молекулярные механизмы развития и адресная терапия синдрома ишемии-реперфузии. *Анестезиология и реаниматология*. 2014; 3: 59–67.
10. Васильева А.К., Плотников Е.Ю., Казаченко А.В., Кирпатовский В.И., Зоров Д.Б. Ингибирование GSK<sub>3</sub>β снижает индуцированную ишемией гибель клеток почки. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* 2010; 149(3): 276–81.
11. Гребенчиков О.А., Лобанов А.В., Шайхутдинова Э.Р., Кузовлев А.Н., Ершов А.В., Лихванцев В.В. Кардиопротекторные свойства хлорида лития на модели инфаркта миокарда у крыс. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2019; 23(2): 43–9.
12. Острова И.В., Гребенчиков О.А., Голубева Н.В. Нейропротективное действие хлорида лития на модели остановки сердца у крыс (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология*. 2019; 15(3): 73–82.

### References

1. Grebenchikov O.A., Likhvantsev V.V., Plotnikov E.Yu., Silachev D.N., Pevzner I.B., Zorova L.D. et al. Grebenchikov Molecular mechanisms of ischemic-reperfusion syndrome and its therapy. *Anesthesiology and reanimatology*. 2014; 3: 59–67.
2. Ball L., Costantino F., Pelosi P. Postoperative complications of patients undergoing cardiac surgery. *Current Opinion in Critical Care*. 2016; 22(4): 386–92.

### Сведения об авторах:

**Гребенчиков Олег Александрович**, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. органопротекции при критических состояниях НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР, e-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru;

**Касаткина Ирина Сергеевна**, соискатель каф. патофизиологии ИВДПО ФНКЦ РР;

**Кузовлев Артем Николаевич**, доктор мед. наук, заместитель директора-руководитель НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР;

**Лобанов Александр Владимирович**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

**Ершов Антон Валерьевич**, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР.

3. Parkos A., Colgan P., Madara J.L. Interaction of Neutrophils With Epithelial Cells: Lessons From the Intestine. *J Am Soc Nephrol*. 1994; 5(2): 138–52.
4. Schmidt T., Zündorf J., Grüger T., Brandenburg K., Reiners A.L., Zinslerling J. et al. CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. *J. Leukoc. Biol.* 2012; 91(5): 791–802.
5. Lilius E.M., Nuutila J. Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression. *Scientific World Journal*. 2012; 2012: 527347.
6. Muller Kobold A., Tulleken J.E., Zijlstra J.G., Sluiter W., Hermans J. Leukocyte activation in sepsis ; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 2000; 26(7): 883–92.
7. Klein P.S., Melton D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development Proc. *Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 8455–9.
8. Stambolic V., Ruel L., Woodgett J.R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase<sub>3</sub> activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr. Biol.*, 1996; 6: 1664–8.
9. Zorov D.B., Kim S.H., Pepe S., Fu Q., Fishbein K.W., Ziman B.D. et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* 2004; 113(11): 1535–49.
10. Vasileva A.K., Plotnikov E.Y., Zorov D.B., Kazachenko A.V., Kirpatovsky V.I. Inhibition of GSK-3β decreases the ischemia-induced death of renal cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010; 149(3): 303–7.
11. Grebenchikov O.A., Lobanov A.V., Shayhutdinova E.R., Kuzovlev A.N., Ershov A.V., Likhvantsev V.V. Cardioprotective effect of lithium chloride on a rat model of myocardial infarction. *Circulatory pathology and cardiac surgery*. 2019; 23(2): 43–9.
12. Ostrova I.V., Grebenchikov O.A., Golubeva N.V. Neuroprotective effect of lithium chloride on a model of cardiac arrest in rats (experimental study). *Obshchaya reanimatologiya*. 2019; 15(3): 73–82.
13. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* 1992; 20(6): 864–74.
14. Bartels M, Murphy K, Rieter E, Bruin M. Understanding chronic neutropenia: Life is short. *Br J Haematol*. 2016; 172(2): 157–69.

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-002-008.953-091

Михайличенко М.И., Шаповалов К.Г., Мудров В.А., Фигурский С.А., Емельянов Р.С.

## Патогенетическое значение дисфункции эндотелия в формировании гипертонуса сосудистой стенки при местной холодовой травме

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 672000, Чита, Россия, ул. Горького, д. 39А

**Актуальность.** В структуре общего травматизма местная холодовая травма имеет большой удельный вес. Выявление новых маркеров криповреждения способствует более ранней диагностике глубины поражений тканей при обморожении, созданию новых подходов к хирургическому лечению и ускоренной реабилитации пострадавших.

**Цель исследования** — изучение в динамике содержания оксида азота, асимметричного диметиларгинина и циркулирующих эндотелиальных клеток в сыворотке крови у пациентов с местной холодовой травмой.

**Методика.** В исследование включено 80 пациентов с обморожениями нижних конечностей III–IV степени в позднем реактивном периоде и периоде гранулирования и эпителизации. Использован мультиплексный анализ сыворотки крови набором реагентов фирмы Biomedical (США), методом Hladovec (1978) и методом П.П. Голикова (2004) соответственно.

**Результаты.** У пациентов с криотравмой во всех исследуемых группах установлено снижение уровня оксида азота относительно контроля. У пострадавших с местной холодовой травмой на 5-е сут отмечено значительное снижение в крови уровня асимметричного диметиларгинина. на 30-е сут с момента криповреждения уровень асимметричного диметиларгинина не отличался от показателей контрольной группы. При обморожении дистальных сегментов стоп концентрация асимметричного диметиларгинина в крови не менялась относительно контроля. У пациентов с тяжелыми обморожениями нижних конечностей уровень асимметричного диметиларгинина в крови снижался в 3,6 раза. У пациентов с местной холодовой травмой на 5-е сут установлено увеличение в крови уровня циркулирующих эндотелиальных клеток в 5,2 раза, на 30-е сут с момента криповреждения уровень циркулирующих эндотелиальных клеток снижался, но, по-прежнему, превышал контрольные значения. У пострадавших с обморожением дистальных сегментов стоп содержание в крови циркулирующих эндотелиальных клеток увеличилось в 2,7 раза, с поражением проксимальных сегментов нижних конечностей – в 6,7 раза относительно здоровых добровольцев. У пациентов с наиболее тяжелыми обморожениями нижних конечностей уровень циркулирующих эндотелиальных клеток в крови повышался в 9 раз.

**Ключевые слова:** местная холодовая травма; дисфункция эндотелия; оксид азота; циркулирующие эндотелиоциты; асимметричный диметиларгинин.

**Для цитирования:** Михайличенко М.И., Шаповалов К.Г., Мудров В.А., Фигурский С.А., Емельянов Р.С. Патогенетическое значение дисфункции эндотелия в формировании гипертонуса сосудистой стенки при местной холодовой травме.

*Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 54-61.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.54-61

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста – М.И. Михайличенко; концепция и дизайн исследования – Р.С. Емельянов; сбор и обработка материала, подготовка иллюстративного материала – С.А. Фигурский; В.А. Мудров – статистическая обработка данных – В.А. Мудров; написание текста, редактирование – К.Г. Шаповалов..

**Для корреспонденции:** Михайличенко Максим Игоревич, e-mail: angelo999@yandex.ru

**Финансирование** Исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России.

**Конфликт интересов** Авторы подтвердили отсутствие конфликта интересов.

Поступила 20.08.2019.

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Mikhaylichenko M.I., Shapovalov K.G., Mudrov V.A., Figsursky S.A., Emelianov R.S.

### Pathogenetic significance of endothelial dysfunction in formation of vascular wall hypertonia in local cold trauma

Chita State Medical Academy,  
Gorkogo Str. 39a, Chita 672000, Russian Federation

The relevance of local cold injury remains high. In the structure of general injury prevalence, proportion of freeze burns is great. Identification of new markers of cold injury will help earlier determination of tissue lesion depth, development of new approaches in the surgical treatment of deep freeze burns of extremities, and promote rehabilitation of patients.

**The aim** of this study was to elucidate the dynamics of the serum content of nitric oxide (NO), asymmetric dimethylarginine (ADMA), and circulating endothelial cells (CEC) in patients with local cold injury.

**Methods.** The study included 80 patients with III-IV degree frostbite of the lower extremities in the late reactive period and the period of granulation and epithelization. Multiplex analyses of blood serum were performed with Biomedical (USA) reagent kits, according to methods by Hladovec (1978) and Golikov (2004).

**Results.** In all groups of patients with frostbite, NO level was decreased compared to the control. Patients with local cold trauma displayed significant decreases in blood levels of ADMA on day 5; on day 30 after the cold trauma, the ADMA level did not differ from the control group. In patients with frostbite of the distal foot segments, the blood concentration of ADMA did not change from the control level. In patients with the most severe frostbite of the lower extremities, serum ADMA decreased 3.6 times. Patients with local cold trauma had a 5.2-fold increase in the blood level of CEC on day 5. On day 30 after the freeze burn, the amount of CEC was decreased but still remained above the control value. In patients with frostbite of the distal foot segments, the content of CEC increased 2.7 times compared to the control. In patients with lesions of more proximal segments of the lower extremities, the CEC index was increased 6.7 times compared to healthy volunteers. In patients with the most severe frostbite of the lower extremities, the blood content of CEC was 9 times increased.

**Keywords:** local cold injury; endothelial dysfunction; nitric oxide; circulating endothelial cells; asymmetric dimethylarginine.

**For citation:** Mikhaylichenko M.I., Shapovalov K.G., Mudrov V.A., Figurski S.A., Emelianov R.S. Pathogenetic significance of endothelial dysfunction in formation of vascular wall hypertonia in local cold trauma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 54-61. In Russian. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.54-61

**Contribution.** M.I. Mikhailichenko – research concept and design, material collecting and processing; R.S. Emelyanov – research concept and design; S.A. Figurski – material collecting and processing, preparation of illustrative material; V.A. Mudrov – statistical processing; K.G. Shapovalov – writing text, text editing.

**For correspondence:** Maxim I. Mikhailichenko, candidate of medical science, assistant of the department of surgery, Chita state medical academy, Chita, Russia. E-mail: angelo999@yandex.ru.

**Financing:** The study was supported by the Chita state medical Academy, Chita, Russia.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest. The article has not been published anywhere before.

**Expression of gratitude:** The authors team expresses gratitude to the rectorate of the "Chita state medical Academy" and personally to the rector MD, Professor A. V. Govorin for the financial support and the realization scientific ideas.

#### Information about the authors:

Mikhailichenko M.I., <https://orcid.org/0000-0001-8660-2982>

Shapovalov K.G., <https://orcid.org/0000-0002-3485-5176>

Mudrov V.A., <https://orcid.org/0000-0002-5961-5400>

Figurski F.A., <https://orcid.org/0000-0002-3959-9503>

Emelyanov R.S., <https://orcid.org/0000-0001-7145-1624>

Resived 20.08.2019

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

В первой половине XX века высказано предположение об основополагающей роли эндотелия и микроциркуляторного русла в развитии многих заболеваний [1]. Буквально за несколько лет учения об эндотелиальной дисфункции приобрели массовый характер, выявлены и установлены дисфункциональные эндотелиальные патогенетические маркеры, лежащие в основе практически всех эндогенных заболеваний. Этот эндокринный орган высочайшей дифференциации считается в настоящее время одним из основных регуляторов жизненных процессов в норме, и фактором провоцирующим тотальный сбой в работе большинства систем организма в условиях патологии [1–4].

В связи с тем, что в России с ее географическим положением низкие температуры не редкое явление, а в некоторых регионах преобладают большую часть года, актуальность изучения местной холодовой травмы остается на высоком уровне [3]. В структуре общего травматизма локальное криоповреждение имеет большой удельный вес [1, 2, 4]. Возросший за последние годы интерес отечественных и зарубежных исследователей к изучению патогенетических основ развития, течения и отдаленных последствий местной холодовой травмы связан с высокой частотой инвалидизации, особенно у пациентов с III–IV степенью обморожения. Очень важными факторами являются утрата тру-

доспособности преимущественно лиц молодого возраста, сложности в диагностике, а также неудовлетворительные результаты лечения [2, 3, 5, 6].

Выявление новых маркеров криоповреждения способствует более ранней диагностике глубины поражений тканей, созданию новых подходов к хирургическому лечению глубоких отморожений конечностей и ускоренной реабилитации пострадавших [2–6].

Дисфункция эндотелия играет главную роль в запуске патогенетических механизмов МХТ. Под термином «эндотелиальная дисфункция» понимают неадекватное выделение эндотелием различных биологически активных веществ, в частности оксида азота, его ингибиторов [4]. Особый интерес представляет морфофункциональное состояние эндотелиальной выстилки, и наличие свободно циркулирующих в кровотоке десквамированных эндотелиальных клеток [6–8].

Первым доказательством роли эндотелия в регуляции тонуса сосудов явились данные о продуцировании им вазоактивных веществ, появившиеся в 1977 г. [8]. Позже, в 1980 г., было высказано предположение, что может существовать расслабляющий сосудистый фактор, связанный с эндотелием [9]. Впоследствии две независимых группы исследователей показали, что этот расслабляющий фактор представляет собой оксид азота (NO) [10, 11].

Позднее M. Mudau и соавт. выявлен еще один маркер, связанный с метаболизмом NO, а именно асимметричный диметиларгинин (ADMA) [10, 12, 13]. Изучение ADMA, как молекулы антагониста L-аргинина, основного субстрата NOS, — очень важный шаг в понимании процессов дегградации сосудистой стенки на ранней, клинически немой стадии заболевания [11, 12, 14]. Дополнительные исследования в области фундаментальной науки и клинических испытаний необходимы для понимания роли этой молекулы в качестве перспективного маркера будущих коронарных событий и возможной терапевтической мишени в контексте атеросклеротического сосудистого заболевания и последствий любых повреждений.

Вы современной литературы мы не обнаружили комплексных работ, посвященных вазоактивной составляющей дисфункции эндотелия у пациентов с местной холодовой травмой. В связи этим, попытка сформировать новое звено патогенеза местной холодовой травмы легла в основу нашего труда.

**Цель исследования** — установить динамику содержания уровня оксида азота, асимметричного диметиларгинина и циркулирующих эндотелиальных клеток в сыворотке у пациентов с местной холодовой травмой.

## Методика

Все пациенты и добровольцы, участвовавшие в клиническом исследовании, давали письменное добровольное информированное согласие, в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (в ред. 2013 г.). Протокол исследования одобрен этической комиссией Читинской государственной медицинской академии.

Исследование включено 80 пациентов (60 мужчин и 20 женщин) с обморожениями III–IV степени пальцев стопы (1-я группа), поражением III–IV степени пальцев и среднего отдела стопы (2-я группа), либо всей стопы

(3-я группа) в позднем реактивном периоде и периоде гранулирования и эпителизации. Средний возраст пациентов составил  $43 \pm 7$  лет. Определение уровня асимметричного диметиларгинина (ADMA), оксида азота (NO), и циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в сыворотке крови выполнялось на 5-е и 30-е сут с момента получения травмы у одних и тех же пациентов. Уровень ADMA определяли с помощью мультиплексного анализа сыворотки крови набором реагентов фирмы Biomedical (США). Количество десквамированных эндотелиоцитов в крови выявляли методом Hladovec (1978). Метод основан на изоляции клеток вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов с помощью АДФ. Определение нитритов крови осуществляли непрямой метод П.П. Голикова (2004). Все пострадавшие находились на стационарном лечении в краевом центре термической травмы на базе городской больницы № 1 г. Читы с местной холодовой травмой нижних конечностей в период с 2018 по 2019 г. Контрольную группу составили сопоставимые по возрасту относительно здоровые лица ( $n=16$ ). Из исследования были исключены пациенты с тяжелой соматической патологией: неспецифическими воспалительными процессами различной локализации, облитерирующими заболеваниями сосудов, поражениями нервов конечностей, сахарным диабетом, гипертонической болезнью, алиментарным истощением, лица с физической алкогольной зависимостью.

**Статистический анализ.** Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0. Полученные данные представлены в виде медианы, средней величины и доверительного интервала. Для сравнения показателей, распределение которых отличалось от нормального, использован непараметрический критерий Краскела–Уол-

лиса. Оценка статистической значимости различий показателей проводилась за счет сравнения рассчитанного и критического значений критерия Краскела–Уоллиса с последующим определением уровня значимости  $p$ . Учитывая выявление различий при сравнении всех исследуемых групп с помощью критерия Краскела–Уоллиса для более точного описания наблюдаемых тенденций использован критерий Манна–Уитни, позволяющий оценить различия показателей при сравнении групп попарно, с применением поправки Бонферрони при оценке значения  $p$ . Учитывая отсутствие нормального распределения, для оценки связи между двумя показателями использован коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $\rho$ ). Исходя из полученного значения  $\rho$  определена теснота связи по шкале Чеддока и ее направление (прямая или обратная). Прогностическая модель построена путем нелинейного регрессионного анализа. В последующем рассчитывали скорректированный коэффициент детерминации, показывающий долю объясняемой зависимости.

### Результаты

Как показали результаты исследования у пациентов с местной холодовой травмой на 5-е сут установлено снижение уровня NO в крови в 1,5 раза. На 30-е сут с момента криоповреждения уровень NO в крови был еще ниже – в 2,5 раза относительно контрольной группы (табл. 1). У пострадавших с обморожением дистальных сегментов стоп содержание NO в крови уменьшилась в 1,7 раза, у больных с поражением более проксимальных сегментов нижних конечностей – в 2,3 раза, у пациентов с самыми тяжелыми обморожениями нижних конечностей уровень NO в крови снижался в 2,9 раза (табл. 2).

Значительное снижение уровня ADMA в системном кровотоке (в 4,5 раза) наблюдалось у пациентов с местной холодовой травмой на 5-е сут. При этом и на 30-е сут с момента криоповреждения уровень ADMA не изменялся относительно контрольной группы (табл. 1). У пострадавших с обморожением дистальных сегментов стоп и более проксимальных сегментов нижних конечностей уровень ADMA значимо не отклонялся от контроля. У пациентов с самыми тяжелыми обморожениями нижних конечностей уровень ADMA в крови снижался в 3,6 раза (табл. 2).

Содержание ЦЭК в крови пациентов с местной холодовой травмой на 5-е сут возрастал в 5,2 раза. При этом на 30-е сут с момента криоповреждения уровень ЦЭК снижался, но, по-прежнему, оставался значимо выше контроля (в 1,9 раза) (табл. 1). У пострадавших с обморожением дистальных сегментов стоп содержание ЦЭК в крови увеличилось в 2,7 раза, у больных с поражением более проксимальных сегментов нижних конечностей – в 6,7 раза, у пациентов с самыми тяжелыми обморожениями нижних конечностей уровень ЦЭК в крови повышался в 9 раз (табл. 2).

### Обсуждение

В настоящее время считается, что оксид азота имеет большое значение для поддержания целостности эндотелия, а его гипоинкреция провоцирует изначальную нестабильность клеточной мембраны эндотелиоцита [12, 15]. Механизм этого явления пока не установлен.

Известно, что уровень NO в крови при местной холодовой травме снижен практически на всех сроках наблюдения [5, 6]. По мнению ряда авторов [6], поврежденный холодом эндотелий утрачивает возможность инкретировать оксид азота. По своей сути эндотенный оксид азота является важнейшим перифери-

Таблица 1

Динамика концентрации вазоактивных молекул и уровня ЦЭК у пострадавших в разные периоды криотравмы

Показатель	Контроль, $n=16$	5-е сут с момента травмы, $n=50$	30-е сут с момента травмы, $n=50$
NO (мкмоль/л)	4,10±0,13 (95% CI 4,00-4,20)	2,15±0,23 (95% CI 2,00-2,30) $p<0,0001$	1,52±0,19 (95% CI 1,40-1,70) $p<0,0001$ $p_I=0,037276$
ADMA (ng/ml)	181,49±37,91 (95% CI 150,65-205,45)	40,94±18,32 (95% CI 30,02-48,46) $p=0,001420$	85,98±29,44 (95% CI 69,39-95,81) $p=0,050953$ $p_I=0,197047$
ЦЭК, ×10 <sup>4</sup> /л статистически значим	2,15±0,19 (95% CI 2,00-2,30)	13,10±1,41 (95% CI 12,30-14,00) $p<0,0001$	4,54±0,43 (95% CI 4,20-4,90) $p<0,0001$ $p_I<0,0001$

**Примечание.**  $p$  – статистическая значимость различий с показателями контроля;

$p_I$  – с показателями предыдущего срока наблюдения. CI – доверительный интервал.

ческим вазодилататором [4, 12, 16, 17]. Не исключено, что при снижении уровня эндогенного NO уменьшение уровня ADMA является компенсаторным механизмом защиты и попыткой купирования стойкого периферического вазоспазма путем стимуляции, либо снижение обеих вазоактивных молекул – есть следствие критической дисфункции эндотелиоцитов, что подтверждается резким повышением уровня десквамированных эндотелиальных клеток в кровотоке.

Оксид азота не только участвует в регуляции тонуса сосудов, но и тормозит агрегацию тромбоцитов, их адгезию к стенкам сосудов, обладает цитотоксическим и рядом других эффектов [4, 6]. Следовательно, снижение уровня NO влечет за собой повышение уровня агрегационной активности тромбоцитов и увеличение количества лейкоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов, которые мигрируя в межтучное пространство, усиливают интерстициальный отек и провоцируют эндотелиальную дисфункцию как в очаге альтерации, так и перифокально [1, 5, 6].

Помимо этого, NO имеет прямое влияние на поддержание кровотока путем регуляции мышечного тонуса [13-17]. Сосудистый гипертонус у пациентов с местной холодовой травмой подтвержден ранее проведенными исследованиями с помощью лазерной доплеровской флоуметрии [5, 6]. В работах указывается на выраженный дефицит кровенаполнения микроциркуляторного русла, что пагубно влияет на трофику тканей и усугубляет гипоксию тканей. В последнее время важную роль в нарушении высвобождения оксида азо-

та отводят ингибированию синтазы оксида азота действием асимметричного диметиларгинина, который блокируется естественным субстратом данного фермента – L-аргинином [4].

Но как показано сравнительно недавно, ADMA имеет гораздо больше клинических эффектов, помимо его влияния на L-аргинин. Резкое повышение уровня ADMA вызывает временное падение частоты сердечных сокращений с уменьшением сердечного выброса и повышением артериального давления [8]. Мало известно и о потенциальных долгосрочных эффектах повышенного уровня ADMA. Zoccali et al. сообщают, что повышение уровня ADMA в 1,5 раза повышает риск сердечно-сосудистой смертности в 7 раз, а его повышение в 2 раза – в 15 раз [16]. Интересно, что недавно был предложен NOS-независимый активирующий эффект ADMA на ангиотензинпревращающий фермент, который, как известно, является доминирующим в ренин-ангиотензиновой системе, оказывающей прямое действие на метаболизм в сосудистой стенке [18, 19].

Ранее показано, что увеличение концентрации ADMA приводит к значительному снижению выработки NO [11,14]. Формирующаяся эндотелийзависимая вазоконстрикция лежит в основе патогенеза многих заболеваний, в частности сахарного диабета, артериальной гипертензии, почечной недостаточности, осложненного акушерства. [11, 17, 20]. В когорте пациентов с гемодиализом обнаружили, что ADMA может быть сильным и независимым фактором риска общей

Таблица 2

**Динамика концентрации вазоактивных молекул и уровня ЦЭК у пострадавших в зависимости от уровня поражения**

Показатель	Контроль, n=16	1-я группа, n= 34	2-я группа, n= 34	3-я группа, n= 32
NO (мкмоль/л)	4,10±0,13 (95% CI 4,00-4,20)	2,21±0,18 (95% CI 2,10-2,33) $p<0,0001$	1,83±0,14 (95% CI 1,80-1,90) $p<0,0001$ $p_1=0,100444$	1,47±0,10 (95% CI 1,40-1,50) $p<0,0001$ $p_1=0,000640$ $p_2=0,040432$
ADMA (ng/ml)	181,49±37,91 (95% CI 150,65-205,45)	169,63±18,77 (95% CI 165,05-178,28) $p=0,780429$	109,76±13,50 (95% CI 100,36-114,48) $p=0,081133$ $p_1=0,011851$	50,10±16,17 (95% CI 37,90-56,59) $p=0,002607$ $p_1<0,0001$ $p_2=0,006199$
ЦЭК, ×10 <sup>4</sup> /л	2,15±0,19 (95% CI 2,00-2,30)	6,35±0,47 (95% CI 6,00-6,73) $p<0,0001$	14,69±1,40 (95% CI 14,00-15,00) $p<0,0001$ $p_1<0,0001$	19,88±2,40 (95% CI 18,40-20,60) $p<0,0001$ $p_1<0,0001$ $p_2=0,066425$

**Примечание.**  $p$  – статистическая значимость различий с показателями контроля;  $p_1$  – с показателями 1-й группы;  $p_2$  – с показателями 2-й группы. CI – доверительный интервал

смертности и сердечно-сосудистых катастроф [19, 21]. В настоящее время взгляды на метаболизм асимметричного диметиларгинина претерпевают значительные изменения.

При анализе полученных результатов отмечается значительное снижение ADMA в сыворотке крови у пациентов с местной холодовой травмой в раннем реактивном периоде по сравнению с контрольной группой. При этом содержание ADMA в сыворотке снижено и на 30-е сут с момента криоповреждения. Подобный феномен, вероятно, связан со стойким периферическим вазоспазмом, дефицитом NO-зависимых механизмов вазодилатации и вероятной гибелью эндотелиальной выстилки в очаге альтерации и перифокально. Факт выраженной деструкции эндотелиоцитов подтверждают и выполненные ранее работы, установившие значительное повышение содержания цитокинов в периферической крови [5]. Последние, как известно, в значительных концентрациях имеют выраженный опосредованный цитотоксический эффект [1, 20].

Отмечено статистически значимое снижение уровня асимметричного диметиларгинина в крови у пациентов с тяжелой местной холодовой травмой, а именно у пострадавших с обморожениями всей стопы и дистальных сегментов голени. У пациентов с обморожениями пальцев уровень ADMA не изменился.

После восстановления кровотока в поврежденных сегментах конечностей десквамированные эндотелиальные клетки в большом количестве выбрасывались в системный кровоток. Кроме того, неравномерное повышение температуры сопровождалось гипоксией и дегрануляцией новых порций тромбоцитов. Помимо этого, патологическая болевая импульсация провоцирует инкрецию значительного количества катехоламинов и прочих стресс-гормонов. Указанные процессы также должны сопровождаться десквамацией клеток эндотелия. В более поздние сроки криотравмы, а именно на 30-е сут, происходило отграничение очага альтерации, а также выполнялись некрэктомии, экзартикуляции и ампутации сегментов конечностей, при этом

снижался объем поврежденных тканей, что нашло свое подтверждение и в уменьшении количества ЦЭК.

Вероятно, увеличение объема поврежденных тканей провоцирует значительное повреждение сосудистой стенки, гибель эндотелиоцитов и обнажение субэндотелиального матрикса. В ответ на это активируется все большее количество тромбоцитов, которые реализуют процессы воспаления и привлекают в очаг альтерации иммунокомпетентные клетки. Тромбоциты выделяют тромбоксан A<sub>2</sub>, являющийся мощнейшим вазоконстриктором. Процессы периферического вазоспазма еще больше усугубляются. Снижение уровня ADMA у пациентов с выраженной площадью альтерации, вероятно, опять-таки является механизмом стабилизации периферического вазоспазма и усугубляющейся ишемии путем попытки косвенной провокации синтеза оксида азота, хотя его уровень снижен во все периоды криоповреждения. Однако некоторые авторы предполагают, что существуют механизмы, с помощью которых низкие концентрации NO и ADMA оказывают неблагоприятное воздействие на сосудистую систему [21-24]. Не исключено, что влияние ADMA на ангиотензинконвертирующий фермент провоцирует аккумуляцию бета-амилоидных бляшек в субэндотелиальном матриксе, что ведет к дезорганизации клеточной мембраны и хронизации процессов воспаления.

Таким образом, судить об объеме криоповреждения возможно по значению одного из показателей дисфункции эндотелия (ADMA, NO или ЦЭК) (табл. 3).

Между тем, гипотетически существует вероятность увеличения эффективности диагностики уровня криоповреждения при одновременном учете нескольких показателей.

Вторым этапом исследования явилось создание и оценка эффективности прогностической модели. С целью прогнозирования объема криоповреждения разработан коэффициент К, расчет которого основан на нелинейном регрессионном анализе и выражается формулой:  $K = 100 \times \text{ЦЭК} / (\text{ADMA} \times \text{NO})$ , где ЦЭК – циркулирующие эндотелиальные клетки, ADMA –

Таблица 3

**Фактическая степень параллелизма между объемом криоповреждения и уровнем показателей дисфункции эндотелия**

Показатели дисфункции эндотелия	Коэффициент корреляции Спирмена	Сила связи по шкале Чеддока	Направление связи
ADMA	- 0,898	высокая	обратная
NO	- 0,945	высокая	обратная
ЦЭК	0,955	высокая	прямая

## Сводка для полученной модели

Модель	R	R <sup>2</sup>	Скорректированный R <sup>2</sup>	Стандартная ошибка оценки
$K = 100 \times \text{ЦЭК} / (\text{ADMA} \times \text{NO})$	0,988	0,975	0,975	0,165

**Примечание.** R – коэффициент множественной корреляции; R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации или для дисперсии в зависимой переменной.

асимметричный диметиларгинин, NO – оксид азота. При значениях коэффициента K от 1,0 до 5,0 прогнозируется отморожение на уровне пальцев, от 5,0 до 13,0 – на уровне дистального сегмента стопы, более 13,0 – на уровне нижней трети голени. Коэффициент корреляции между объемом поражения тканей нижних конечностей и значением коэффициента K составляет 0,963. Связь между исследуемыми признаками – прямая, теснота (сила) связи по шкале Чеддока – высокая. Учитывая результаты статистического анализа, можно считать разработанную модель близкой к функциональной (табл. 4).

Сформированная модель позволяет с высокой точностью прогнозировать уровень повреждения тканей при местной холодовой травме на основе исследуемых маркеров, что, вне всякого сомнения, имеет важное прикладное значение и способствует коррекции проводимого лечения.

## Выводы

У пациентов с местной холодовой травмой в крови снижается уровень NO и ADMA во все периоды криповреждения.

Максимальное снижение уровня NO и ADMA в крови у пациентов с местной холодовой травмой отмечено на 5-е сутки с момента местной холодовой травмы.

Содержание NO и ADMA в кровотоке зависит от тяжести криповреждения. Минимальный уровень зарегистрирован у пациентов с наибольшей тяжестью травмы.

Объем пораженных тканей прямо пропорционален уровню ЦЭК в сыворотке пострадавших. В поздние сроки с момента травмы уровень ЦЭК не отличается от показателей контроля ввиду снижения процессов воспаления и уменьшения площади поврежденной сосудистой стенки.

**Благодарность.** Коллектив авторов выражает благодарность ректорату ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» МЗ РФ и лично ректору доктору мед. наук, проф. А.В. Говорину за финансовую поддержку и возможность реализации научных идей сотрудников академии.

Литература  
(8–24 см. References)

1. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. *Медицинская иммунология*. 2006; 8(5-6): 745-53.
2. Николаев В.М., Алексеев Р.З., Федорова С.А. Интенсивность свободнорадикального окисления липидов в организме больных холодовой травмой. *Якутский медицинский журнал*. 2018; 2(62): 34-8.
3. Целуйко С.С., Заболотских Т.В., Дудариков С.А., Красавина Н.П., Корнеева Л.С. Действие холода на организм. Криопротекторы и средства противоишемической защиты тканей. *Якутский медицинский журнал*. 2018; 2(62): 48-55.
4. Васина Л.В., Власов Т.Д., Петрищев Н.Н. Функциональная гетерогенность эндотелия (обзор). *Артериальная гипертензия*. 2017; 23(2): 88-102.
5. Шаповалов К.Г. Томина Е.А., Михайличенко М.И., Иванов В.А., Витковский Ю.А. Содержание цитокинов в крови больных при местной холодовой травме. *Медицинская иммунология*. 2008; 10(1): 89-92.
6. Шаповалов К.Г. Сизоненко В.А., Томина Е.А., Витковский Ю.А. Эндотелиальная секреция вазоактивных молекул при холодовой травме конечностей. *Травматология и ортопедия России*. 2008; 2(48): 53-6.
7. Коннов Д.Ю., Малярчиков А.В., Шаповалов К.Г., Коннов В.А. Закономерности изменений параметров микроциркуляции и электрофизиологических показателей сердечного ритма при критической гипотермии. *Забайкальский медицинский вестник*. 2017; 4: 17-24.

## References

1. Vitkovskiy Y.A., Kuznik B.I., Solpov A.V. Pathogenetic significance of lymphocyte-platelet adhesion. *Medinskaya Immunologiya*. 2006; 8(5-6): 745-53. (In Russian)
2. Nikolaev V.M., Alekseev R.Z., Fedorova S.A. Intensity of free radical oxidation of lipids in the body of patients with cold injury. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 2(62): 34-8. (In Russian)
3. Tseluyko S.S., Zabolotskikh T.V., Dudarikov S.A., Krasavina N.P., Korneeva L.S. The Effect of cold on the body. Cryoprotectants and means of anti-ischemic protection of fabrics. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 2(62): 48-55. (In Russian)
4. Vasina L.V., Vlasov T.D., Petrishchev N.N. Functional heterogeneity of the endothelium (review). *Arterialnaya gipertenziya*. 2017; 23(2): 88-102. (In Russian)
5. Shapovalov K.G., Tomina E.A., Mikhailichenko M.I., Ivanov V.A., Vitkovskiy Y.A. The content of cytokines in the blood of patients with local cold injury. *Meditsinskaya Immunologiya*. 2008; 10(1): 89-92. (In Russian)

6. Shapovalov K.G., Sizonenko V.A., Tomina E.A., Vitkovsky Y.A. Endothelial secretion of vasoactive molecules in cold extremity injury. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2008; 2(48): 53-6. (In Russian)
7. Konnov D.Yu., Malyarchikov A.V., Shapovalov K.G., Konnov V.A. Regularities of changes in microcirculation parameters and electrophysiological parameters of heart rate in critical hypothermia. *Zabakalskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 4: 17-24. (In Russian)
8. Strijdom H. Endothelial dysfunction: are we ready to heed the vasculature's early-warning signal. *Cardiovasc Journal*. 2012; 23(4): 184-5.
9. Moncada S., Herman A.G., Higgs E.A., Vane J.R. Differential formation of prostacyclin (PGX or PG12) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thrombosis Res*. 1977; 11: 323-44.
10. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-6.
11. Ignarro L.J., Byrns R.E., Buga G.M., Wood K.S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Resources*. 1987; 61: 866-79.
12. Landim M.B., Casella F.A., Chagas A.C. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2009; 64(5): 471-8.
13. Mudau M., Genis A., Lochner A., Strijdom H. Endothelial dysfunction – the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc Journal*. 2012; 23(4): 222-31.
14. Napoli C., Ignarro L.J. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide*. 2001; 5: 88-97.
15. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Natural Immunology*. 2001; 2: 907-16.
16. Zoccali C., Bode-Böger S., Mallamaci F., Benedetto F., Tripepi G., Malatino L. et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*. 2001; 358: 2113-7.
17. Savvidou M.D., Hingorani A.D., Tsikas D., Frolich J.C., Vallance P. et al. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet*. 2003; 361: 1511-7.
18. Suda O., Tsutsui M., Morishita T., Tasaki H., Ueno S. et al. Asymmetric dimethylarginine causes arteriosclerotic lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: Involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress. *Vascular Biology*. 2014; 24: 1682-8.
19. Achan V., Broadhead M., Malaki M., Whitley G., Leiper J. et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Vascular Biology*. 2003; 23:1455-9.
20. Cooke J.P. Asymmetrical dimethylarginine: The Uber marker. *Circulation*. 2004; 17: 170-7.
21. Zoccali C., Bode-Boger S., Mallamaci F., Benedetto F., Tripepi G. et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: A prospective study. *Lancet*. 2001; 358: 2113-7.
22. Valkonen V.P., Paiva H., Salonen J.T., Lakka T.A., Lehtimäki T. et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet*. 2001; 358: 2127-212.
23. Kingma C.F., Hofman I.I., Daanen H.A. Relation between finger cold-induced vasodilation and rewarming speed after cold exposure. *European Physiology*. 2019; 119(1): 171-80. DOI: 10.1007.
24. Dipak P.R., Thomas S. Davies Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokines*. 2015; 26(6): 673-85. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003.

#### Сведения об авторах:

**Михайличенко Максим Игоревич**, канд. мед. наук, ассистент каф. факультетской хирургии с курсом урологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: angelo999@yandex.ru, SPIN-код: 4975-6313;

**Шаповалов Константин Геннадьевич**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: shkg26@mail.ru, SPIN-код: 6086-5984;

**Мудров Виктор Андреевич**, канд. мед. наук, доцент каф. акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: mudrov\_viktor@mail.ru, SPIN-код: 5821-3203;

**Фигурский Сергей Александрович**, ассистент каф. лучевой диагностики ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: figura89@yandex.ru, SPIN-код: 9902-2915;

**Емельянов Руслан Сергеевич**, ассистент каф. анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: ruslan.emelyanov.91@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.72-002.77

Полякова Ю.В.<sup>1</sup>, Сивордова Л.Е.<sup>1</sup>, Ахвердян Ю.Р.<sup>1</sup>, Шилова Л.Н.<sup>2</sup>, Заводовский Б.В.<sup>1,2</sup>

## Никотинамид фосфорибозилтрансфераза – провоспалительная молекула, характеризующая тяжесть течения ревматоидного артрита

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии» ФАНО России, 400138, Волгоград, Россия, ул. им. Землячки, д. 76;<sup>2</sup>ФГБОУВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, 400131, Волгоград, Россия, площадь Павших Борцов, д. 1

Никотинамид фосфорибозилтрансфераза (Nampt) стимулирует синтез матричных металлопротеиназ и хемокинов, поддерживающих синовиальное воспаление, обусловленное лейкоцитарной инфильтрацией. Положительная корреляция между Nampt и С-реактивным белком подтверждает его роль как медиатора воспаления. Считается, что повышенные концентрации Nampt могут стимулировать системное воспаление.

**Цель исследования** – изучение концентрации Nampt в сыворотке крови у больных ревматоидным артритом.

**Методика.** Концентрацию Nampt в сыворотке крови определяли непрямой методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест систем (RaiBiotech, cat№ EIA-VIS-1) согласно инструкции изготовителя.

**Результаты.** Повышенный уровень Nampt в сыворотке крови был выявлен у 84,29% пациентов. Больные ревматоидным артритом с повышенным уровнем Nampt статистически значимо чаще имели более высокую степень активности (II степень активности) по индексу DAS28 – высокий уровень антител к цитруллированному пептиду, более высокий уровень С-реактивного белка, СОЭ, внесуставные проявления заболевания.

**Заключение.** Предполагается, что Nampt может рассматриваться как важное звено в поддержании воспаления при ревматоидном артрите и потенциальная молекула для направленного воздействия на воспалительный процесс.

**Ключевые слова:** никотинамид фосфорибозилтрансфераза; Nampt; ревматоидный артрит; воспаление; адипокины; цитокины.

**Для цитирования:** Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Ахвердян Ю.Р., Шилова Л.Н., Заводовский Б.В. Никотинамид фосфорибозилтрансфераза – провоспалительная молекула, характеризующая тяжесть течения ревматоидного артрита. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 62-68.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.62-68

**Для корреспонденции:** Полякова Юлия Васильевна, e-mail: jpolyakova@yandex.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Полякова Ю.В., Заводовский Б.В.; проведение эксперимента, сбор и обработка материала – Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Ахвердян Ю.Р., Шилова Л.Н.; статистическая обработка, написание текста – Полякова Ю.В.; редактирование – Шилова Л.Н., Заводовский Б.В.; утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

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

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

Поступила 16.05.2020

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Polyakova Y.V.<sup>1</sup>, Seewordova L.E.<sup>1</sup>, Akhverdyan Y.R.<sup>1</sup>, Shilova L.N.<sup>2</sup>, Zavadovsky B.V.<sup>1,2</sup>

## Nicotinamide phosphoribosyltransferase is a proinflammatory molecule characterizing severity of rheumatoid arthritis

<sup>1</sup>Research Institute for Clinical and Experimental Rheumatology, Zemlyachky Str. 76, Volgograd 400138, Russia;<sup>2</sup>Volgograd State Medical University, Ploshchad Pavshikh Bortsov 1, Volgograd 400131, Russia

Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) stimulates synthesis of matrix metalloproteinases and chemokines, which support synovial inflammation caused by leukocyte infiltration. A positive correlation between NAMPT and C-reactive protein confirms the role of NAMPT as an inflammatory mediator. Increased concentrations of NAMPT are considered stimulators of systemic inflammation. **The aim** of this study was to evaluate serum concentrations of NAMPT in patients with rheumatoid arthritis.

**Methods.** Serum concentration of NAMPT was determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay with commercial kits (RaiBiotech, cat.# EIA-VIS-1) according to the manufacturer's instructions.

**Results.** Elevated serum NAMPT was detected in 84.29% of patients. Rheumatoid arthritis patients with higher NAMPT concentrations significantly more likely had a higher activity score DAS28 (disease activity degree II), a high level of antibodies to citrullinated peptide vimentin, higher levels of C-reactive protein, and higher red blood cell sedimentation rate.

**Conclusion.** NAMPT can be regarded as an important component of the pathogenesis of rheumatoid arthritis and a candidate target molecule for therapy.

**Keywords:** Nicotinamide phosphoribosyltransferase; NAMPT; rheumatoid arthritis; inflammation; adipokines; cytokines

**For citation:** Polyakova Y.V., Seewordova L.E., Akhverdyan Y.R., Shilova L.N., Zavodovsky B.V. Nicotinamide phosphoribosyltransferase is a proinflammatory molecule characterizing severity of rheumatoid arthritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 62-68. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.62-68

**For correspondence:** Yuliya Polyakova, Candidate of Medical Sciences, Researcher Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology», 76 Zemlyachky Str., Volgograd 400138, Russia, e-mail: jpolyakova@yandex.ru

**Contribution:** research concept and design – Polyakova Y.V., Zavodovsky B.V.; performing an experiment, material collecting and processing – Polyakova Y.V., Seewordova L.E., Akhverdyan Y.R., Shilova L.N.; statistical processing, writing text – Polyakova Y.V.; text editing – Shilova L.N., Zavodovsky B.V. Approval of the final version of the article – all co-authors.

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

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

**Information about the authors:**

Polyakova Y.V., <http://orcid.org/0000-0002-3022-4166>

Seewordova L.E., <https://orcid.org/0000-0002-0965-6060>

Akhverdyan Y.R., <https://orcid.org/0000-0001-8010-6777>

Shilova L.N., <http://orcid.org/0000-0002-0438-8554>

Zavodovsky B.V., <http://orcid.org/0000-0002-8864-9570>

Received 16.05.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое воспалительное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением суставов по типу эрозивно-деструктивного прогрессирующего полиартрита, сопровождающееся нарушениями гуморального и клеточного иммунитета, которые придают ревматоидному воспалению характер иммуноопосредованного, сопровождающегося безудержной пролиферацией синовиоцитов. Дискоординация синтеза цитокинов приводит к прогрессирующему разрушению хрящевой и костной ткани с нарушением функции суставов [1].

В настоящее время в патогенезе РА рассматривается ведущая роль Т-лимфоцитов, моноцитмакрофагальных клеток, синтезирующих цитокины, которые обладают провоспалительной активностью, и роль автономных неиммунных механизмов, определяющих опухолеподобный рост синовиальной ткани, приводящий к деструкции суставного хряща [2]. Сходство ревматоидного синовита и локализованного злокачественного новообразования проявляется и на молекулярном уровне. Основываясь на опыте исследований по другим заболеваниям, в частности рака [3, 4], можно предположить возможность системного биологического подхода в лечении РА, основанного на сочетании

биоинформатики, протеомики, транскриптомики и метаболитных методологий с высокой точностью определения клинических фенотипов болезни.

Научно-обоснованная концепция патогенеза РА позволила разработать и ввести в клиническую медицину препараты на основе специфических антител. Но, несмотря на установление множества существенных патогенетических деталей, удовлетворительной общей концепции патогенеза РА пока не выработано. В изучении патогенеза острого и хронического воспалительного процесса научный интерес представляет никотинамид фосфорибозилтрансфераза (Nampt). Экспериментально было установлено, что ингибирование Nampt эффективно снижает активность коллаген-индуцированного артрита (КИА) у мышей, что сопоставимо с эффектом этанерцепта [5]. В эксперименте Nampt проявляет провоспалительные и иммуномодулирующие свойства, стимулирует процесс ангиогенеза при гипоксических состояниях в синовии [6]. В ряде работ было показано, что уровень сывороточного Nampt изменяется на фоне лечения биологическими препаратами за несколько недель до изменения клинико-лабораторных показателей (С-реактивный белок (СРБ), индекс DAS28) и может прогнозировать по-

следующее обострение болезни у пациентов с РА [7]. Nampt регулирует скорость синтеза никотинамид-β-аденин динуклеотида (NAD) в клетках млекопитающих на стадии образования никотинамид мононуклеотида. Опыт показывает, что фактор некроза опухоли-α (TNF-α) и другие провоспалительные молекулы так же влияют на обмен NAD. Позже было показано, что существует внеклеточная форма Nampt, которая участвует в процессе дифференцировки иммунных клеток. Выделяется Nampt при активации моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, Т-клеток и В-клеток [8]. Активация и выделение Nampt происходит в воспаленной синовиальной ткани мышей с антиген-индуцированным артритом, а так же в плазме крови и синовиальной жидкости больных РА. Последние исследования связывают повышенные уровни Nampt с активностью РА и степенью тяжести остеоартроза [9]. Nampt может регулировать активацию лейкоцитов и синовиоцитов человека как за счет увеличения количества костимуляторных молекул, стимуляции синтеза интерлейкина-1β (IL), IL-6 и TNF-α, так и воздействуя на предполагаемые рецепторы мембран клеток. В хондроцитах, обработанных Nampt, отмечается повышенное содержание металлопротеиназ и металлопептидаз, в то время как синтез агрекана снижен [2], что может свидетельствовать о деструктивной и катаболической роли Nampt в суставном хряще. Положительная корреляция между Nampt и СРБ подтверждает его роль, как медиатора воспаления [10]. Считается, что повышенные концентрации Nampt могут стимулировать системное воспаление.

Учитывая активное участие Nampt в метаболических процессах, регуляции синтеза и активации провоспалительных агентов, в настоящее время проводятся работы по исследованию механизмов ингибирования Nampt. Первые работы были основаны на предположении, что инактивация Nampt приведет к торможению биосинтеза NAD<sup>+</sup> из ниацинамида, что в конечном итоге может привести к истощению запасов энергии в метаболически активных клетках опухолей и вызвать апоптоз опухолевых клеток. Одновременно предполагалась возможная ингибция продукции опухолевыми клетками сосудистого эндотелиального фактора роста - VEGF, с последующим прекращением ангиогенеза [5].

Данные большого количества исследований подтверждают, что Nampt играет важную роль в патологии воспалительных и онкологических заболеваний [7, 10, 13]. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов активации адипокинов может привести к разработке новых терапевтических средств для лечения

различных заболеваний. Блокаторы Nampt в эксперименте приводят к быстрому торможению воспалительных процессов, давая надежду на разработку новых эффективных методов лечения ревматических заболеваний [5]. **Цель исследования** — изучение концентрации Nampt в сыворотке крови у больных ревматоидным артритом и подтверждение взаимосвязи концентрации Nampt в сыворотке крови пациентов с клиническими проявлениями и лабораторными маркерами активности РА.

### Методика

Под нашим наблюдением находилось 140 пациентов с верифицированным диагнозом РА (96 женщин и 44 мужчины). На этапе скрининга пациенты должны были соответствовать критериям включения: возраст от 18 до 80 лет, подтверждение диагноза РА в соответствии с критериями ACR/EULAR 2010, наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании. Критерии исключения — любая крупная хирургическая операция или инфекция в течение последних 8 нед, тяжелая сопутствующая патология (почечная, печеночная, сердечная недостаточность, неконтролируемая артериальная гипертония, сахарный диабет, нарушения мозгового кровообращения), злокачественные и доброкачественные новообразования, злоупотребление алкоголем, психические заболевания, беременность и кормление грудью, лихорадочные состояния неясной этиологии и иные заболевания, препятствующие исследованию.

Статистическая обработка данных клинического обследования проводилась с использованием программных пакетов «STATISTICA 6.0 для Windows», STATGRAPHICS Centurion XVI.I. Количественные данные обрабатывали статистически с использованием параметрического критерия Стьюдента, качественные данные с использованием непараметрического критерия «хи-квадрат». Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью дисперсионного анализа. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Всем пациентам проводилось полное клинико-лабораторное обследование. Уровень Nampt в сыворотке крови определялся непрямым твердофазным иммуноферментным методом с использованием коммерческих тест систем (RaiBiotech, cat№ EIA-VIS-1). При постановке диагноза РА мы руководствовались клинической классификацией, принятой на заседании EULAR/ACR 2010 г. (European League Against Rheumatism / American College of Rheumatology). Пациенты с РА были сопоставимы по среднему возрасту

с группой здоровых лиц (женщины –  $p > 0,1$ , мужчины  $p > 0,1$ ). Контрольная группа состояла из 20 женщин и 10 мужчин в возрасте от 22 до 55 лет без жалоб в течение жизни на боли в суставах.

### Результаты

Возрастной состав и клиническая характеристика больных РА представлены в **таблице 1**.

Средний уровень Nampt в сыворотке крови у здоровых лиц составил  $2,43 \pm 0,17$  нг/мл ( $M \pm m$ ). Уровень нормальных значений Nampt у здоровых лиц, определяемый как  $M \pm 2\sigma$ , составил от 0 до 5,07 нг/мл.

Статистически значимой разницы в уровне Nampt у здоровых мужчин и женщин выявлено не было ( $p > 0,1$ ), что подтверждено и в других исследованиях [11]. Также, учитывая данные литературы о наличии корреляции уровня Nampt с массой тела [12] была проанализирована зависимость уровня Nampt от величины индекса массы тела (ИМТ) и возраста. Подтверждена значимая разница уровней циркулирующего Nampt в зависимости от ИМТ ( $p = 0,017$ ). Имелась некоторая тенденция к увеличению уровня Nampt с возрастом, но она не была статистически значимой ( $p > 0,05$ ).

Учитывая статистически значимую разницу уровня Nampt в зависимости от ИМТ мы рассчитали нормальные значения Nampt для групп с ИМТ от 18,5 до 24,9 кг/м<sup>2</sup> и от 25 до 29,9 кг/м<sup>2</sup>. Уровень нормальных значений Nampt у здоровых лиц с ИМТ от 18,5 до 24,9 кг/м<sup>2</sup> составил 0,14 – 3,9 нг/мл, с ИМТ от 25 до 29,9 кг/м<sup>2</sup> – 0 – 5,9 нг/мл. Лица с ИМТ более 29,9 кг/м<sup>2</sup> в исследование не включались.

Средний уровень Nampt у больных с РА составил  $6,27 \pm 0,18$  нг/мл, что существенно выше показателей здоровых лиц ( $p < 0,001$ ), независимо от ИМТ. Повышенный уровень Nampt в сыворотке крови был обнаружен у 118 пациентов из 140, что составило 84,29% случаев. Средний уровень Nampt у женщин с РА составил  $6,45 \pm 0,22$  нг/мл, что значимо выше показателей здоровых лиц женского пола. Повышенный уровень Nampt в сыворотке крови был обнаружен у 82 женщин с РА из 96, что составило 85,42% случаев. Средний уровень Nampt у мужчин с РА составил  $5,82 \pm 0,29$  нг/мл, что также значимо выше показателей здоровых лиц мужского пола. Повышенный уровень Nampt в сыворотке крови был выявлен у 36 мужчин с РА из 44, что составило 81,19% случаев. Статистиче-

Таблица 1

Возрастной состав и клиническая характеристика больных РА

Возраст	20-29 лет (n=11)	30-39 лет (n=17)	40-49 лет (n=37)	50-59 лет (n=52)	60 и старше (n=23)	Статистическая значимость различий
Наличие РФ						
РФ (+)	8 (72,7%)	10 (58,8%)	23 (62,2%)	28 (53,9%)	14 (60,9%)	$p=0,8064$
РФ (-)	3 (27,3%)	7 (41,2%)	14 (37,8%)	24 (46,1%)	9 (39,1%)	
Наличие антител к цитруллинированому пептиду						
АЦЦП(+)	7 (63,6%)	11 (64,7%)	24 (4,9%)	31 (59,6%)	15 (65,2%)	$p=0,9840$
АЦЦП(-)	4 (36,7%)	6 (35,3%)	13 (35,1%)	21 (40,4%)	8 (34,8%)	
Активность по DAS28						
I	1 (9,09%)	2 (11,76%)	6 (16,2%)	1 (1,92%)	1 (4,35%)	$p=0,0330$
II	2 (18,19%)	2 (11,76%)	6 (16,2%)	22 (42,3%)	10 (43,5%)	
III	8 (72,73%)	13 (76,5%)	25 (67,6%)	29 (55,8%)	12 (52,2%)	
Рентгенологическая стадия по Штейнброчеру						
I	2 (18,19%)	3 (17,65%)	7 (18,9%)	1 (1,92%)	1 (4,4%)	$p=0,0060$
II	5 (45,46%)	9 (52,94%)	21 (56,8%)	22 (42,3%)	4 (17,4%)	
III	4 (36,36%)	4 (23,53%)	8 (21,6%)	27 (51,9%)	15 (65,2%)	
IV	0	1 (5,88%)	1 (2,7%)	2 (3,9%)	3 (13,0%)	
Функциональный класс						
I	1 (9,0%)	4 (23,5%)	8 (21,6%)	7 (13,46%)	1 (4,4%)	$p=0,0288$
II	9 (81,8%)	10 (58,8%)	14 (37,8%)	26 (50%)	15 (65,2%)	
III	1 (9,0%)	3 (17,7%)	14 (37,8%)	17 (32,7%)	3 (13,0%)	
IV	0	0	1 (2,7%)	2 (3,9%)	4 (17,4%)	

**Примечание.** Статистическая значимость различий среднего возраста.

ски значимых различий по уровню Nampt в зависимости от пола у больных с РА не обнаружено ( $p=0,056$ ).

Был изучен исходный уровень Nampt в сыворотке крови у больных РА в зависимости от возраста. Значимых различий выявлено не было. Мы так же изучили уровень Nampt в сыворотке крови больных РА в зависимости от клинической картины заболевания. Высокий уровень Nampt у больных с РА был характерен для пациентов с более высокой степенью активности, АЦЦП-позитивных, с наличием внесуставных проявлений.

Для выяснения клинико-патогенетического значения определения уровня Nampt все пациенты с РА были разделены нами на 2 группы – 1-я группа (118 пациентов) с повышенным уровнем Nampt в сыворотке крови (более 3,9 нг/мл), и 2-я группа (22 пациента) – с нормальными показателями. В обеих группах нами

были изучены клинические проявления РА. Результаты представлены в **таблицах 2 и 3**.

Таким образом, повышенный уровень Nampt в сыворотке крови был обнаружен у 118 пациентов с РА (84,29%) из 140. Для пациентов с повышенным уровнем Nampt в сыворотке крови была характерна более высокая активность заболевания по индексу DAS28, серопозитивность по АЦЦП, РФ, более высокий уровень СРБ и СОЭ, быстро прогрессирующее течение, внесуставные проявления заболевания.

Вероятнее всего, повышение уровня Nampt у больных РА связано с активностью заболевания. Предполагается, что ингибирование ферментативной активности Nampt может использоваться при разработке препаратов для лечения аутоиммунных воспалительных заболеваний по аналогии с онкологическими заболеваниями [13]. Это представляется особенно важным, так

Таблица 2

**Взаимосвязь между лабораторными показателями, отражающими активность РА и уровнем Nampt в сыворотке крови**

Лабораторные показатели, ( $M \pm m$ )	1-я группа с повышенным уровнем Nampt ( $n=118$ )	2-я группа с нормальным уровнем Nampt ( $n=22$ )	Статистическая значимость различий
СОЭ, мм час	37,83±1,57	22,46±0,56	$p<0,001$
СРБ (норма – менее 5,0 мг/л)	56,09±3,73	21,65±1,38	$p<0,001$

Таблица 3

**Клинические проявления РА в зависимости от уровня Nampt в сыворотке крови.**

Клинические проявления	С повышенным уровнем Nampt N(118) 1-я группа	С нормальным уровнем Nampt N(22) 2-я группа	Статистическая значимость различий ( $\chi^2$ , $p$ )
Серопозитивный по РФ	76 (64,41%)	7 (31,82%)	$\chi^2=8,159$ $p=0,0043$
Серонегативный по РФ	42 (35,59%)	15 (68,18%)	
АЦЦП позитивный	79 (66,95%)	9 (40,91%)	$\chi^2=5,386$ $p=0,0203$
АЦЦП негативный	39 (33,05%)	13 (59,09%)	
Активность I	3 (2,54%)	8 (36,36%)	$\chi^2=48,293$ $p<0,001$
Активность II	29 (24,58%)	13 (59,09%)	
Активность III	86 (72,88%)	1 (4,55%)	
Ренген. ст. I	8 (6,78%)	6 (27,27%)	$\chi^2=20,043$ $p<0,001$
Ренген. ст. II	56 (47,46%)	5 (22,73%)	
Ренген. ст. III	51 (43,22%)	7 (31,82%)	
Ренген. ст. IV	3 (2,54%)	4 (18,18%)	
ФК I	13 (11,02%)	8 (36,36%)	$\chi^2=16,319$ $p=0,001$
ФК II	69 (58,47%)	5 (22,73%)	
ФК III	32 (27,12%)	6 (27,27%)	
ФК IV	4 (3,39%)	3 (13,64%)	
Неэрозивный артрит	1 (0,85%)	13 (59,09%)	$\chi^2=69,892$ $p<0,001$
Эрозивный артрит	117 (99,15%)	9 (40,91%)	
Суставная форма	72 (61,02%)	20 (90,91%)	$\chi^2=7,354$ $p=0,0067$
С внесуставными проявлениями	46 (38,98%)	2 (9,09%)	

как наиболее эффективные в лечении РА препараты, блокирующие цитокины: этанерцепт, инфликсимаб (At к TNF- $\alpha$ ), анакинра (антагонист-IL-1R) и др., не всегда дают выраженный и продолжительный эффект, соответствующий ожиданиям врача и пациента. В связи с этим необходимо создание новых эффективных и безопасных лекарственных средств, влияющих на ранее мало изученные звенья патогенеза иммунновоспалительных заболеваний, например на обмен Nampt.

### Обсуждение

В последние годы в ревматологии для различных целей все чаще применяется мультиплексный анализ биомаркеров. Накопленная на сегодняшний день информация об особенностях белкового профиля при РА позволила разработать мультибиомаркерный индекс активности (multi-biomarker disease activity score – MBDA; Vectra DA, Crescendo Bioscience, США) [14], который в определенной мере отражает активность заболевания и позволяет прогнозировать течение артрита, являясь все же, далеко не совершенным и требующим дальнейшего изучения. Продолжается изучение выраженности ответа на генноинженерные биологические препараты в зависимости от иммунного профиля пациентов с ревматическими заболеваниями.

В недавно проведенных исследованиях была продемонстрирована патогенетическая связь между уровнем Nampt и суставными заболеваниями. Имеющиеся в литературе данные, наши исследования позволяют связать повышенный уровень Nampt с активностью течения РА [15]. Физиологическая и патофизиологическая роль и значимость Nampt может заключаться в изменении генетически обусловленного воспалительного или иммунного ответа при определенном фенотипе, так как Nampt вызывает хемотаксис и увеличивает синтез IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 и костимуляторных молекул CD14 моноцитов. Это повышает их способность вызывать аутопролиферацию. Существует мнение, что концентрация Nampt может повышаться при воспалении в ответ на выброс провоспалительных цитокинов [8]. Таким образом, исследования показали, что Nampt активизирует лейкоциты человека и стимулирует выработку провоспалительных цитокинов. В ряде исследований положительная корреляция между Nampt и СРБ подтверждает роль Nampt, как медиатора воспаления. Повышенные концентрации уровня Nampt могут характеризовать системное воспаление при различных заболеваниях [7, 13].

Развитие биологии и медицины на современном этапе позволили значительно увеличить возможности терапии РА и других воспалительных ревматических за-

болеваний. Созданы новые препараты на основе генно-инженерных методик. Особое внимание уделяется антицитокиновой терапии [16]. Околосуставная жировая ткань богата биологически активными клетками и выделяет значительное количество адипокинов, роль которых полностью не ясна. Известно, что интерлейкины, TNF- $\alpha$  и адипоцитокينات способствуют дифференцировке клеток синовиальной оболочки, дендритных клеток, макрофагов, остеокластов, стимулируя процессы неоангиогенеза, активируя металлопротеиназы, способствуя развитию эрозий. Учитывая успехи экспериментального использования блокаторов Nampt при КИА, значимо высокие уровни сывороточного Nampt при эрозивных формах РА необходимо дальнейшее изучение патогенетических механизмов влияния блокаторов Nampt на хрящевую ткань человека.

Таким образом, в ходе проведенного исследования была выявлена взаимосвязь между концентрацией Nampt в сыворотке крови и тяжестью течения РА. Определение концентрации Nampt в сыворотке крови больных РА может повысить качество диагностики этого заболевания, определить прогноз течения болезни. Повышение уровня Nampt в сыворотке крови может выступать как маркер тяжести и прогрессирования РА.

### Литература

(п.п. 1; 5-8; 10-13; 15; 16 см. References)

2. Насонова В.А., Насонов Е.Л., ред. *Рациональная фармакотерапия ревматических заболеваний: Сопрецидент*. М.: Литтерра; 2010.
3. Казачкина Н.И., Жердева В.В., Меерович И.Г., Савицкий А.П. Характеристика модели опухолевого роста, предназначенной для оценки апоптоза in vivo. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; 4: 355.
4. Повешенко А.И., Казаков О.В., Орлов Н.Б. и др. Цитокины лимфы как маркеры онкогенеза и эффективности терапии при экспериментальной опухоли молочной железы крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 60(3): 68-5.
9. Полякова Ю.В., Симакова Е.С., Заводовский Б.В., Сивордова Л.Е., Зборовская И.А. Клинико-патогенетическая роль висфатина в развитии воспалительных процессов при остеоартрозе. *Врач-аспирант*. 2012; 6(55): 14-20.
14. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Роль лабораторных биомаркеров в мониторинге и прогнозировании эффективности терапии ревматических заболеваний генно-инженерными биологическими препаратами. *Современная ревматология*. 2014; 1: 5–13.

### References

1. Gosset M., Berenbaum F., Salvat C. et al. Crucial role of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: possible influence on osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2008; 58(5): 1399–09.

2. Nasonova V.A., Nasonov E. L., red. *Rational pharmacotherapy of rheumatic diseases: Compendium. [Ratsional'naya farmakoterapiya revmaticheskikh zabolevaniy: Compendium]*. Moscow: Litterra; 2010. (in Russian)
3. Kazachkina N.I., Zherdeva V.V., Meerovich I.G., Savitskiy A.P. Characteristics of tumor growth model for in vivo estimating of apoptosis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; 4: 355. (in Russian)
4. Poveshchenko A.F., Kazakov O.V., Orlov N.B. et al. Lymph cytokines as markers oncogenesis and effective treatment of experimental breast cancer Wistar rat. *Patologicheskaya fiziologiya I eksperimental'naya terapiya*. 2015; 60(3): 68-5. (in Russian)
5. Buch M. H., Emery P. New therapies in the management of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23: 245-51.
6. Fontova M. Determination of Adipocytokine in Synovial Fluid of Osteoarthritis Patients. *Hospital Parc Taulí, Sabadell*. Available at: URL: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01993342>.
7. Šenolt L., Hulejová M., Kryštufková M. Change of serum visfatin levels after Rituximab treatment in patients with active Rheumatoid Arthritis may predict exacerbation of the disease. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69(3): 501.
8. Heruth D.P., Zhang L.Q., Ye S.Q. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Rheumatoid Arthritis. *J Bioanal Biomed*. 2011; 3: 76-80.
9. Polyakova J., Simakova E., Zavodovsky B., Sewordova L., Zborovskay I. Clinical and pathogenetic value of visfatin determination in inflammatory processes development of osteoarthritis. *Vrach-aspirant*. 2012; 6(55): 14-20. (in Russian)
10. Polyakova J.V., Simakova E.S., Zavodovsky B.V. et al. Serum visfatin determination in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(2): 886.
11. Berndt J., Klötting N., Kralisch S. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes*. 2005; 54(10): 2911-16.
12. Samara A., Pfister M., Marie B. et al. Visfatin, low-grade inflammation and body mass index (BMI). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008; 69(4): 568-74.
13. Song J., Ke S.-F., Zhou C.-C. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Is Required for the Calorie Restriction-Mediated Improvements in Oxidative Stress, Mitochondrial Biogenesis, and Metabolic Adaptation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013; 10: 1093.
14. Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Nasonov E.L. Role of laboratory biomarkers in monitoring and prediction of the effectiveness of treatment of rheumatic diseases using genetically engineered drugs. *Sovremennaya revmatologiya*. 2014; 1: 5-13. (in Russian)
15. Fox E.J., Leeder J.S., Ye S.Q., Becker M.L. Decreased Expression of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis Receiving Methotrexate. *J Rheumatol*. 2013; 40: 741-42.
16. Hueber A.J., Asquith D.L., McInnes I.B., Miller A.M. Embracing novel cytokines in RA – complexity grows as does opportunity. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2010; 24: 479-87.

#### Сведения об авторах:

**Полякова Юлия Васильевна**, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. методов лечения и профилактики заболеваний суставов ФГБНУ «НИИ КиЭР», зав. КДО ФГБНУ «НИИ КиЭР», e-mail: [jpolyakova@yandex.ru](mailto:jpolyakova@yandex.ru);

**Сивордова Лариса Евгеньевна**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. методов лечения и профилактики заболеваний суставов ФГБНУ «НИИ КиЭР», e-mail: [seeword@mail.ru](mailto:seeword@mail.ru);

**Ахвердян Юрий Рубенович**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. методов лечения и профилактики заболеваний суставов ФГБНУ «НИИ КиЭР», e-mail: [doctor\\_2001@mail.ru](mailto:doctor_2001@mail.ru);

**Шилова Людмила Николаевна**, доктор мед. наук, зав. каф. госпитальной терапии, ВПТ с курсом клинической ревматологии ФУВ, e-mail: [ludshilova@mail.ru](mailto:ludshilova@mail.ru);

**Заводовский Борис Валерьевич**, доктор мед. наук, зав. лаб. методов лечения и профилактики заболеваний суставов ФГБНУ «НИИ КиЭР», e-mail: [pebma@mail.ru](mailto:pebma@mail.ru)

© Коллектив авторов, 2020

УДК 591.182:615.356/357:57.084

Труш В.В.<sup>1</sup>, Соболев В.И.<sup>2</sup>

## Эффективность а-липоевой кислоты в компенсации расстройств сократительной функции скелетной мышцы вызванных длительным введением дексаметазона (экспериментальное исследование)

<sup>1</sup> ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»,  
283050, Донецк, Украина, ул. Щорса, д. 46;

<sup>2</sup> Институт педагогики, психологии и инклюзивного образования Гуманитарно-педагогической академии (филиал)  
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»,  
298650, Ялта, Россия, ул. Стахановская, д. 11

**Цель исследования** -- изучение в модельных экспериментах на животных эффективности а-липоевой кислоты (а-ЛК) в компенсации нарушений сократительной функции скелетной мышцы смешанного типа (*m. tibialis anterior*) при длительном введении дексаметазона (ДМ).

**Методика.** Эксперименты проводили на половозрелых крысах-самках (190-200 г), разделенных на 4 группы по 10 особей в каждой: контрольная группа (К-группа), 1-я опытная (дексаметазон 30 сут, ДМ-группа), 2-я опытная (дексаметазон в комплексе с а-липоевой кислотой 30 сут, ДМ+а-ЛК-группа) и 3-я опытная (а-липоевая кислота 30 сут, а-ЛК-группа). Дексаметазон («KRKA», Словения) вводили через день, внутривенно, в дозе, адекватной терапевтической для человека (0,25 мг/кг), а-Липоевую кислоту (торговая марка «Берлитион-600», BERLIN-CHEMIE, Германия) вводили ежедневно дозе (35 мг/кг) подкожно. Под наркозом (тиопентал натрия, 100 мг/кг) методом стимуляционной электромиографии и миографии изучали электрофизиологические и сократительные параметры передней большеберцовой мышцы в условиях возбуждения и сокращения, которые индуцировали раздражением малоберцового нерва сверхпороговым электрическим током.

**Результаты.** Вводимая в комплексе с ДМ а-ЛК нивелировала уменьшение количества активируемых двигательных единиц (ДЕ) и массы мышцы, степени посттетанической ее потенциации, ухудшение сократительных и временных параметров одиночного и тетанического сокращения, типичное для животных ДМ-группы. Сочетание ДМ с а-ЛК даже обусловило статистически значимое увеличение (на 34%) в сравнении с контролем скорости расслабления при одиночном сокращении и скорости развития тетанического сокращения (на 80%), что было характерно и для а-ЛК-группы. Данные факты косвенно указывают в пользу отсутствия выраженных дистрофических изменений мышечных волокон у животных ДМ+а-ЛК-группы. Вместе с тем, хотя для животных ДМ+а-ЛК-группы не было характерно укорочение периода максимальной работоспособности мышцы, типичное для ДМ-группы, но у них и не наблюдалось удлинения этого периода в сравнении с контролем, типичное для а-ЛК-группы. Это свидетельствует в пользу отсутствия позитивных эффектов а-ЛК на работоспособность мышцы в случае комплексного ее применения с ДМ. Вводимая в комплексе с ДМ а-ЛК компенсировала типичную для ДМ-группы повышенную утомляемость и пониженную способность мышцы к восстановлению после выполнения утомляющей работы (УР). Отмечалось даже увеличение скорости восстановления мышцы после УР, что было характерно и для а-ЛК-группы. В пользу этого свидетельствует отсутствие у крыс ДМ+а-ЛК-группы уменьшения скорости укорочения и расслабления мышцы после выполнения УР, типичного для ДМ-группы, и значимого снижения амплитуды одиночных сокращений и количества активируемых ДЕ мышцы после выполнения УР, типичных не только для животных ДМ-группы, но и контрольных особей.

**Заключение.** Изменения функциональных параметров мышцы животных группы ДМ- указывают на выраженные сократительные нарушения у особей ДМ-группы, а также на сниженную способность их мышцы к восстановлению после УР. У крыс ДМ+а-ЛК-группы не наблюдалось существенного ухудшения сократительной функции мышцы, а ее способность к восстановлению после УР была даже повышена в сравнении с контролем, что было характерно и для а-ЛК-группы. Данные факты позволяют рассматривать а-ЛК в качестве возможного средства для компенсации стероидной миопатии.

**Ключевые слова:** скелетная мышца; дексаметазон; ятрогенный гиперкортицизм; стероидная миопатия; а-липоевая кислота

**Для цитирования:** Труш В.В., Соболев В.И. Эффективность а-липоевой кислоты в компенсации расстройств сократительной функции скелетной мышцы, вызванных длительным введением дексаметазона, в модельных экспериментах на животных. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 69-78 .

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.69-78

**Для корреспонденции:** Труш Вера Владимировна, e-mail: ver.trush@yandex.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Труш В.В., Соболев В.И.; сбор и обработка материала – Труш В.В.; статистическая обработка – Соболев В.И.; написание текста – Труш В.В.; редактирование – Соболев В.И. Утверждение окончательной версии статьи – все соавторы.

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

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

Поступила 11.09.2019

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Trush V.V.<sup>1</sup>, Sobolev V.I.<sup>2</sup>

## Efficacy of $\alpha$ -lipoic acid in correction of skeletal muscle contractile disorders caused by chronic dexamethasone treatment in animal model

<sup>1</sup>Donetsk National University,

Shchorsa Str. 46, Donetsk 283050, Ukraine

<sup>2</sup>V.I. Vernadsky Crimean Federal University,

Stakhanovskaya Str. 11, Yalta 298650, Republic of Crimea, Russia

The **aim** of the study was to evaluate the efficacy of  $\alpha$ -lipoic acid ( $\alpha$ -LA) in correcting disorders of the contractile function of a mixed type skeletal muscle (*m. tibial anterior*) induced by chronic dexamethasone (DM) treatment in an animal model.

**Methods.** Experiments were performed on sexually mature female rats (190-200 g) divided into four groups: control (intact rats, C group, n=10), experimental group 1 (30-day dexamethasone treatment, DM group, n=10), experimental group 2 (30-day dexamethasone plus  $\alpha$ -lipoic acid treatment, DM+ $\alpha$ -LA group, n=10), and experimental group 3 (30-day  $\alpha$ -lipoic acid treatment,  $\alpha$ -LA group, n=10). Dexamethasone (KRKA, Slovenia) was administered every two days, i.p., at a dose of 0.25 mg/kg, which was equivalent to the clinical therapeutic dose.  $\alpha$ -Lipoic acid (Berlition-600, BERLIN-CHEMIE, Germany) was administered daily at a dose of 35 mg/kg, s.c. Stimulation electromyography and myography were performed in an acute experiment, under sodium thiopental (100 mg/kg) anesthesia, on day 30. Electrophysiological and contractile parameters of the anterior tibial muscle were recorded during stimulation with suprathreshold electrical current via the fibular nerve.

**Results.**  $\alpha$ -LA in combination with DM prevented decreases in the number of activated muscular motor units (MMU) and muscle mass, the degree of the muscle post-tetanic potentiation, and disorders of contractile and temporal parameters of single and tetanic contractions, which were typical for animals of the DM group. The  $\alpha$ -LA plus DM treatment even significantly increased the relaxation rate of a single contraction (by 34%) and the rate of tetanic contraction development (by 80%) compared to the control group ( $p < 0.05$ ), which were also typical for the  $\alpha$ -LA group. These facts indirectly evidence the absence of pronounced dystrophic changes in muscle fibers in animals of the DM+ $\alpha$ -LA group. At the same time, although the shortened period of maximum muscle work capacity, which was typical for the DM group, was not observed in the DM+ $\alpha$ -LA group, this period was no longer than in the control either, as distinct from the  $\alpha$ -LA group. This fact suggests the absence of positive effects of  $\alpha$ -LA on the muscle work capacity when  $\alpha$ -LA is administered in combination with DM. The  $\alpha$ -LA+DM treatment reversed the increased fatigue and the reduced ability to recover of the muscle after fatigable work (FW) observed in the DM group. Moreover, the  $\alpha$ -LA+DM treatment even increased the rate of muscle recovery after FW, which was also characteristic for the  $\alpha$ -LA group. This was confirmed by the absence of decreased rates of muscle shortening after FW, which was typical for the DM group, and by the absence of significant decreases in the single contraction amplitude and the number of activated MMU after FW, which was typical not only for the DM group, but also for the control.

**Conclusion.** The changes in muscle functional parameters in the DM and DM+ $\alpha$ -LA groups evidence pronounced contractile disorders and impaired ability of the muscle to recover after FW in the DM group. In the DM+ $\alpha$ -LA group, the muscle contractile function was not significantly impaired. Moreover, the muscle ability to recover after FW was not reduced in the DM+ $\alpha$ -LA-group. In this group, the ability to recover was even increased compared to the control, which was also characteristic for the  $\alpha$ -LA-group. These facts allow considering  $\alpha$ -LA as a possible therapy for correction of steroid myopathy.

**Keywords:** skeletal muscle; dexamethasone; iatrogenic hypercorticism; steroid myopathy;  $\alpha$ -lipoic acid.

**For citation:** Trush V.V., Sobolev V.I. Efficacy of  $\alpha$ -lipoic acid in correction of skeletal muscle contractile disorders caused by chronic dexamethasone treatment in animal model. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64 (4): 69-78. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.69-78

**For correspondence:** Vera V. Trush, Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Physiology of Human and Animals of State Educational Institution of Higher Education «Donetsk national university», 46 Shchorsa St., Donetsk 83050, Ukraine, e-mail: ver.trush@yandex.ru

**Contribution:** research concept and design – Trush V.V., Sobolev V.I.; material collecting and processing – Trush V.V.; statistical processing – Sobolev V.I.; writing text – Trush V.V.; text editing – Sobolev V.I. Approval of the final version of the article – all co-authors.

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

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

**Information about authors:**

Trush V.V., [http:// orcid.org/0000-0001-8514-8431](http://orcid.org/0000-0001-8514-8431)

Sobolev V.I., [http:// orcid.org/0000-0001-9318-5224](http://orcid.org/0000-0001-9318-5224)

Received 11.09.2019

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

Глюкокортикоиды (ГК) и более активные их фтор-содержащие синтетические аналоги, несмотря на достижения современной фармакотерапии, по сей день остаются наиболее эффективными препаратами в лечении тяжёлых и зачастую инвалидизирующих или потенциально смертельных патологий [1]. Вместе с тем, несмотря на полезные терапевтические эффекты, ГК оказывают и негативное влияние на ткани и органы, усиливая катаболизм белков [2]. Изменения в опорно-двигательном аппарате при длительном ятрогенном гиперкортицизме проявляются в виде тяжелой мышечной слабости, повышенной утомляемости скелетных мышц (СМ), возможной их дистрофии, уменьшении плотности костной ткани, и, как следствие, увеличении вероятности патологических переломов костей [3].

Несмотря на то, что проявления стероидной миопатии, в том числе ятрогенного характера, хорошо известны, многие механизмы ее развития до конца неясны. Дискуссионным остается вопрос, касающийся способов компенсации негативного влияния ГК на нервно-мышечный аппарат (НМА). В литературе имеются сообщения относительно эффективности витамина D [3], бисфосфонатов [4] и  $\beta_2$ -адреноагониста кленбутерола [5] в компенсации катаболических эффектов ГК на СМ. В более ранних исследованиях, проведенных в нашей лаборатории [6–10], показана способность аминокислот таурина и аргинина, а также адреноагонистов в компенсации негативного действия на скелетную мускулатуру длительного применения ГК.

Эффективным средством для компенсации стероидной миопатии может оказаться относительно безвредная для организма а-липоевая кислота (а-ЛК) [11]. Экспериментально доказана способность а-ЛК повышать интенсивность окислительного фосфорилирования [12] и утилизацию углеводов периферическими тканями, в том числе скелетными мышцами [13], тем самым улучшая их энергообеспечение, а также ослаблять глюконео- и кетогенез [14]. а-ЛК способствует поддержанию нормального биоэнергетического статуса в митохондриях в условиях энергодифицита [13,14], стимулирует об-

разование новых митохондрий [15]. Некоторые авторы [16, 17] сообщают о способности а-ЛК усиливать синтез белков в МВ. Кроме того, а-ЛК обладает способностью усиливать эффекты инсулина на скелетные МВ, улучшая IRS-1-зависимую передачу сигналов инсулина [18], повышать чувствительность инсулиновых рецепторов к инсулину [19], что облегчает реализацию его анаболических эффектов в мышцах.

Показана эффективность  $\alpha$ -ЛК в компенсации ряда мышечных патологий различного генеза: митохондриальных и вызванного этой патологией синдрома повышенной утомляемости [20], мышечной атрофии и целого ряда других [21–23]. Сообщается об эффекте  $\alpha$ -ЛК в защите МВ от апоптоза и протеолиза миофибриллярных белков у крыс с модельной формой ревматоидного артрита [24–27].

Наконец, в ряде работ установлена способность  $\alpha$ -ЛК ослаблять некоторые негативные эффекты глюкокортикоидов на организм [28, 29].

Учитывая сложный характер патогенеза стероидной миопатии и возможную роль в ее генезе ослабления синтеза или усиления катаболизма миофибриллярных белков [30–36], представляется возможным хотя бы частичная компенсация этих изменений под действием а-ЛК, оказывающей антиоксидантное, антикатаболическое и энерготропное действие на МВ.

**Цель работы** – изучение эффективности а-ЛК в компенсации негативных эффектов длительно вводимого дексаметазона на сократительную функцию скелетной мышцы смешанного типа (переднюю большеберцовую, *m. tibial anterior*).

## Методика

Все эксперименты выполнены с соблюдением этических принципов работы с животными в соответствии с «Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (директива 86/609/ЕЕС) и «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [37]. Животные содержались в помещении при температуре 22 °С, с 12-часовым циклом свет/темнота и свободном доступе к

воде и пище. Протокол эксперимента, содержание животных и выведение их из опыта одобрены этической комиссией университета.

Исследования выполнены на 40 половозрелых крысах-самках (возраст 4–5 мес, исходная масса 190–200 г). Самки крыс более чувствительны к катаболическому действию ГК. Животные были случайным образом разделены на 4 группы (по 10 особей в каждой): контрольная (интактная, не подвергалась никаким воздействиям, К-группа), 1-я опытная – получала дексаметазон, ДМ-группа, 2-я опытная – дексаметазон в комплексе с а-липоевой кислотой, ДМ+а-ЛК-группа и 3-я опытная – а-липоевую кислоту, а-ЛК-группа. Препараты вводили на протяжении 30 сут: дексаметазон (KRKA, Словения, 0,25 мг/кг через день внутривнутрибрюшинно, а-липоевую кислоту (торговая марка «Берлитион 600», BERLIN-CHEMIE, Германия) – 35 мг/кг ежедневно, подкожно.

По окончании введения препаратов на наркотизированных животных (тиопентал натрия, 100 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) в остром опыте изучали ряд функциональных параметров передней большеберцовой мышцы (*m. tibialis anterior*). Выбор этой мышцы обусловлен тем, что она относится к смешанному типу с существенным преобладанием (более 90%) быстрых МВ [38], характеризующихся в сравнении с медленными более высокой чувствительностью к ГК [33].

У крыс препаровали в области бедра малоберцовый нерв и на расстоянии 1 см проксимальнее коленного сустава подводили под него раздражающие электроды, а в среднюю часть передней большеберцовой мышцы вводили отводящие биполярные игольчатые стальные электроды с межэлектродным расстоянием 1 мм. Стопу задней лапки животного крепили зажимом на уровне большого пальца и затягивали лигатуру, соединенную с потенциометрическим датчиком.

Для регистрации исследуемых показателей мышечного сокращения использовали экспериментальную установку, состоящую из 3 каналов: канала электростимулятора, электромиографического и эргометрического.

*Канал электростимулятора* представлен собственно электростимулятором, построенным на основе функционального генератора ICL8038CCDP, оптронной гальванической развязкой и биполярными игольчатыми стальными электродами с межэлектродным расстоянием 1 мм. *Электромиографический канал* представлен отводящими биполярными игольчатыми стальными электродами с межэлектродным расстоянием 1 мм и электромиографическим биоусилителем, построенным на основе измерительного усилителя INA118. *Эргометрический канал* включал датчик перемещения (потенциометрический датчик ПТП-1) и биоусилитель.

Все каналы были связаны с регистрирующим устройством – запоминающим цифровым осциллографом Tektronix (TDS2004C).

*Этапы опыта.* Вначале путем постепенного увеличения напряжения импульсов тока от 0,01 до 2 В с частотой 10 имп/с в течение 4 с записывали серию М-ответов мышцы возрастающей амплитуды. Для нанесения раздражения на малоберцовый нерв стимулами нарастающей интенсивности использовали специальную установку. Установка включала 6 блоков: 1) блок управления запуском, 2) блок генерации одиночного линейно-нарастающего импульса заданной длительности, 3) блок генерации импульсов стимулятора с заранее установленной частотой, 4) блок смесителя сигналов, 5) блок буферного усилителя тока и 6) цифровой запоминающий осциллограф. На основании процентного изменения амплитуды максимального М-ответа относительно амплитуды минимального определяли приблизительное количество активируемых двигательных единиц (ДЕ) мышцы (методика Galea V.) [39].

После этого, раздражая малоберцовый нерв с частотой 4 имп/с сверхпороговыми электрическими импульсами длительностью 150 мкс каждый и силой тока 500 мкА, регистрировали в течение 5 с серию одиночных сокращений мышцы с внешней нагрузкой 20 г. На основании полученных записей определяли ряд параметров одиночного сокращения мышцы: амплитуду, латентный период, скорость укорочения и расслабления.

На следующем этапе регистрировали одиночные сокращения мышцы до и после работы в режиме 6-секундного тетануса с внешней нагрузкой 20 г (длительность – 0,5 мс, сила тока – 500 мкА). На основании полученных записей определяли амплитуду одиночного сокращения до и после развития тетануса и по отношению этих амплитуд оценивали степень посттетанической потенциации.

Затем проводилась регистрация кривой 6-секундного тетануса, который индуцировали путем раздражения электрическим током малоберцового нерва с частотой 70 имп/с (длительность импульсов 0,5 мс, сила тока 1000 мкА). Сокращаясь, мышца поднимала груз массой 70 г. Электрическое раздражение малоберцового нерва и соответственно сокращение мышцы осуществлялось до тех пор, пока она почти полностью не расслаблялась вследствие утомления на фоне продолжающейся электрической стимуляции. Работа мышцы до полного утомления продолжалась на протяжении 50–80 с. На основании полученных записей определяли максимальную амплитуду сокращения мышцы в режиме тетануса, время ее достижения, скорость сокращения, продолжительность удержания амплитуды

сокращения на максимально возможном уровне и до момента полурасслабления.

После выполнения мышцей утомляющей работы (УР) вновь регистрировали серию одиночных сокращений мышцы при раздражении малоберцового нерва с частотой 4 имп/с и серию М-ответов при раздражении малоберцового нерва стимулами нарастающей амплитуды (от 0,01 до 2 В). На основании изменения количества активируемых ДЕ мышцы и параметров одиночных ее сокращений после выполнения УР относительно соответствующих исходных значений судили об утомляемости нервно-мышечного аппарата (НМА) и скорости его восстановления после утомления у животных разных групп.

По окончании острого опыта в условиях глубокого наркоза проводили эвтаназию животных путем введения летальной дозы (300 мг/кг) тиопентала натрия.

*Статистическая обработка экспериментальных данных.* Оценку статистической значимости различий между центральными тенденциями сравниваемых групп проводили с использованием t-критерия Стьюдента, предварительно убедившись, что распределение значений в исследуемых вариационных рядах близко к нормальному (W-тест Шапиро–Уилка, Statistica, 7.0), и F-статистики на основании проверки нулевой и альтернативной гипотез. Значения  $p < 0,05$  рассматривали как статистически значимые. Исследуемые параметры выражали в виде «среднее  $\pm$  стандартная ошибка».

### Результаты

Необходимо отметить, что мнения различных специалистов относительно нарушений сократительной функции СМ при глюкокортикоидной терапии неоднозначны. Так, ряд клиницистов [40, 41] при наблюдении больных с синдромом Кушинга отмечают, что снижение мышечной силы наблюдается не у всех пациентов, даже при наличии электрофизиологических нарушений, и далеко не для всех мышечных групп. Более того, в сравнительно недавних исследованиях зарегистрирован факт увеличения мышечной силы у здоровых молодых мужчин, получавших на протяжении 1 нед ДМ (8 мг/сут), несмотря на имевшее место снижение возбудимости МВ [42]. Вместе с тем, исследования ученых казанской научной школы [43] показали, что в основе снижения мышечной силы под влиянием ГК могут лежать не только длительно развивающиеся структурные и метаболические перестройки в НМА, но и быстро реализующиеся вследствие негеномных эффектов ГК изменения синаптической передачи.

Анализ амплитудных и временных параметров одиночного сокращения передней большеберцовой мыш-

цы крыс при длительном изолированном введении ДМ, показал, что синтетический ГК приводил к их ухудшению и более выраженным изменениям, в сравнении с контролем, после выполнения утомляющей работы (табл. 1). Применение а-ЛК в комплексе с ДМ предотвращало ухудшение амплитудных и временных параметров исходных одиночных сокращений мышцы, а также большую степень их изменения после УР, типичные для ДМ-группы.

У животных ДМ+а-ЛК-группы не наблюдалось типичных для ДМ-группы уменьшения амплитуды одиночного сокращения, скорости укорочения и расслабления, а также уменьшения степени посттетанической потенциации (табл. 1). Более того, скорость расслабления у животных ДМ+а-ЛК-группы даже превышала контрольное значение (на 25%,  $p < 0,05$ ), что было характерно и для а-ЛК-группы (табл. 1). Кроме того, для крыс ДМ+а-ЛК-группы не было характерно уменьшение массы мышцы и количества активируемых ДЕ, что типично для ДМ-группы (табл. 2). Все эти факты косвенно указывают на отсутствие выраженных дистрофических изменений в мышце животных ДМ+а-ЛК-группы. При дистрофии возможно выключение из сокращения части патологически измененных МВ, особенно МВ гликолитического типа. Следовательно, согласно результатам наших исследований, а-ЛК оказалась весьма эффективной для предотвращения развития дистрофических изменений и ухудшения сократительной функции мышцы, при длительном введении ДМ.

Способность а-ЛК предотвращать или ослаблять развитие дегенеративных процессов различного генеза в мышечной ткани отмечалась и другими авторами. В частности, показана эффективность а-ЛК в предотвращении развития мышечной атрофии [21], метаболической миопатии [45], дистрофии как быстрых, так и медленных мышц при СД II типа, мышечной слабости при патологии дыхательной цепи митохондрий и путей накопления гликогена [23,44]. Отмечена эффективность а-ЛК в защите МВ от апоптоза и протеолиза миофибрилярных белков путем снижения активности каспаз 3 и 8 [24].

Наряду с модуляцией нарушений параметров исходных одиночных сокращений мышцы а-ЛК оказалась также весьма эффективной и в плане предотвращения выраженного их изменения после УР, типичного для ДМ-группы. Так, для ДМ+а-ЛК-группы не было характерно типичного для ДМ-группы существенного снижения амплитуды одиночных сокращений после УР (табл. 1). Более того, амплитуда одиночных сокращений у животных ДМ+а-ЛК-группы после УР не только не уменьшалась, а даже увеличивалась в сравнении с ис-

ходной (на 32%,  $p < 0,05$ ), что было характерно для мышцы животных а-ЛК-группы (табл. 1) и свидетельствовало в пользу более высокой скорости восстановления мышцы после утомляющей работы. Аналогично амплитуде одиночных сокращений, количество активируемых ДЕ мышцы ДМ+а-ЛК-группы после УР значимо не изменялось относительно исходного уровня, тогда как у К-крыс и животных ДМ-группы оно снижалось; причем в ДМ-группе – в гораздо большей степени, чем у К-крыс (табл. 2). Кроме того, комплексное введение пары препаратов предотвращало типичное для ДМ-группы снижение скорости сокращения и расслабления после УР (табл. 1). Все эти факты свидетельствуют в пользу более высокой скорости восстановления МВ после УР у животных, получавших ДМ в комплексе с а-ЛК, в сравнении не только с ДМ-группой, у которой утомляемость мышцы была повышена, а ее способность

к восстановлению после утомления снижена, но даже в сравнении с контролем.

Таким образом, введение а-ЛК в комплексе с ДМ не только предотвращало снижение мышечной массы, количества активируемых ДЕ мышцы и ухудшение параметров одиночного сокращения, типичных для ДМ-группы, но даже обусловило некоторое увеличение скорости расслабления мышечных волокон. Кроме того, в случае как изолированного, так и комплексного с ДМ введения а-ЛК у животных наблюдалась большая в сравнении с контролем скорость восстановления мышечных волокон после УР.

В пользу позитивного влияния а-ЛК на устойчивость скелетной мышцы к утомлению указывают и другие авторы. Так, в исследованиях на людях и экспериментах на животных установлена способность а-ЛК предотвращать метаболический ацидоз, а, следовательно

Таблица 1

**Средние значения ( $\bar{X} \pm m$ ) параметров одиночного сокращения и посттетанической потенциации передней большеберцовой мышцы крыс контрольной группы и животных, получавших дексаметазон (ДМ) и а-липоевую кислоту (а-ЛК) изолированно и комплексно (ДМ+а-ЛК)**

Параметры	Группы животных			
	К	ДМ	а-ЛК	ДМ+а-ЛК
<i>Одиночное сокращение с внешней нагрузкой 20 г</i>				
Латентный период, мс				
исходный	11,2±0,57	16,5±0,50, [+48*]	10,9±0,69	12,6±0,57
после УР	16,0±0,83 (+43±7,5•)	24,5±1,15, [+53*] (+48±8,2•)	15,3±0,70 (+39±7,1•)	17,1±0,91 (+36±6,6•)
Амплитуда, мм				
исходная	3,0±0,22	1,4±0,32, [-54*]	3,7±0,23, [+24*]	3,1±0,14
после УР	2,3±0,21 (-24±2,2•)	0,6±0,11, [-74*] (-57±8,7•)	4,9±0,26, [+114*] (+32±5,4•)	4,1±0,21, [+79*] (+32±4,3•)
Скорость укорочения, мм/мс				
исходная	0,10±0,005	0,03±0,003, [-69*]	0,11±0,006	0,09±0,005
после УР	0,09±0,008	0,01±0,002, [-86*] (-60±7,9•)	0,12±0,007, [+33*]	0,09±0,005
Скорость расслабления, мм/мс				
исходная	0,05±0,004	0,02±0,003, [-56*]	0,07±0,003, [+25*]	0,07±0,004, [+34*]
после УР	0,04±0,004	0,01±0,002, [-83*] (-70±7,9•)	0,09±0,004, [+99*]	0,08±0,005, [+86*]
<i>Посттетаническая потенция (отношение амплитуды одиночного сокращения после тетануса к исходной, %)</i>				
Посттетаническая потенция	49,7±4,3	20,6±3,59°	39,8±3,89	41,9±4,76

**Примечание.** • – в круглых скобках указано статистически значимое отличие показателя от исходного значения соответствующей группы (в %,  $p < 0,05$ ); \* – в квадратных скобках – от соответствующего значения контрольной группы (в %,  $p < 0,05$ ); ° – различие в степени посттетанической потенциации мышцы статистически значимо в сравнении с контролем ( $p < 0,05$ ). УР – утомляющая работа.

но, развитие утомления [46], уменьшать окислительное повреждение митохондрий, вызванное физической нагрузкой, что обуславливает повышение физической работоспособности и ускорение восстановления после утомления [26]. Отмечается ослабление перекисного окисления липидов в скелетных мышцах [47], усиление антиоксидантной защиты и уменьшение экспрессии провоспалительных агентов, что способствует ослаблению вызванного физическими упражнениями окислительного стресса в мышцах [48, 49].

Таким образом, в наших исследованиях установлено, что а-ЛК, вводимая в комплекс с ДМ, не просто предотвращала повышенную утомляемость мышцы животных, получавших ДМ, но и обуславливала большую в сравнении с контролем скорость восстановления мышцы после утомления у животных ДМ+а-ЛК-группы.

Для более детальной оценки сократительной функции мышцы животных всех групп на заключительном этапе были оценены параметры тетанического сокращения мышцы, которое часто наблюдается в реальных условиях при необходимости развить достаточную для выполнения внешней работы мощность.

Анализ полученных данных показал, что введение а-ЛК в комплексе с ДМ частично нивелировало нарушение параметров тетанического сокращения мышцы, вызванное введением синтетического ГК, и даже обусловило улучшение относительно контроля некоторых из этих параметров, что было характерно для а-ЛК-группы. Так, после 30-суточного введения пары препаратов наблюдалось значимое относительно контроля снижение (на 24%,  $p < 0,05$ ) амплитуды тетануса (табл. 3), что было отмечено и для ДМ-группы. Вместе с тем, в отличие от ДМ-группы, у животных ДМ+а-ЛК-группы время достижения максимальной амплитуды тетануса не удлинялось относительно контроля, а, напротив, укорачивалось (на 58%,

$p < 0,05$ ), что было характерно и для а-ЛК-группы. Как следствие, скорость тетанического сокращения у крыс ДМ+а-ЛК-группы значимо превышала (на 80%,  $p < 0,05$ ) не только значения ДМ-группы, но и контроля (табл. 3), что было характерно и в наибольшей степени выражено в а-ЛК-группе.

Кроме того, у животных ДМ+а-ЛК-группы не наблюдалось типичного для ДМ-группы укорочения относительно контроля периода максимальной устойчивой работоспособности мышцы (табл. 3), но в то же время не отмечалось и удлинения этого периода, типичного для а-ЛК-группы.

Таким образом, комплексное с ДМ введение а-ЛК предотвращало ухудшение временных параметров тетанического сокращения мышцы и укорочение периода максимальной устойчивой ее работоспособности, типичных для изолированного применения ДМ, и даже обусловило увеличение в сравнении с контролем скорости тетанического сокращения, несмотря на некоторое снижение его амплитуды. Полученный факт служит еще одним косвенным доказательством эффективности а-ЛК в плане предотвращения развития дистрофических изменений и нарушений энергообмена в мышечных волокнах.

Подводя итог результатам исследований необходимо отметить следующее. Длительное изолированное введение ДМ в организм животного в дозе адекватной терапевтической для человека сопровождалось ухудшением сократительных параметров передней большеберцовой мышцы. Вводимая в комплексе с ДМ а-ЛК предотвращала уменьшение массы мышцы и количества ДЕ, невелировала ухудшение параметров одиночного и тетанического сокращения, укорочение периода максимальной устойчивой работоспособности мышцы и предопределяла увеличение не только в сравнении с ДМ-группой, но и контролем, скорости тета-

Таблица 2

Средние значения ( $\bar{X} \pm m$ ) количества активируемых двигательных единиц (ДЕ) и массы передней большеберцовой мышцы крыс контрольной группы и животных, получавших дексаметазон (ДМ) и а-липоевую кислоту (а-ЛК) изолированно и комплексно (ДМ+а-ЛК)

Параметры	Группы животных			
	К	ДМ	а-ЛК	ДМ+а-ЛК
<i>Количество активируемых ДЕ мышцы</i>				
Исходное количество ДЕ	14,1±1,21	8,1±0,95, [-43*]	25,1±2,93, [+78*]	15,6±1,27
после УР	10,4±0,91 (-26±2,0•)	5,3±0,61, [-49*] (-34±2,4•)	21,9±3,14, [+110*]	13,3±1,84
Масса мышцы, мг	399,8±6,81	363,9±8,50, [-9*]	440,5±14,17, [+10*]	374,5±14,24

**Примечание.** \* – в квадратных скобках указано статистически значимое различие с соответствующим контрольной группы (в %,  $p < 0,05$ ); • – в круглых скобках указано статистически значимое различие с исходным значением соответствующей группы (в %,  $p < 0,05$ ).

Средние значения ( $\bar{X} \pm m$ ) параметров тетанического сокращения передней большеберцовой мышцы крыс контрольной группы и животных, получавших дексаметазон (ДМ) и а-липоевую кислоту (а-ЛК) изолированно и комплексно (ДМ+а-ЛК)

Параметры	Группы животных			
	К	ДМ	а-ЛК	ДМ+а-ЛК
Амплитуда, мм	13,4±1,17	10,3±0,70 [-24*]	11,7±0,56	10,2±0,80 [-24*]
Время достижения максимальной амплитуды, с	0,8±0,13	1,5±0,09 [+81*]	0,24±0,08 [-71*]	0,35±0,03 [-58*]
Скорость развития, мм/с	16,1±1,18	6,9±0,79 [-57*]	49,1±2,92 [+204*]	29,0±3,07 [+80*]
Длительность удержания максимальной амплитуды, с	3,6±0,39	2,4±0,23 [-34*]	5,5±0,68 [+50*]	3,4±0,37
Длительность снижения амплитуды сокращения на 50% относительно максимальной, с	9,1±1,08	8,4±0,92	8,5±0,52	6,8±0,88

**Примечание.** \* – в квадратных скобках указаны статистически значимые различия с соответствующими показателями контрольной группы (в %,  $p < 0,05$ ).

нического сокращения, а также скорости восстановления мышцы после утомляющей работы, что было характерно для а-ЛК-группы.

Полученные в модельных экспериментах факты дают основания рассматривать а-ЛК как одно из эффективных средств для компенсации расстройств сократительной функции скелетных мышц, вызванных длительной ГК-терапией. Данные факты позволяют рассматривать а-ЛК в качестве возможного средства для компенсации стероидной миопатии.

### Выводы:

1. а-ЛК, вводимая в комплексе с ДМ, нивелировала снижение числа активируемых двигательных единиц (ДЕ) и уменьшение массы мышцы и степени ее посттетанической потенциации, повышала сократительные и временные параметры одиночного и тетанического сокращений, увеличивала период максимальной работоспособности мышцы, и даже обуславливала значимое увеличение в сравнении с контролем скорости расслабления мышцы при одиночном сокращении (на 34%) и скорости развития тетанического сокращения (на 80%), что было характерно для а-ЛК-группы. Данные факты косвенно указывают в пользу отсутствия выраженных дистрофических изменений мышечных волокон при использовании а-ЛК.

2. а-ЛК, вводимая в комплексе с ДМ, компенсировала типичную для ДМ-группы повышенную утомляемость и пониженную способность мышцы к восстановлению после выполнения утомляющей работы, препятствовала значимому снижению амплитуды одиночных сокращений и количества активируемых ДЕ мышцы после выполнения утомляющей работы, типичных не только для животных ДМ-группы, но и контрольных особей.

### Литература

(п.п. 2; 4; 5; 11; 15-23; 26-36; 38; 39; 42; 44; 45; 47-49 см. References)

1. Комердус И.В., Будул Н.А. Чеканова А.В. Системное действие глюкокортикоидных препаратов: в помощь врачу общей практики (обзор литературы). *Российский медицинский журнал*. 2017; 1: 45-8.
3. Полунина А.Г., Исаев Ф.В., Демьянова М.А. Стероидная миопатия. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2012; 112(10-2): 60-4.
6. Труш В.В., Соболев В.И. Модуляция  $\beta_2$ -адреноагонистом формотеролом нарушений сократительной функции скелетной мышцы белых крыс, вызванных длительным введением дексаметазона. *Ученые записки Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Биология. Химия*. 2018; 4(4): 219-36.
7. Труш В.В., Соболев В.И., Попов М.Н. Оценка эффективности аргинина в компенсации стероидной миопатии у белых крыс, индуцированной длительным введением дексаметазона. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 120-9. DOI: <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.04.120-129>
8. Труш В.В., Соболев В.И. Модулирующее влияние адреналина на развитие стероидной миопатии у белых крыс, индуцированной длительным введением гидрокортизона. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4): 104-11. DOI: 10.25557/1GPP.2017.4.8530
9. Труш В.В., Соболев В.И. Модуляция таурином стероидной миопатии у белых крыс, индуцированной длительным введением дексаметазона. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2017; 7 (2): 108-18.
10. Труш В.В., Соболев В.И. Оценка эффективности  $\beta_2$ -адреноагониста формотерола в компенсации электрофизиологических проявлений стероидной миопатии в модельных экспериментах на животных. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(2): 35-47. DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.35-47
12. Лукьянчук В.Д., Шпулина О.А. Фармакологическая коррекция нарушений энергетического обмена при воспалительно-дистрофическом процессе в парадонте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2006; 69(4): 51-6.
13. Романцова Т.И., Кузнецов И.С. Потенциальные возможности применения альфа-липоевой кислоты (Берлитион®300) в лечении метаболического синдрома. *Ожирение и метаболизм*. 2009; 3: 10-4. DOI: <https://doi.org/10.14341/2071-8713-5240>

14. Волчегорский И.А., Рассохина Л.М., Мирошниченко И.Ю. Инсулинпотенцирующее действие антиоксидантов при экспериментальном сахарном диабете. *Проблемы эндокринологии*. 2010; 56(2): 27-35. DOI: <https://doi.org/10.14341/probl201056227-35>
24. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М., Сафонова О.А. Воздействие липоевой кислоты на активность каспаз, показатели иммунного и антиоксидантного статуса при ревматоидном артрите у крыс. *Биоорганическая химия*. 2016; 42 (4): 431-9. DOI: <https://doi.org/10.1134/s1068162016040130>
25. Яценко А.Г., Лысенко Е.Н., Жовтяк В.Н., Майданюк Е.В., Кайс Найрат. Влияние альфа-липовой кислоты на функциональное состояние кардиореспираторной системы и уровень физической работоспособности спортсменов высокого класса. *Физическое воспитание студентов творческих специальностей*. 2003; 6: 95-104.
37. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунатян, ред. Москва: Минздрав РФ, ЗАО «Гриф и К»; 2012.
40. Агафонов Б.В., Калинин А.П., Можеренков В.П. Мышечные поражения при гиперкортицизме. *Казанский медицинский журнал*. 1984; 5: 377-9.
41. Неретин В.Я., Котов С.В., Сапфинова В.А. О генезе неврологических изменений при болезни Иценко-Кушинга и синдроме Кушинга. В кн. *Вопросы эндокринологии: Республиканский сборник научных работ*. М.; 1983: 35-9.
43. Камалиев Р.Р., Гришин С.Н., Фалу Ж.Ю., Зиганшин А.У. Воздействие гидрокортизона, АТФ и аденозина на скелетную мышцу крысы. *Казанский медицинский журнал*. 2009; 90(4): 556-9.
46. Трегубова И.А., Косолапов В.А., Спасов А.А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы. *Успехи физиологических наук*. 2012; 43(1): 75-94.
- References**
1. Komerdu I.V., Budul N.A., Chekanova A.V. Systemic effects of glucocorticoid drugs: a guide for the General practitioner (literature review). *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 1: 45-8. (In Russian)
2. Gardner D., Shoback D. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2011.
3. Polunina A.G., Isaev F.V., Dem'ianova M.A. Steroid myopathy. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2012; 112(10-2): 60-4. (In Russian)
4. Chiu H.C., Chiu C.Y., Yang R.S., Chan D.C., Liu S.H., Chiang C.K. Preventing muscle wasting by osteoporosis drug alendronate in vitro and in myopathy models via sirtuin-3 down-regulation. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2018; 9(3): 585-602. DOI: 10.1002/jcsm.12289.
5. Umeki D., Ohnuki Y., Mototani Y., Shiozawa K., Suita K., Fujita T., et al. Protective Effects of Clenbuterol against Dexamethasone-Induced Masseter Muscle Atrophy and Myosin Heavy Chain Transition. *PLoS One*. 2015; 10(6): e0128263. DOI: 10.1371/journal.pone.0128263.
6. Trush V.V., Sobolev V.I. Modulation by  $\beta_2$ -adrenergic agonist formoterol of contractile dysfunction of the skeletal muscle of white rats caused by the long dexamethasone administration. *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya. Khimiya*. 2018; 4(4): 219-36. (In Russian)
7. Trush V.V., Sobolev V.I., Popov M.N. Evaluation of arginine efficacy in control of steroid myopathy induced by long-term dexamethasone treatment in white rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(4): 120-9. DOI: <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.04.120-129>. (in Russian)
8. Trush V.V., Sobolev V.I. The modulatory effect of adrenaline on development of steroid myopathy induced by chronic administration of hydrocortisone in white rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(4): 104-11. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8530. (in Russian)
9. Trush V.V., Sobolev V.I. The modulation by taurine of the steroid myopathy at white rats induced by long application of dexamethasone. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny*. 2017; 7(2): 108-18. (in Russian)
10. Trush V.V., Sobolev V.I. Efficacy of the  $\beta_2$ -adrenergic agonist formoterol in compensation of electrophysiological manifestations of steroid myopathy in animal experiments. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(3): 35-47. DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.35-47 (in Russian)
11. Hermann R., Mungo J., Cnota P.J., Ziegler D. Enantiomerselective pharmacokinetics, oral bioavailability, and sex effects of various alpha-lipoic acid dosage forms. *Clin. Pharmacol.* 2014; 6: 195-204. DOI: <https://doi.org/10.2147/CPAA.S71574>.
12. Luk'yanchuk V.D., Shpulina O.A. Pharmacological correction of homeostatic energy exchange under conditions of inflammatory-dystrophic process in parodontium. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2006; 69(4): 51-6. (in Russian)
13. Romantsova T.I., Kuznetsov I.S. Potential opportunities for treatment of metabolic syndrome with alpha-lipoic acid (Berlithion®300). *Ozhirenie i metabolizm*. 2009; 3: 10-4. DOI: <https://doi.org/10.14341/2071-8713-5240>. (in Russian)
14. Volchegorskii I.A., Rassokhina L.M., Miroshnichenko I.I. Insulin-potentiating action of antioxidants in experimental diabetes mellitus. *Problemy endokrinologii*. 2010; 56(2): 27-35. DOI: <https://doi.org/10.14341/probl201056227-35>. (in Russian)
15. Kanabus M., Heales S.J., Rahman S. Development of pharmacological strategies for mitochondrial disorders. *British Journal of Pharmacology*. 2014; 171(8): 1798-817. DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.12456>
16. Jing Y., Cai X., Xu Y., Zhu C., Wang L., Wang S., Zhu X., Gao P., Zhang Y., Jiang Q., Shu G.  $\alpha$ -Lipoic Acids Promote the Protein Synthesis of C2C12 Myotubes by the TLR2/PI3K Signaling Pathway. *J. Agric. Food Chem.* 2016; 64(8): 1720-9. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05952
17. Rousseau A.S., Sibille B., Murdaca J., Mothe-Satney I., Grimaldi P.A., Neels J.G.  $\alpha$ -Lipoic acid up-regulates expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta$  in skeletal muscle: involvement of the JNK signaling pathway. *FASEB J.* 2016; 30(3): 1287-99. DOI: 10.1096/fj.15-280453
18. Henriksen E.J. Exercise training and the antioxidant alpha-lipoic acid in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40(1): 3-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.04.002>.
19. Bilska A., Wlodec L. Lipoic acid – the drug of the future? *Pharmacol. Rep.* 2005; 57: 570-7.
20. Nicolson G.L. Mitochondrial dysfunction and chronic disease: treatment with natural supplements. *Altern. Ther. Health Med.* 2014; 20 (Suppl 1): 18-25.
21. Liu J., Peng Y., Feng Z., Shi W., Qu L., et al. Reloading functionally ameliorates disuse-induced muscle atrophy by reversing mitochondrial dysfunction, and similar benefits are gained by administering a combination of mitochondrial nutrients. *Free Radic. Biol. Med.* 2014; 69(Apr.): 116-28. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.003
22. Aydin A., Yildirim A.M. Effects of alpha lipoic acid on ischemia-reperfusion injury in rat hindlimb ischemia model. *Ulus. Travma Acil. Cerrahi. Derg.* 2016; 22(6): 509-15. DOI: 10.5505/tjtes.2016.00258
23. Hong O.K., Son J.W., Kwon H.S., Lee S.S., Kim S.R., Yoo S.J. Alpha-lipoic acid preserves skeletal muscle mass in type 2 diabetic OLETF rats. *Nutr. Metab. (Lond)*. 2018; 15(29 Sep): 66-78. DOI: 10.1186/s12986-018-0302-y
24. Kryl'skiy E.D., Popova T.N., Safonova O.A., Kirilova E.M. Effect of lipoic acid on the activity of caspases and the characteristics of the immune and antioxidant statuses in rats with rheumatoid arthritis.

- Bioorganicheskaya khimiya*. 2016; 42(4): 389–96. DOI: <https://doi.org/10.1134/s1068162016040130>. (In Russian)
25. Yashchenko A.J., Lysenko O.N., Djowtyak B.N., Maydanyuk E.N., Kais Nairat. The influence of alpha-lipoic acid on functional state of cardiorespiratory system and physical workability in elite athletes. *Fizicheskoe vospitanie studentov tvorcheskikh spetsial'nostey*. 2003; 6: 95–104. (In Russian)
  26. Sun M., Qian F., Shen W., Tian C., Hao J., Sun L., Liu J. Mitochondrial nutrients stimulate performance and mitochondrial biogenesis in exhaustively exercised rats. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 2012; 22(6): 764–75. DOI: [10.1111/j.1600-0838.2011.01314.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2011.01314.x)
  27. Tamilselvan J., Jayaraman G., Sivarajan K., Panneerselvam C. Age-dependent upregulation of p53 and cytochrome c release and susceptibility to apoptosis in skeletal muscle fiber of aged rats: role of carnitine and lipoic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43(12): 1656–69. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.028>
  28. El-Senousey H.K., Chen B., Wang J.Y., Atta A.M., Mohamed F.R., Nie Q.H. Effects of dietary vitamin C, vitamin E, and alpha-lipoic acid supplementation on the antioxidant defense system and immune-related gene expression in broilers exposed to oxidative stress by dexamethasone. *Poult. Sci.* 2018; 97(1): 30–8. DOI: [10.3382/ps/pex298](https://doi.org/10.3382/ps/pex298)
  29. Mohammed M.A., Mahmoud M.O., Awaad A.S., Gamal G.M., Abdelfatah D. Alpha lipoic acid protects against dexamethasone-induced metabolic abnormalities via APPL1 and PGC-1 $\alpha$  up regulation. *Steroids*. 2019; 144(Jan 24): 1–7. DOI: [10.1016/j.steroids.2019.01.004](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.01.004)
  30. Caneparo M., Agoni V., Brocca L., Ghigo E., Gnesi M., Minetto M.A., et al. Structural and molecular adaptations to dexamethasone and unacetylated ghrelin administration in skeletal muscle of the mice. *J Physiol. Pharmacol.* 2018; 69(2). DOI: <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.2.14>
  31. Sakai H., Kimura M., Tsukimura Y., Yabe S., Isa Y., Kai Y., et al. Dexamethasone exacerbates cisplatin-induced muscle atrophy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2019; 46(1): 19–28. DOI: [http://dx.doi.org/10.1111/1440-1681.13024](https://doi.org/10.1111/1440-1681.13024)
  32. Shin K., Ko Y.G., Jeong J., Kwon H. Fbxw7 $\beta$  is an inducing mediator of dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy in vivo with the axis of Fbxw7 $\beta$ -myogenin-atrogenes. *Mol. Biol. Rep.* 2018; 45(4): 625–31. DOI: [10.1007/s11033-018-4185-9](https://doi.org/10.1007/s11033-018-4185-9)
  33. Schakman O., Gilson H., Thissen J.P. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol.* 2008; 197: 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1677/joe-07-0606>
  34. Parekh S., Anania F.A. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2007; 132(6): 2191–207. DOI: [http://dx.doi.org/10.1053%2Fj.gastro.2007.03.055](https://doi.org/10.1053%2Fj.gastro.2007.03.055)
  35. Jiao H., Zhou K., Zhao J., Wang X., Lin H. A high-caloric diet rich in soy oil alleviates oxidative damage of skeletal muscles induced by dexamethasone in chickens. *Redox Rep.* 2018; 23(1): 68–82. DOI: [10.1080/13510002.2017.1405494](https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1405494)
  36. Inder W.J., Jang Ch., Obeysekere V.R., Alford F.P. Dexamethasone administration inhibits skeletal muscle expression of the androgen receptor and IGF-1 – implications for steroid-induced myopathy. *Clin. Endocrinol.* 2010; 73(1): 126–32. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03683.x>
  37. *Guidelines for conducting preclinical studies of drugs [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. A.N. Mironova, N.D. Bunatyan, eds. Moscow: Minzdrav RF, ZAO «Grif i K»; 2012. (In Russian)
  38. Gauthier G.F. Skeletal muscle fiber types. In: Engel A.G., Banker B.Q., eds. *Myology. Basic and clinical*. New York, NY: McGraw-Hill; 1986: 255–83.
  39. Galea V., De Bruin H., Cavasin R., McComas A.J. The number and relative size of motor units estimated by computer. *Muscle and Nerve*. 1991; 14: 1123–30. DOI: <https://doi.org/10.1002/mus.880141114>
  40. Agafonov B.V., Kalinin A.P., Mozherenkov V.P. Muscle damage at hypercorticism. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 1984; 5: 377–9. (In Russian)
  41. Neretin V.Ya., Kotov S.V., Sapfirova V.A. *On the Genesis of Neurological Changes in Itsenko-Cushing's Disease and Cushing's Syndrome. In: [Voprosy endokrinologii: Respublikanskiy sbornik nauchnykh rabot]. (Endocrinology issues: Republican collection of scientific papers)*. Moscow; 1983: 35–9. (In Russian)
  42. Minetto M.A., Botter A., Lanfranco F., Baldi M., Ghigo E., Arvat E. Muscle fiber conduction slowing and decreased levels of circulating muscle proteins after short-term dexamethasone administration in healthy subjects. *J Clin Endocr and Metab*. 2010; 95: 1663–71. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2161>
  43. Kamaliev R.R., Grishin S.N., Falou Zh.Yu., Ziganshin A.U. The effect of hydrocortisone, ATP and adenosine on rat skeletal muscle contraction. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; 90(4): 556–9. (In Russian)
  44. Jurisic-Erzen D., Starcevic-Klasan G., Ivanac D., Peharec S., Giroto D., Jerkovic R. The effects of alpha-lipoic acid on diabetic myopathy. *J. Endocrinol. Invest.* 2018; 41(2): 203–9. DOI: [10.1007/s40618-017-0720-0](https://doi.org/10.1007/s40618-017-0720-0)
  45. Vishwanath S., Abdullah M., Elbalkhi A., Ambrus J.L.Jr. Metabolic myopathy presenting with polyarteritis nodosa: a case report. *J Med Case Rep.* 2011; 5(Jun 30): 262–4. DOI: [10.1186/1752-1947-5-262](https://doi.org/10.1186/1752-1947-5-262)
  46. Tregubova I.A., Kosolapova V.A., Spasov A.A. Antioxidants: Current Situation and Perspectives. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2012; 43(1): 75–94. (In Russian)
  47. Chae C.H., Shin C.H., Kim H.T. The combination of alpha-lipoic acid supplementation and aerobic exercise inhibits lipid peroxidation in rat skeletal muscles. *Nutr. Res.* 2008; 28(6): 399–405. DOI: [10.1016/j.nutres.2008.02.010](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.02.010)
  48. Kinnunen S., Oksala N., Hyypää S., Sen C.K., Radak Z., Laaksonen D.E., et al. alpha-Lipoic acid modulates thiol antioxidant defenses and attenuates exercise-induced oxidative stress in standardbred trotters. *Free Radic. Res.* 2009; 43(8): 697–705. DOI: [10.1080/1071576090303767](https://doi.org/10.1080/1071576090303767)
  49. Favero G., Rodella L.F., Nardo L., Giugno L., Cocchi M.A., Borsani E., et al. A comparison of melatonin and  $\alpha$ -lipoic acid in the induction of antioxidant defences in L6 rat skeletal muscle cells. *Age (Dordr)*. 2015; 37(4): 9824. DOI: [10.1007/s11357-015-9824-7](https://doi.org/10.1007/s11357-015-9824-7)
  50. Rossman M.J., Groot H.J., Reese V., Zhao J., Amann M., Richardson R.S. Oxidative stress and COPD: the effect of oral antioxidants on skeletal muscle fatigue. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2013; 45(7): 1235–43. DOI: [10.1249/MSS.0b013e3182846d7e](https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3182846d7e)
  51. Wray D.W., Nishiyama S.K., Monnet A., Wary C., Duteil S.S., Carlier P.G., et al. Antioxidants and aging: NMR-based evidence of improved skeletal muscle perfusion and energetics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 297(5): H1870–5. DOI: [10.1152/ajpheart.00709.2009](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00709.2009)

#### Сведения об авторах:

**Труш Вера Владимировна**, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. физиологии человека и животных ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», e-mail: [ver.trush@yandex.ru](mailto:ver.trush@yandex.ru);

**Соболев Валерий Иванович**, доктор биол. наук, проф., каф. здоровья и реабилитации Института педагогики, психологии и инклюзивного образования Гуманитарно-педагогической академии (филиал) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», e-mail: [v.sobolev@mail.ru](mailto:v.sobolev@mail.ru)

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.24-002.5-078.33:577.175.14:612.017.1:616.155.33-076.5:57.032

**Чурина Е.Г.<sup>1,2</sup>, Уразова О.И.<sup>1,3</sup>, Ситникова А.В.<sup>1</sup>, Новицкий В.В.<sup>1,3</sup>, Кононова Т.Е.<sup>1</sup>,  
Чумакова С.П.<sup>1</sup>, Патышева М.Р.<sup>2,4</sup>**

## Дифференцировка моноцитов крови и особенности цитокинового статуса у больных туберкулезом легких

<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Минздрава России, 634050, Томск, Россия;<sup>2</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050, Томск, Россия;<sup>3</sup>Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники, 634050, Томск, Россия;<sup>4</sup>Научно-исследовательский институт онкологии, Томский научно-исследовательский медицинский центр РАН, 634009, Томск, Россия

**Введение.** При клинической манифестации туберкулеза легких альвеолярные макрофаги накапливают микобактерии и перестают выполнять свои эффекторные функции. Это связано с конверсией их провоспалительного фенотипа М1 в противовоспалительный М2, что способствует хронизации инфекции. Научная гипотеза исследования предполагает влияние цитокинового статуса организма на поляризацию моноцитов в крови в процессе их миграции к очагу воспаления, определяя дифференцировку и пути активации макрофагов в тканях.

**Цель исследования** – оценка иммунофенотипа моноцитов крови и исследование *in vitro* уровня секреции иммунорегуляторных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови у больных с различными клиническими формами туберкулеза легких.

**Методика.** Обследовано 65 пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких. Материалом исследования служили венозная кровь и мононуклеарные лейкоциты периферической крови. Исследование иммунофенотипа моноцитов проводили методом проточной цитометрии (цитофлуориметр Cytotflex, Beckman Coulter, США) в цельной крови с использованием моноклональных антител («eBioscience», США). Обработку полученных данных проводили с помощью программы «CytExpert 2.0». Определяли количество клеток экспрессирующих поверхностные маркеры: CD14, CD163, CD204 и HLA-DR. Содержание цитокинов (IL-2, IL-10, TGFβ) в супернатантах клеточных культур оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

**Результаты.** Полученные результаты позволяют предположить, что при общем снижении численности циркулирующих CD14-позитивных моноцитов крови у больных туберкулезом легких, независимо от его клинической формы сохраняется высокая экспрессия маркеров активации клеток как по провоспалительному фенотипу М1 (HLA-DR-позитивные моноциты), так и противовоспалительному фенотипу М2 (CD163-позитивные моноциты). При диссеминированной форме заболевания повышается количество противовоспалительных CD204-позитивных моноцитов, предшественников М2-макрофагов, что свидетельствует о доминировании супрессорного типа иммунного ответа. Анализ цитокинового статуса *in vitro* показал, что течение болезни сопровождается угнетением эффекторных иммунных реакций и повышением уровня противовоспалительных цитокинов. Выявленные изменения в равной степени могут быть как причиной, так и следствием дефицита секреции IL-2. Показано также, что уровень секреции медиаторов с супрессорными эффектами (IL-10, TGFβ) меняется в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам: гиперсекреция IL-10 отмечается у больных с инфильтративным лекарственно-чувствительным, а TGFβ – при диссеминированном лекарственно-устойчивом туберкулезе легких.

**Заключение.** Особенности дифференциации моноцитов крови у больных туберкулезом легких позволили прийти к заключению, что предшественники макрофагов – моноциты, уже в кровотоке начинают экспрессировать маркеры, характерные для разных по функциям М1- и М2-макрофагов, с поляризацией в направлении М2-иммунофенотипа. Следовательно, при развитии туберкулеза легких реализуются механизмы цитокиновой регуляции, подавляющие активацию врожденного иммунитета, что, возможно, является причиной хронизации воспалительного процесса в легких и формирования иммунодефицита индуцированного *Mycobacterium tuberculosis*.

**Ключевые слова:** туберкулез легких; клетки; моноцит; макрофаг; цитокины; проточная цитометрия; иммуноферментный анализ; дифференцировка моноцитов

**Для цитирования:** Чурина Е.Г., Уразова О.И., Ситникова А.В., Новицкий В.В., Кононова Т.Е., Чумакова С.П., Патышева М.Р. Дифференцировка моноцитов крови и особенности цитокинового статуса у больных туберкулезом легких.

*Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 79-87.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.79-87

**Для корреспонденции:** Чурина Елена Георгиевна, e-mail: lena1236@yandex.ru

**Участие авторов:** разработка дизайна исследования, анализ литературы, статистическая обработка результатов исследования и их интерпретация, написание и оформление текста рукописи – Чурина Е.Г.; материально-техническое обеспечение проведения лабораторных исследований, интерпретация результатов, написание, оформление и перевод текста рукописи – Уразова О.И.; пробоподготовка биоматериала, выполнение методов иммуномагнитной сепарации и проточной цитометрии, написание и оформление текста рукописи – Ситникова А.В.; консультирование соавторов по гематологическим аспектам исследования, корректировка текста рукописи – Новицкий В.В.; взаимодействие с пациентами, обеспечение забора биоматериала – Кононова Т.Е.; взаимодействие с пациентами, консультирование соавторов по вопросам пульмонологии – Чумакова С.П.; выполнение методов иммуномагнитной сепарации и проточной цитометрии, консультативная помощь при разработке дизайна исследования – Патышева М.Р. Утверждение окончательной версии статьи – все соавторы.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт №16.512.11.2046), Российского фонда фундаментальных исследований (проект №19-315-90018, проект №11-04-98057-р\_сибирь\_a), Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (гранты НШ-614.2012.7, НШ-4184.2014.7, НШ-2690.2018.7).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи нигде ранее не публиковались.

Поступила 15.12.2019

Принята в печать 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

**Churina E.G.<sup>1,2</sup>, Urazova O.I.<sup>1,3</sup>, Sitnikova A.V.<sup>1</sup>, Novitskiy V.V.<sup>1,3</sup>, Kononova T.E.<sup>1</sup>, Chumakova S.P.<sup>1</sup>, Patysheva M.R.<sup>2,4</sup>**

## **Differentiation of blood monocytes and features of the cytokine status in patients with lung tuberculosis**

<sup>1</sup>Siberian State Medical University,  
Moskovsky Trakt Str. 2, Tomsk, 634050, Russia;

<sup>2</sup>National Research Tomsk State University,  
Prospekt Lenina 36, Tomsk, 634050, Russia;

<sup>3</sup>Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics,  
Prospekt Lenina 40, Tomsk, 634050, Russia;

<sup>4</sup>Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,  
5 Kooperativnaya Str., Tomsk, 634009, Russia

In clinical manifestation of pulmonary tuberculosis, alveolar macrophages perform as a reservoir where they accumulate mycobacteria and lose their effector functions due to the pathological conversion of macrophage pro-inflammatory M1 phenotype to the anti-inflammatory M2 phenotype, which provides transition to chronic infection. The study hypothesis suggested that the cytokine status, as evaluated by leukocyte secretion of cytokines *in vitro*, influences the monocyte polarization in the blood during their migration to the inflammatory focus, thereby determining differentiation and pathways of macrophage activation in tissues.

**The aim** of this work was to assess the immunophenotype of blood monocytes and the *in vitro* secretion of immunoregulatory cytokines by mononuclear peripheral blood leukocytes from patients with different clinical forms of pulmonary tuberculosis taking into account the pathogen sensitivity to major anti-tuberculosis drugs.

**Methods.** 65 patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis were evaluated. The study material was venous blood and peripheral blood mononuclear leukocytes. Monocyte immunophenotype was determined in whole blood by flow cytometry on a Cytoflex flow cytometer (Bectan Coulter, USA) with monoclonal antibodies (eBioscience, USA). Results were processed with a CytExpert 2.0 software. The number of cells expressing surface markers, CD14, CD163, CD204 and HLA-DR, was determined. Content of cytokines (IL-2, IL-10, TGF $\beta$ ) in supernatants of cell cultures was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results of the study were processed with a SPSS v.11.0 standard software package.

**Results.** The study results suggested that with an overall decrease in the number of circulating CD14-positive blood monocytes in patients with pulmonary tuberculosis regardless of its clinical form, high expression of cell activation markers remained both for the pro-inflammatory M1 phenotype (HLA-DR-positive monocytes) and the anti-inflammatory M2 phenotype (CD163-positive monocytes). In disseminated tuberculosis, the number of anti-inflammatory CD204-positive monocytes, M2 macrophage precursors, increases indicating predomination of the immunosuppressive response. *In vitro* analysis of the cytokine status showed that tuberculosis progression is accompanied by inhibition of effector immune responses and increases in anti-inflammatory cytokine concentrations *in vitro*. These changes may be equally either a cause or a consequence of deficient IL-2 secretion. We also found that the secretion of mediators with suppressor effects (IL-10, TGF $\beta$ ) varied depending on both the clinical form of tuberculosis and the pathogen sensitivity to anti-TB drugs; IL-10 hypersecretion was observed in patients with drug-sensitive, infiltrative tuberculosis whereas TGF $\beta$  hypersecretion was observed in disseminated, drug-resistant tuberculosis.

**Conclusion.** Features of blood monocyte differentiation in patients with pulmonary tuberculosis allowed us to conclude that monocytes, the macrophage precursors, start expressing markers for different functions of M1 and M2 macrophages with polar-

ization toward the M2 immunophenotype already in the bloodstream. Therefore, in the development of pulmonary tuberculosis, cytokine regulation mechanisms become involved in suppressing the activation of innate immunity, which possibly causes chronic inflammation in the lungs and formation of Mtb-induced immunodeficiency.

**Keywords:** pulmonary tuberculosis; cells; monocyte; macrophage; cytokines; flow cytometry; enzyme immunoassay; monocyte differentiation

**For citation:** Churina E.G., Urazova O.I., Sitnikova A.V., Novitskiy V.V., Kononova T.E., Chumakova S.P., Patysheva M.R. Differentiation of blood monocytes and features of the cytokine status in patients with lung tuberculosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 79-87. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.79-87

**For correspondence:** **Elena G. Churina**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Siberian State Medical University, Ministry of Health Care of the Russian Federation; 2 Moskovsky trakt, Tomsk 634050, Russian Federation; Professor, National Research Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation, e-mail: lena1236@yandex.ru

**Contribution:** research concept and design development, literature analysis, statistical processing of research results and their interpretation, writing and formatting the manuscript text – Churina E.G.; material and technical support for laboratory research, interpretation of results, writing, formatting and translation of the text of the manuscript – Urazova O.I.; sample preparation of biomaterial, implementation of methods of immunomagnetic separation and flow cytometry, writing and formatting the text of the manuscript – Sitnikova A.V.; advising co-authors on the hematological aspects of the study, correcting the text of the manuscript – Novitskiy V.V.; interaction with patients, ensuring the collection of biomaterial – Kononova T.E.; interaction with patients, consulting co-authors on pulmonology – Chumakova S.P.; implementation of methods of immunomagnetic separation and flow cytometry, advisory assistance in the development of research design – Patysheva M.R. Approval of the final version of the article – all co-authors.

**Acknowledgment.** The study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (State Contract # 16.512.11.2046), Russian Foundation for Basic Research (project #19-315-90018, project # 11-04-98057-r\_sibir a), and the Council for Grants of the President of the Russian Federation for Leading Scientific Schools (grants NSh-614.2012.7, NSh-4184.2014.7, NSh-2690.2018.7).

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

#### Information about the authors:

Churina E.G., <https://orcid.org/0000-0002-8509-9921>

Urazova O.I., <https://orcid.org/0000-0002-9457-8879>

Sitnikova A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5896-1144>

Novitskiy V.V., <https://orcid.org/0000-0002-9577-8370>

Kononova T.E., <http://orcid.org/0000-0001-8457-9440>

Chumakova S.P., <https://orcid.org/0000-0003-3468-6154>

Patysheva M.R., <https://orcid.org/0000-0003-2865-7576>

Received 15.12.2019

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

Туберкулез (ТБ) – высоко вирулентная и распространенная инфекция. Сегодня, по-прежнему, во всем мире достаточно высокий процент инфицированных *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* людей. При этом имеется тенденция к увеличению среди пациентов частоты встречаемости остро прогрессирующих деструктивных форм туберкулеза с тяжелым клиническим течением заболевания и формированием множественной и широкой лекарственной устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам [1].

Неэффективность механизмов иммунной защиты при внедрении *Mtb* в макроорганизм – ведущий фактор развития туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), так как селекция резистентных штаммов микобактерий определяется активностью иммунного ответа в целом. Ключевые клетки противотуберкулезного иммунитета – макрофаги и

T-лимфоциты [2]. Риск развития туберкулеза возрастает у лиц с первичными или вторичными иммунодефицитами. Высокая частота встречаемости туберкулеза с МЛУ также отмечается у иммунокомпрометированных пациентов [3].

При клинической манифестации ТБ альвеолярные макрофаги играют роль резервуара, в котором накапливаются *Mtb*, и перестают выполнять свои эффекторные функции. Это связано с патологическим переключением их провоспалительного фенотипа М1 на противовоспалительный – М2, что способствует хронизации и персистенции туберкулезной инфекции. Вероятно, что поляризация фенотипа предшественников макрофагов – моноцитов может происходить еще в кровотоке под влиянием комплекса цитокинов и ростовых факторов. Таким образом, при реализации иммунной защиты против *Mtb* пластичность моноци-

тов/макрофагов обеспечивает возможность их конверсии и функционального перепрограммирования [4, 5]. Причины дисбаланса иммунного ответа у больных ТБ разнообразны. Они могут быть связаны с поляризацией иммунных реакций в направлении гуморального и супрессорного типов. Соответственно меняется и цитокиновый профиль с преобладанием цитокинов, подавляющих активацию макрофагов и эффекторных Т-клеток [6].

Научная гипотеза нашего исследования заключалась в том, что цитокиновый статус организма, который мы оценивали, определяя секрецию цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови (МПК) *in vitro*, влияет на предварительную поляризацию моноцитов в крови в процессе их миграции к очагу воспаления, определяя, таким образом, дифференцировку и пути активации макрофагов в тканях.

Учитывая интенсивное развитие иммунобиотерапии и актуальность проблемы резистентности бактерий к антибиотикам, новые знания об особенностях дифференцировки моноцитов и секреции цитокинов при ТБ могут стать фундаментальной основой для разработки перспективных иммуноактивных средств, дополняющих стандартную противотуберкулезную химиотерапию [7].

Цель работы – оценка иммунофенотипа моноцитов крови и исследование уровня секреции иммунорегуляторных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови *in vitro* у больных с различными клиническими формами туберкулеза легких с учетом лекарственной чувствительности возбудителя к основным противотуберкулезным средствам.

### Методика

Работа выполнена по международным правилам работы с биоматериалом людей. Все испытуемые добровольно подписывали форму информированного согласия на анонимное участие в исследовании. Протокол исследования одобрен этическим комитетом Национального исследовательского Томского государственного университета. Обследовано 65 пациентов с впервые выявленным ТБ легких (45 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 55 лет). Диагноз устанавливался на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Все больные были разделены на 2 группы по клинической форме заболевания: группу с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ) составили 37 человек, группу с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) – 28 человек. При делении больных

ТБ на группы учитывалась чувствительность возбудителя к основным противотуберкулезным средствам (ПТС): группу пациентов, выделяющих *Mtb*, чувствительные к основным ПТС, составили 43 человека, во вторую группу были включены 22 пациента, выделяющих *Mtb*, устойчивые к ПТС основного ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу). У 22 пациентов из 65 проводилось исследование иммунофенотипа моноцитов крови. Данная группа представлена в работе только в аспекте разных клинических форм ТБ, поскольку во всей этой группе *Mtb* были чувствительны к ПТС основного ряда: 12 пациентов с инфильтративным ТБ и 10 с диссеминированным ТБ. Контрольную группу составили 15 здоровых доноров с соответствующим группой больных ТБ распределением по полу и возрасту (10 мужчин и 5 женщин в возрасте от 18 до 55 лет).

Материалом исследования служили венозная кровь и мононуклеары периферической крови. Забор крови проводился утром натощак из локтевой вены до начала проведения химиотерапии ПТС. Исследование иммунофенотипа моноцитов проводили методом проточной цитометрии в цельной крови с использованием моноклональных антител («Bioscience», США) на проточном цитофлуориметре Cytotflex (Beckman Coulter, США). Обработку полученных данных проводили с помощью программы «CytExpert 2.0». Определяли содержание позитивных клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры моноцитов: CD14, CD163, CD204 и HLA-DR.

Из крови клетки выделяли методом градиентного центрифугирования (1,077 г/см<sup>3</sup>). Клетки культивировали в полной питательной среде (90% RPMI-1640, 10% инактивированной телячьей сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/мл HEPES). Клеточность в суспензионной культуре стандартизировали до  $2,5 \times 10^6$ /мл. Для специфической (антигенной) стимуляции клеток в культуре применяли вакцинный штамм BCG (50 мкг/мл). Определяли базальный и стимулированный вакциной уровень секреции следующих цитокинов: интерлейкинов IL-2, IL-10, трансформирующего фактора роста (TGF) $\beta$ . Содержание цитокинов в супернатантах суспензионных клеточных культур оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Исследование проводили с использованием наборов ООО «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург (для измерения концентрации IL-2), ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск (для измерения концентрации IL-10) и «BCM Diagnostics», США (для измерения концентрации TGF- $\beta$ ). Оптическую плотность регистрировали на

анализаторе Multiskan EX (Thermo electron corporation, Финляндия) при длине волны 450 нм.

Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ SPSS v.11.0. Для всех имеющихся выборок данных проверяли гипотезу нормальности распределения по критерию Шапиро–Уилка. Так как распределение выборок отличалось от нормального, рассчитывали медиану (Me), первый и третий квартили [Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub>]. Для оценки статистической значимости различий выборок, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали U-критерий Манна–Уитни и T-критерий Вилкоксона. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

**Экспрессия поверхностных маркеров моноцитов (табл. 1).** Анализ экспрессии поверхностных маркеров моноцитов показал снижение численности CD14<sup>+</sup>-клеток у больных инфильтративным и диссеминированным ТБ по сравнению с группой здоровых доноров. Количество CD14<sup>+</sup>-моноцитов с экспрессией молекулы CD204 при диссеминированном ТБ было выше, чем в контрольной группе, а при инфильтративном ТБ не отличалось от такового у здоровых добровольцев (табл. 1). Анализ экспрессии на моноцитах молекул HLA-DR и CD163 у больных диссеминированным ТБ выявил значимое повышение числа позитивных клеток по сравнению с группой здоровых доноров. Сходная картина прослеживалась у больных инфильтративным ТБ: содержание моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, в этой группе пациентов было также значительно выше, чем в контроле (табл. 1). Вместе с тем статистически значимых межгрупповых различий ис-

следуемых показателей у больных инфильтративным и диссеминированным ТБ не было выявлено.

**Секреция цитокинов (табл. 2).** Оценивая уровень секреции IL-2 – профильного медиатора Т-хелперов типа 1 (Th1), было установлено, что до начала лечения ПТС у больных с лекарственно-чувствительным ТБ (ЛЧТБ) (за исключением больных с диссеминированным и лекарственно-устойчивым ТБ (ЛУТБ) базальный уровень секреции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами крови был ниже, чем у здоровых доноров. При этом наиболее выраженное снижение секреции медиатора отмечалось у больных с лекарственно-устойчивым вариантом ДТБ (табл. 2).

При стимуляции мононуклеаров вакцинным штаммом VCG секреция IL-2 оказалась существенно ниже нормы вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя и формы ТБ. При инфильтративном ЛУТБ индуцированная секреция IL-2 была в 2 раза выше (табл. 2).

При изучении секреции цитокинов, продуцируемых Т-хелперами типа 2 (Th2) и регуляторными Т-лимфоцитами (Treg), нами были выявлены следующие закономерности. У больных с инфильтративным ЛЧТБ было зарегистрировано статистически значимое (в 1,78 раза относительно контрольных значений) увеличение базальной секреции IL-10 мононуклеарными лейкоцитами крови (табл. 3). Уровень спонтанной секреции TGF-β при лекарственно-чувствительном ТБ оставался в пределах нормы. В то же время при лекарственно-устойчивом ИТБ имелось снижение секреции TGF-β, а при диссеминированном ЛУТБ – ее увеличение в 1,5 раза. Установлено, что у больных с лекарственно-устойчивым ИТБ дан-

Таблица 1

**Содержание CD14<sup>+</sup>-клеток, экспрессирующих молекулы CD204, HLA-DR CD163 у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, Me [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>]**

Группы обследованных лиц	CD14 <sup>+</sup> -клетки, %	CD14 <sup>+</sup> CD204 <sup>+</sup> -клетки, %	CD14 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> -клетки, %	CD14 <sup>+</sup> CD163 <sup>+</sup> -клетки, %
Здоровые доноры	80.0 [73.3–86.3]	2.6 [1.32–3.90]	22.9 [18.4–29.3]	17.7 [12.3–22.0]
Больные ИТБ	55.6 [42.5–66.0] $p_1=0.027$	2.8 [1.46–3.72]	59.6 [46.7–65.0] $p_1=0.031$	45.6 [37.7–53.6] $p_1=0.027$
Больные ДТБ	65.2 [50.7–74.0] $p_1=0.012$	5.5 [3.22–6.70] $p_1=0.007$ $p_2=0.011$	67.5 [54.5–71.0] $p_1=0.010$	41.5 [34.3–48.6] $p_1=0.012$

**Примечание.** Здесь и в табл. 2, 3:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с параметрами у здоровых доноров;  $p_2$  – у больных ИТБ.

ный показатель был в 2,9 раза ниже, чем у больных с ДТБ (табл. 3).

Добавление в культуры клеток вакцинного штамма BCG (табл. 3) сопровождалось повышением уровня секреции IL-10 у больных с инфильтративным ЛЧТБ относительно нормы и базального уровня секре-

ции. Более высоким в условиях антигенной индукции клеток оказался также уровень секреции IL-10 при диссеминированном ЛУТБ (в сравнении со спонтанным уровнем образования цитокина). При инфильтративном ЛУТБ уровень стимулированной секреции IL-10 оставался в пределах нормы (табл. 3).

Таблица 2

Показатели секреции IL-2 *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам, Ме [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]

IL-2 (пг/мл)	Группы обследованных лиц				
	Здоровые доноры	Больные с ЛЧТБ		Больные с ЛУТБ	
		Больные ИТБ	Больные ДТБ	Больные ИТБ	Больные ДТБ
Без индукции (базальная)	22.26 [10.82–30.18]	16.24 [9.63–32.48] $p_1=0.002$	29.72 [12.72–53.59] $p_2=0.049$	15.42 [10.28–20.73] $p_1=0.037$	14.32 [9.73–21.49] $p_1=0.048$ $p_3=0.042$
При индукции BCG	69.36 [13.94–65.80]	13.82 [5.28–30.21] $p_1=0.016$	27.18 [11.33–42.86] $p_1=0.003$	26.83 [11.15–33.32] $p_1=0.038$ $p_3=0.024$	15.53 [9.79–22.85] $p_1=0.018$ $p_2=0.019$

Примечание.  $p_3$  – у больных с ЛЧТБ.

Таблица 3

Показатели секреции IL-10 и TGF- $\beta$  *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам, Ме [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]

Группы обследованных лиц		IL-10 (пг/мл)		TGF- $\beta$ (пг/мл)	
		Без индукции (базальная)	При индукции BCG	Без индукции (базальная)	При индукции BCG
Здоровые доноры		25.29 [13.50–33.56]	26.21 [22.74–52.20]	1108,75 [929.80–1487.20]	1087.80 [500.00–1412.60]
Больные с ЛЧТБ	Больные ИТБ	44.92 [18.75–57.64] $p_1=0.002$	55.49 32.22–65.28) $p_1=0.027$ $p_4=0.005$	1062.91 [792.24–1613.57]	1125.92 [875.16–1215.07]
	Больные ДТБ	24.11 [9.54–50.72] $p_2<0.001$	33.52 20.64–66.17) $p_2<0.001$	923.62 [728.24–1427.19]	673.18 [573.18–831.92] $p_1<0.001$ $p_2=0.003$ $p_4=0.038$
Больные с ЛУТБ	Больные ИТБ	27.51 [24.18–42.71] $p_3<0.001$	24.51 25.62–53.21	578.02 [315.29–781.46] $p_{1,3}<0.001$	352.17 [195.32–891.45] $p_1=0.021$ $p_3=0.004$
	Больные ДТБ	20.07 [18.22–21.13]	26.52 23.57–35.24 $p_2=0.042$ $p_4=0.004$	1672.33 [915.61–2452.27] $p_{1,2}<0.001$ $p_3=0.005$	1986.58 [792.53–3009.68] $p_1=0.044$ $p_2=0.048$ $p_3=0.023$ $p_4=0.007$

Примечание.  $p_4$  – с базальным уровнем секреции цитокина.

Уровень BCG-индуцированной секреции TGF- $\beta$  при диссеминированном ЛЧТБ оказался в 1,6 раза ниже, чем у здоровых доноров, и в 1,4 раза ниже, чем в отсутствие дополнительной антигенной нагрузки. При ЛУТБ установлены разнонаправленные изменения секреции TGF- $\beta$  в зависимости от его клинической формы. Так, при ИТБ секреция TGF- $\beta$  была в 3,1 раза ниже относительно контрольных значений, а при ДТБ отмечалось ее увеличение как относительно контрольных значений (в 1,8 раза), так и сравнительно с базальным уровнем (в 1,2 раза) (табл. 3).

### Обсуждение

Высокая эффективность активации врожденного иммунитета при ТБ играет решающую роль в развитии и исходах туберкулезной инфекции. Нарушения индуктивной фазы иммунного ответа часто связаны с формированием толерантности к антигену уже на стадии его презентации. Полученные результаты позволяют предположить, что при общем снижении численности циркулирующих CD14-позитивных моноцитов крови у больных ТБ независимо от его клинической формы сохраняется высокая экспрессия маркеров активации клеток как по провоспалительному фенотипу M1 (HLA-DR-позитивные моноциты), так и противовоспалительному фенотипу M2 (CD163-позитивные моноциты) (табл. 1). Вероятно, механизмы их окончательной дифференцировки определяются непосредственно в очаге воспаления. В то же время, повышение числа CD204-позитивных моноцитов (табл. 1), предшественников M2-макрофагов, у больных диссеминированным ТБ свидетельствует о доминировании супрессорного типа иммунного ответа. Высокая экспрессия скавенджер-рецептора CD204 на моноцитах также может быть связана с предрасположенностью данных пациентов к реализации, в первую очередь, регенераторных и противовоспалительных функций клеток врожденного иммунитета.

Манифестация туберкулезной инфекции контролируется различными факторами, участвующими в формировании не только врожденного, но и адаптивного иммунитета, в котором существенная роль отводится как макрофагам, так и Т-лимфоцитам, взаимно активирующимся посредством цитокинов в ответ на индукцию антигеном *Mtb* [8]. Ключевую роль в противотуберкулезном иммунитете играет IL-2 – ростовой фактор Т-клеток. Он обеспечивает в ходе иммунного ответа активацию регуляторных Т-клеток и эффекторных (воспалительных и цитотоксических) Т-лимфоцитов [9].

Исследование *in vitro* IL-2-секреторной функции мононуклеарных лейкоцитов крови показало, что в

группе больных с диссеминированным ЛУТБ дефицит секреции IL-2 был более выраженным, чем при диссеминированном ЛЧТБ (табл. 2). Выявленное нами у больных ТБ снижение секреции IL-2 в период активно развивающегося патологического процесса, вероятно, определяется непосредственным токсическим влиянием продуктов жизнедеятельности *Mtb* на процессы биосинтеза цитокина в иммунокомпетентных клетках [10]. Кроме того, в основе иммунодепрессии при ТБ лежит функциональная анергия Т-клеток, одним из проявлений которой является гипосекреция IL-2, что опосредует развитие лимфоцитопении и способствует тяжелому клиническому течению заболевания при ЛУТБ [11]. Уровень BCG-индуцированной секреции IL-2 *in vitro* при ЛЧТБ и ЛУТБ оказался ниже, чем в контрольной группе, у всех больных ТБ независимо от чувствительности возбудителя к ПТС (табл. 2).

Известно, что IL-2 – ведущий митогенный фактор Т-клеток. При этом он также стимулирует рост и дифференцировку регуляторных Т-лимфоцитов с супрессорной активностью [12]. В наших предыдущих работах было установлено, что при ТБ в крови больных значительно повышается содержание Treg, в том числе их субпопуляций с супрессорной активностью, экспрессирующих транскрипционный фактор Foxp3 [13]. Доказано, что первичный механизм действия регуляторных Т-лимфоцитов представляет собой дезорганизацию процессов метаболизма. В результате наличия поверхностной молекулы CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора к IL-2) Treg могут связывать IL-2, тем самым препятствуя активации данным цитокином других Т-клеток и секреции ими IL-2 и других провоспалительных медиаторов [14]. Возможно, снижение секреции IL-2 при ТБ вызвано повышением численности и функциональной активности Treg-лимфоцитов.

IL-10 подавляет синтез и секрецию регуляторных цитокинов всеми клонами Т-лимфоцитов-хелперов, а также блокирует активацию антигенпрезентирующих клеток (АПК). Медиатор обладает выраженным иммуносупрессорным эффектом и снижает пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на *Mtb* при туберкулезе [15]. Мы установили, что при лекарственно-чувствительном ИТБ возрастает уровень базальной и BCG-стимулированной секреции IL-10 *in vitro* (табл. 3).

При инфильтративной форме ТБ, как правило, отмечается наименьшая степень отклонений показателей иммунитета, что согласуется с меньшей выраженностью клинико-рентгенологических проявлений заболевания по сравнению с другими формами туберкулеза. В случае развития ИТБ клеточные механизмы защиты работают относительно эффективно, сохраняется се-

клеточная активность иммунокомпетентных клеток в отношении цитокинов Th1-профиля (IL-12, интерферон (IFN)  $\gamma$ ) [16].

Основными клетками-продуцентами другого иммуносупрессорного цитокина – TGF- $\beta$  – являются Treg с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Однако его секретируют (но в меньшем количестве) и иные клетки – Th2-лимфоциты, моноциты/макрофаги, эозинофилы, тромбоциты, хондроциты, остеобласты и остеокласты [17]. Главным свойством TGF- $\beta$  является супрессия всех типов иммунных реакций, но, в первую очередь, Th1-адаптивного ответа [18]. Под влиянием TGF- $\beta$  происходит конверсия субпопуляций Т-клеток – из CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Т-лимфоцитов образуются CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg [19].

Проявлением такого рода преобразования является экспрессия транскрипционного фактора Foxp3 (скурфина) непосредственно в клетке и молекул CD25 и CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*) на ее поверхности. Известно, что TGF- $\beta$  может изменять функциональную активность Treg и их чувствительность к апоптозу за счет повышения экспрессии гена *FOXP3*, который локализуется в X-хромосоме [18].

Анализ секреции TGF- $\beta$  в культуре МПК *in vitro* показал наличие разнонаправленных ее изменений у больных ТБ (табл. 3). У пациентов с ДТБ с лекарственной устойчивостью возбудителя отмечалось значительное увеличение секреции данного медиатора (базальной и BCG-индуцированной), тогда как при ИТБ секреция цитокина снижалась. Ниже нормы уровень секреции TGF- $\beta$  оказался также при индукции клеток вакцинным штаммом BCG при лекарственно-чувствительном ДТБ (табл. 3).

Резюмируя полученные данные, можно сделать вывод, что у больных ИТБ ведущим медиатором, способствующим поляризации иммунных реакций в направлении супрессорного пути, с формированием иммунной толерантности является IL-10, а снижение секреции «медиатора фиброза» TGF- $\beta$  при ИТБ может рассматриваться как относительно благоприятный фактор, препятствующий диссеминации *Mtb* [20]. Поскольку у пациентов с диссеминированным ЛУТБ секреция TGF- $\beta$  возрастала в ответ на индукцию суспензионной культуры клеток BCG, можно судить о высокой реактивности МПК при этой клинической форме болезни. В сочетании с высокой экспрессией ключевого маркера M2-макрофагов – скавенджер-рецептора CD204 на моноцитах у больных диссеминированным ТБ, гиперсекреция TGF- $\beta$  – безусловно, негативный фактор, поскольку предрасполагает к дифференцировке и активации моноцитов по альтернативному пути M2, фиброгенезу и затяжному течению воспаления [21].

## Заключение

Сегодня, в период ренессанса врожденного иммунитета, углубленного изучения механизмов действия моноцитов/макрофагов при инфекционной и неинфекционной патологии, уже не вызывает сомнений лидирующая роль этих клеток в иммунном ответе, которая и определяет результат его эффекторной фазы.

Определение иммунофенотипа моноцитов крови у больных ТБ показало, что предшественники макрофагов уже в кровотоке начинают экспрессировать маркеры, характерные для разных по функциям M1- и M2-макрофагов, то есть делятся на 2 основные субпопуляции. Интересно, что при диссеминированной форме ТБ значительно повышается численность CD204-позитивных моноцитов. Таким образом, представляется изначально детерминированным именно M2-путь активации макрофагов.

Исследование цитокинового статуса у больных ТБ позволяет прийти к заключению, что, в целом, течение болезни сопровождается угнетением эффекторных иммунных реакций. Выявленные изменения в равной степени могут быть как причиной, так и следствием дефицита синтеза и секреции IL-2. Уровень секреции медиаторов с супрессорными эффектами (IL-10, TGF- $\beta$ ) варьирует в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности *Mtb* к ПТС. Так, базальная и антиген-индуцированная *in vitro* гиперсекреция IL-10 отмечается у больных с инфильтративным ЛЧТБ, а TGF- $\beta$  – при диссеминированном ЛУТБ.

Следовательно, при развитии ТБ доминируют механизмы цитокиновой регуляции, подавляющие активацию иммунного ответа, что, возможно, является причиной хронического воспаления в ткани легких и формирования вторичного иммунодефицита, индуцированного *Mtb*.

## Литература

(п.п. 1-12; 14-21 см. References)

13. Кононова Т.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В., Колобовникова Ю.В., Чурина Е.Г., Захарова П.А. Факторы дифференцировки Th17- и Treg-лимфоцитов при туберкулезе легких. *Бюлл. экп. биол. и мед.* 2015; 159(2): 158–61. Doi: 10.1007/s10517-015-2922-9. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-015-2922-9>

## References

1. Dye C., Williams B.G. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science*. 2010; 328: 856–61. Doi: 10.1126/science.1185449. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466923>
2. Mihret A. The role of dendritic cells in Mycobacterium tuberculosis infection. *Virulence*. 2012; 3(7): 654–59. Doi: 10.4161/viru.22586. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3545947/>

3. Bozzano F., Marras F., De Maria A. Immunology of tuberculosis. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2014; 6(1): e2014027. Doi: 10.4084/MJHID.2014.027. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804000>
4. Castaño D., García L.F., Rojas M. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis.* 2011; 91(5): 348–60. Doi: 10.1016/j.tube.2011.04.002.
5. Balboa L., Romero M.M., Basile J.I., Sabio y García C.A., Schierloh P., et al. Paradoxical role of CD16+CCR2+CCR5+ monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 90(1): 69–75. Doi: 10.1189/jlb.1010577. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454357>
6. Sakhno L.V., Shevela E.Ya., Tikhonov M.A., Nikonov S.D., Ostantin A.A., Chernykh E.R. Impairments of Antigen-Presenting Cells in Pulmonary Tuberculosis. *J. Immunol. Res.* 2015; Article ID 793292. Doi.org/10.1155/2015/793292. <https://www.hindawi.com/journals/jir/2015/793292/>
7. Tiemersma E., van den Hof S., Dravniece G., Wares F., Molla Y., Permata Y., et al. Integration of drug safety monitoring in tuberculosis treatment programmes: country experiences. *Eur. Respir. Rev.* 2019; 28(153): 180115. Doi: 10.1183/16000617.0115-2018. <https://err.ersjournals.com/content/28/153/180115>
8. Chiacchio T., Petruccioli E., Vanini V., Cuzzi G., La Manna M.P., Orlando V. Pinnetti C., et al. Impact of antiretroviral and tuberculosis therapies on CD4+ and CD8+ HIV/M. tuberculosis-specific T-cell in co-infected subjects. *Immunol. Lett.* 2018; 198: 33–43. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6307796/>
9. Chinen T., Kannan A.K., Levine A.G., Fan X., Klein U., Zheng Y., et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* 2016; 17(11): 1322–33. Doi: 10.1038/ni.3540. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27595233>
10. Balcells M.E., Ruiz-Tagle C., Tiznado C., García P., Naves R. Diagnostic performance of GM-CSF and IL-2 in response to long-term specific-antigen cell stimulation in patients with active and latent tuberculosis infection. *Tuberculosis.* 2018; 112: 110–19. Doi: 10.1016/j.tube.2018.08.006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30205963>
11. Biselli R., Mariotti S., Sargentini V., Sauzullo I., Lastilla M., Mengoni F., et al. Detection of interleukin-2 in addition to interferon- $\gamma$  discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals, and controls. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16: 1282–84.
12. Burchill M.A., Yang J., Vang K.B., Moon J.J., Chu H.H., Lio C.W., et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity.* 2008; 28: 112–21. Doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19886902>
13. Kononova T.E., Urazova O.I., Novitskii V.V., Kolobovnikova Yu.V., Churina E.G., Zakharova P.A. Factors of Th17 and Treg Lymphocyte Differentiation in Pulmonary Tuberculosis. *Bull. Exp. Biol. Med. (Mosk.)*. 2015; 159(2): 158–61. (In Russian) Doi: 10.1007/s10517-015-2922-9 <https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-015-2922-9>
14. Whiteside T.L. FOXP3+ Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2018; 22(4): 353–63. Doi: 10.1080/14728222.2018.1451514. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29532697>
15. Mannino M.H., Zhu Z., Xiao H., Bai Q., Wakefield M.R., Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett.* 2015; 367(2): 103–07. Doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.009 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26188281>
16. Pai M., Denking C.M., Kik S. V., Rangaka M.X., Zwerling A., Oxlade O., et al. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27: 3–20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24396134>
17. Rudra D., Egawa T., Chong M.M., Treuting P., Littman D.R., Rudensky A.Y. Runx-CBF beta complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2009; 10: 1170–77. Doi: 10.1038/ni.1795. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767756>
18. Zhang J., Li H., Yi D., Lai C., Wang H., Zou W., et al. Knockdown of vascular cell adhesion molecule 1 impedes transforming growth factor beta 1-mediated proliferation, migration, and invasion of endometriotic cyst stromal cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2019; 17: 69. Doi.org/10.1186/s12958-019-0512-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31443713>
19. Kondělková K., Vokurková D., Krejsek J., Borská L., Fiala Z., Ctírad A. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2010; 53(2): 73–7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20672742>
20. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. The Role of Foxp3-Expressing Regulatory T Cells and T Helpers in Immunopathogenesis of Multidrug Resistant Pulmonary Tuberculosis. *Tuberc. Res. Treat.* 2012; 2012: 931291. Doi: 10.1155/2012/931291. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359675/>
21. Kaku Y., Imaoka H., Morimatsu Y., Komohara Y., Ohnishi K., Oda H., et al. Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2014; 9(1): e87400. Doi: 10.1371/journal.pone.0087400

### Сведения об авторах:

**Чурина Елена Георгиевна**, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии, проф. каф. органической химии, вед. науч. сотр. лаб. трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, e-mail: lena1236@yandex.ru;

**Уразова Ольга Ивановна**, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, зав. каф. патофизиологии, проф. каф. комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, e-mail: urazova72@yandex.ru;

**Ситникова Анжелика Владимировна**, аспирант каф. патофизиологии, e-mail: anjelika.sitnikova@yandex.ru;

**Новицкий Вячеслав Викторович**, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, заслуженный деятель науки РФ, проф. каф. патофизиологии, проф. каф. комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, e-mail: kaf.pat.fiziolog@ssmu.ru;

**Кононова Татьяна Евгеньевна**, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии, e-mail: kononova.te@gmail.com;

**Чумакова Светлана Петровна**, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии, e-mail: Chumakova\_S@mail.ru;

**Патышева Марина Ринатовна**, мл. науч. сотр. лаб. биологии опухолевой прогрессии, мл. науч. сотр. лаб. трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, e-mail: marinapatysh@gmail.com

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.115.064

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

# Влияние пептидов глипролинового ряда на уровень метаболитов оксида азота и активность тканевого активатора плазминогена у крыс в норме и при метаболическом синдроме

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

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт молекулярной генетики» Российской академии наук, 123182, Москва, Россия, ул. Курчатова, д. 2

**Введение.** Короткие регуляторные пролинсодержащие пептиды могут оказывать противосвертывающие эффекты в организме и проявлять защитное действие при тромбозах.

**Цель исследования** – выявление косвенных эффектов пептидов глипролинового ряда Pro-Gly-Pro (PGP) и Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro (RERPGP) на функцию эндотелия сосудов и состояние системы фибринолиза в норме и при нарушении липидного обмена.

**Методика.** Пептиды были синтезированы в институте молекулярной генетики РАН. В экспериментах использовано 60 лабораторных белых крыс-самцов линии Wistar. Проведено 2 серии экспериментов – на здоровых крысах и животных с экспериментально воспроизведенным метаболическим синдромом (МС). Пептиды вводили интраназально в течение 7 сут через каждые 24 ч (100 мкг/кг) ежедневно. Анализ крови осуществляли через 20 и 168 ч после завершающего введения пептидов. Определяли уровни метаболитов оксида азота (NO) и активности тканевого активатора плазминогена (ТАП).

**Результаты.** Выявлены различия в действии PGP и RERPGP на исследуемые параметры у здоровых животных. В плазме крови крыс через 20 ч после семикратного введения пептида PGP установлено значительное повышение активности ТАП и метаболитов NO, которое сохранялось на протяжении 168 ч эксперимента, в то время как под влиянием RERPGP отмечалось повышение только уровня нитратов и нитритов через 168 ч после его применения. Пептид PGP также оказывал выраженные эффекты на функцию эндотелия организма и при развитии МС. Активность ТАП значительно и статистически значимо увеличивалась через 20 ч после семикратного введения пептида, эти изменения наблюдались также спустя 168 ч после применения PGP. Эти величины практически соответствовали значениям ТАП у здоровых крыс. Уровень метаболитов NO также значимо повышался при воздействии PGP на фоне МС. Сделано предположение о возможных механизмах действия пептидов на сосудистый эндотелий.

**Заключение.** Пептиды глипролинового ряда оказывали стимулирующее влияние на функцию эндотелия в организме как в норме, так и при патологии, повышая активность тканевого активатора плазминогена и концентрацию метаболитов оксида азота.

**Ключевые слова:** пептиды PGP, RERPGP; метаболический синдром; нитраты/нитриты; тканевой активатор плазминогена; функция эндотелия

**Для цитирования:** Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Шубина Т.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А. Влияние пептидов глипролинового ряда на уровень метаболитов оксида азота и активность тканевого активатора плазминогена у крыс в норме и при метаболическом синдроме. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 88-94.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.88-94

**Для корреспонденции:** Оберган Тамара Юрьевна, e-mail: tobergan@mail.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Мясоедов Н.Ф., Ляпина Л.А.; проведение эксперимента, сбор и обработка материала – Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Андреева Л.А., подготовка иллюстративного материала – Оберган Т.Ю., статистическая обработка – Андреева Л.А., Оберган Т.Ю., написание текста – Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., редактирование – Ляпина Л.А., Григорьева М.Е.; утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ, конкурс проектов 2018 года фундаментальных научных исследований Грант № 18-04-00260.

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

Поступила 25.11.2019

Принята в печать 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Obergan T.Yu.<sup>1</sup>, Grigorjeva M.E.<sup>1</sup>, Lyapina L.A.<sup>1</sup>, Shubina T.A.<sup>1</sup>, Myasoedov N.F.<sup>2</sup>, Andreeva L.A.<sup>2</sup>

## The effect of glyproline peptides on levels of nitric oxide metabolites and tissue plasminogen activator activity in healthy rats and rats with metabolic syndrome

<sup>1</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University,  
Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences,  
Kurchatova Str. 2, Moscow, 123182, Russia

Short regulatory proline-containing peptides can exert an anticoagulation effect and be protective in thrombosis.

**The aim** of this study was to identify indirect effects of glyproline peptides Pro-Gly-Pro (PGP) и Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro (RERPGP) on vascular endothelial function and the fibrinolytic system in normal and impaired lipid metabolism.

**Methods.** Peptides were synthesized at the Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences. Experiments were performed on 60 male Wistar rats divided into healthy animals and animals with experimental metabolic syndrome (MS). Peptides (100 µg/kg) were administered intranasally, once a day for 7 days. Blood tests were performed 20 h and 168 h after the last administration of the peptides. Concentrations of nitric oxide (NO) metabolites (sum plasma concentration of nitrate and nitrite) and the activity of tissue plasminogen activator (TAP) were measured.

**Results.** The effects of PGP and RERPGP on the endothelial function in healthy animals were different. Significant increases in both TAP activity and NO metabolite concentration were found in plasma 20 h after 7 PGP administrations, which persisted throughout 168 h of the experiment. Only an increase in nitrate/nitrite was observed at 168 h after the RERPGP administration. PGP also exerted pronounced effects on the endothelial function, including in MS. TAP activity was significantly increased at 20 h after 7 administrations of the peptide, and this effect remained at 168 h after the PGP administration. These values were practically similar to the TAP values in healthy rats. Concentrations of NO metabolites were also significantly increased after the PGP exposure of MS rats. Possible mechanisms for the peptide activation of vascular endothelium are discussed.

**Conclusion.** Glyproline peptides had a stimulatory effect on the endothelial function both in normal and pathological conditions by increasing the TAP activity and the concentration of NO metabolites.

**Keywords:** glyproline; PGP, RERPGP; metabolic syndrome; nitrate/nitrite; tissue plasminogen activator; endothelial function

**For citation:** Obergan T.Yu., Grigorjeva M.E., Lyapina L.A., Shubina T.A., Myasoedov N.F., Andreeva L.A. The effect of glyproline peptides on levels of nitric oxide metabolites and tissue plasminogen activator activity in healthy rats and rats with metabolic syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 88-94. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.88-94

**For correspondence:** Obergan Tamara Yurievna, senior scientific Department of Human and Animal Physiology, Laboratory Protective Blood Systems named after prof. B.A. Kudryashov, e-mail: tobergan@mail.ru

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

**Acknowledgment.** The study was supported by an RFBR grant for basic research projects 2018 (project # 18-04-00260).

**Contribution:** research concept and design – Myasoedov N.F., Lyapina L.A., performing an experiment, material collecting and processing – Lyapina L.A., Obergan T.Yu., Grigorjeva M.E., Shubina T.A., Andreeva L.A., preparation of illustrative material – Obergan T.Yu, statistical processing – Andreeva L.A., Obergan T.Yu.; writing text – Obergan T.Yu., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Shubina T.A.; text editing – Lyapina L.A., Myasoedov N.F. Approval of the final version of the article – all co-authors.

### Information about the authors:

Obergan T.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-3760-3943>

Grigorjeva M.E., <http://orcid.org/0000-0003-0469-3943>

Lyapina L.A., <http://orcid.org/0000-0002-8983-652X>

Shubina T.A., <http://orcid.org/0000-0003-1092-8382>

Myasoedov N.F., <http://orcid.org/0000-0003-1294-102X>

Andreeva L.A., <http://orcid.org/0000-0002-3927-8590>

Received 25.11.2019

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

Эндотелий сосудов участвует в регуляции многих систем организма, в том числе гемостаза, кровообращения, сосудистого тонуса, вырабатывая различные биологически активные вещества. Одно из этих веществ оксид азота (NO) служит и вазодилатором, и антиагрегантом [1]. NO в организме человека и животных образуется из аминокислоты L-аргинин при участии NO-синтаз [2, 3]. По механизму действия NO является основным стимулятором образования цГМФ. При этом в тромбоцитах уменьшается содержание кальция, который вовлекается во все фазы процесса свертывания крови. Одним из важнейших механизмов действия NO служит активирование кальциевых каналов [4]. Кроме того, NO относится к индукторам тканевого активатора плазминогена (ТАП) [5, 6]. При патологических состояниях, осложняющихся повышением свертываемости крови, наблюдается снижение синтеза NO, что отражает дисфункцию эндотелия [7]. О выработке NO в организме косвенно свидетельствует количество его метаболитов (нитратов и нитритов). В настоящее время считается, что для оценки эндотелиальной дисфункции также может быть использован тканевой активатор плазминогена (ТАП) [8], основной функцией которого является участие в процессах ферментативного фибринолиза. Комплексным заболеванием, которое характеризуется нарушениями углеводного и липидного обмена, а также гиперкоагуляцией, гипофибринолизом и депрессией (дисфункцией) эндотелия сосудов является метаболический синдром (МС) [9].

Известно, что пролинсодержащие пептиды обладают эндотелий-зависимой реакцией экскреции в кровотоке ТАП. Кроме того, короткие регуляторные пептиды оказывают антитромбоцитарный и антикоагулянтный эффекты в организме [10, 11]. Доказана защитная роль регуляторных пептидов при нарушениях функции гемостаза, сопровождающихся расстройствами углеводного и липидного обмена веществ [12].

**Цель исследования** – выявление косвенных эффектов пептидов глипролинового ряда Pro-Gly-Pro (PGP) и Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro (RERPGP) на функцию эндотелия сосудов по выработке метаболитов NO (нитратов и нитритов) и состояние системы фибринолиза по активности тканевого активатора плазминогена.

## Методика

Исследование выполнено на 60 лабораторных белых крысах-самцах линии Wistar с массой тела 230–250 г, полученных из питомника лабораторных животных

«Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Все эксперименты были проведены с соблюдением этических принципов работы с животными в соответствии с «Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (ETS № 123, Страсбург, 18.03.1986 г. с приложением от 15.06.2006) и «Правилами надлежащей лабораторной практики» (приказ МЗ РФ № 199н от 01.04.2016).

Исследуемые в работе пептиды PGP и RERPGP были синтезированы в институте молекулярной генетики РАН. Для инъекции препаратов животным навеску каждого из пептидов ежедневно растворяли в физиологическом растворе, затем вводили животным (доза 100 мкг/кг в объеме 20 мкл) интраназально в течение 7 сут через каждые 24 ч.

Проведено 2 серии экспериментов – на здоровых крысах и животных с экспериментально воспроизведенным метаболическим синдромом (МС). 30 здоровых крыс (*1-я серия экспериментов*) были разделены на 3 группы по 10 животных в каждой: контроль (группа 1), введение пептидов PGP (группа 2) или RERPGP (группа 3). Контрольные животные получали по 20 мкл физиологического раствора.

Для проведения *2-й серии экспериментов* использовали модель метаболического синдрома [11]. Метаболические нарушения у животных индуцировали высококалорийной диетой (ВКД), включающей избыток насыщенных жирных кислот, холестерина и углеводов. Калорийность ВКД составляла не менее 3894 ккал/кг, т.е. 132% от калорийности стандартного гранулированного корма (2950 ккал/кг). Ранее нами было установлено, что содержание крыс на ВКД приводит к развитию у животных МС, т.е. увеличению избыточной массы тела, нарушениям липидного и углеводного обмена, а также к нарушениям нормального функционирования системы гемостаза. Через 6 нед ВКД, животные были разделены на 2 группы: в 1-й группе крысам с МС вводили физиологический раствор («МС + NaCl»,  $n=10$ ), крысам 2-й – пептид PGP («МС + PGP»,  $n=10$ ) в дозе 100 мкг/кг, интраназально, 7-кратно через каждые 24 ч. Дополнительно использовали группу здоровых интактных животных («Здоровые»,  $n=10$ ).

Через 20 и 168 ч после 7-го введения пептидов брали образцы крови от каждого животного. В богатой тромбоцитами плазме крови оценивали функцию эндотелия по уровню метаболитов NO (нитратов и нитритов) и состояние системы фибринолиза по активности тканевого активатора плазминогена (ТАП). Суммарную концентрацию нитратов и нитритов измеряли

методом Грисса в реакции азосочетания N-(нафтил) этилендиамина с сульфаниламидом в присутствии азотистой кислоты. Далее для реакции восстановления нитратов в нитриты использовали хлорид ванадия [3]. Величину оптической плотности измеряли на сканере Multiskan FX (Labsystem, США). Активность ТАП оценивали на стандартных пластинах фибрина по разнице зон лизиса на прогретых при 86 °С и непрогретых пленках [13].

Статистический анализ данных осуществляли, используя пакет статистических программ Statistica 8 (StatSoft Inc., США), а также графических программ Microsoft Excel. Оценку нормальности эмпирических распределений проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Дальнейшую обработку данных проводили с применением непараметрических методов Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни. Полученные результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

В 1-й серии экспериментов при многократном интраназальном введении пептидов PGP и RERPGP здоровым крысам через 20 ч после последней процедуры установлено, что только пептид PGP способствовал статистически значимому повышению активности ТАП (на 201%), сочетающемуся с увеличенной продукцией в крови метаболитов NO (на 27%) по сравнению с соответствующим контролем. Через 168 ч после введения PGP – активирующее действие пептида на сосудистый эндотелий сохранялось. При применении RERPGP наблюдалось повышение уровня метаболитов NO только через 168 ч, при этом активность ТАП не изменялась в течение всего эксперимента (см. таблицу).

Следовательно, у здоровых крыс пептид RERPGP изменял функциональное состояние сосудистой стенки по продуктам NO лишь в отдаленные сроки, в то время как введение пептида PGP приводило к зна-

чимому изменению обоих параметров (NO и ТАП), как сразу после многократного введения, так и на протяжении недели после отмены применения пептида.

Поскольку в эксперименте на здоровых животных выраженные эффекты выявлены у PGP, во 2-й серии, у животных с нарушением липидного и углеводного метаболизма, представляло интерес изучить влияние именно этого пептида.

Через 6 нед потребления животными ВКД, выявлялись нарушения в функционировании системы гемостаза и сосудистой стенки. Как видно на рис. 1, у контрольных крыс группы 1 (МС + NaCl) наблюдалось снижение активности ТАП (на 53%) и уровня метаболитов NO (на 45%) по сравнению со здоровыми животными. Это соответствует данным о развитии у животных с МС признаков дисфункции эндотелия и угнетении фибринолитической активности крови [8].

Семикратное введение PGP животным с МС (рис. 1, а) приводило к значительному увеличению активности ТАП как через 20 ч, так и через 168 ч после 7-го применения пептида на 152% и 133% соответственно ( $p < 0,01$  в обоих случаях) по сравнению с контролем («МС + NaCl»). Эти величины практически соответствовали значениям ТАП у здоровых крыс. Заслуживает внимания тот факт, что уровень метаболитов NO через 20 ч после воздействия PGP статистически значимо превышал этот показатель в контроле на 32%. Этот эффект пептида через 168 ч не только сохранялся, но даже усиливался и составлял 144% от контрольных значений (рис. 1, б).

### Обсуждение

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить вероятную взаимосвязь между уровнем ТАП и метаболитами NO. Так, нами установлено, что эти параметры снижаются при развитии метаболических нарушений. Пептидные препараты глипролинового ряда, обладающие антикоагулянтным, фибринолитическим и антитромбоцитарным эффектом [11, 12], вмешиваясь

Таблица

**Изменение активности тканевого активатора плазминогена (ТАП) и уровня метаболитов NO у здоровых крыс в разные сроки после семикратного введения PGP и RERPGP в ежедневной дозе 100 мкг/кг**

Условия опыта	Через 20 ч после 7-го введения		Через 168 ч после 7-го введения	
	ТАП, мм <sup>2</sup>	NO, мкМ	ТАП, мм <sup>2</sup>	NO, мкМ
NaCl (контроль)	12,0 $\pm$ 0,7	23,7 $\pm$ 1,21	12,2 $\pm$ 0,6	20,1 $\pm$ 1,37
PGP	36,1 $\pm$ 0,6*	30,1 $\pm$ 1,03*	35,5 $\pm$ 0,5*	28,0 $\pm$ 1,58*
RERPGP	12,3 $\pm$ 0,8	25,8 $\pm$ 1,25	11,8 $\pm$ 0,5	24,8 $\pm$ 1,42*

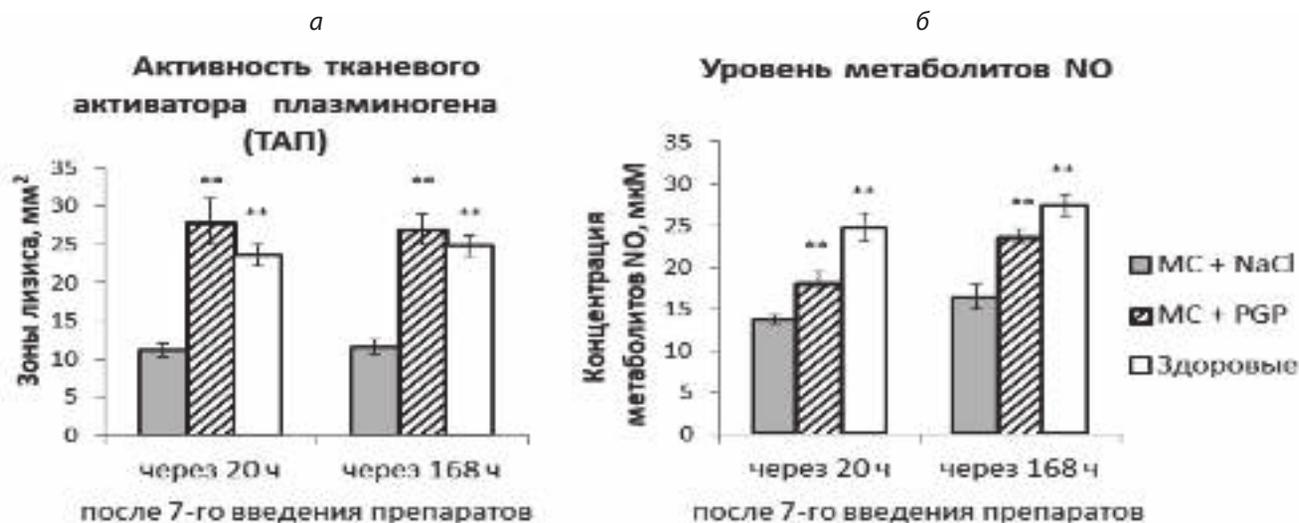
**Примечание.** ТАП – активность тканевого активатора плазминогена, NO – уровень метаболитов (нитратов и нитритов) оксида азота; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе.

в процессы фибринолиза и в функционирование сосудистого эндотелия, повышают не только активность ТАП, но и уровень метаболитов NO. Оксид азота синтезируется не только из L-аргинина NO-синтазами (NOSs), но и из его инертных метаболитов, нитритов и нитратов. Было показано [14], что длительный диетический дефицит нитрита/нитрата индуцирует развитие МС у мышей. Использование такой диеты в течение 3 мес вызывало висцеральное ожирение, дислипидемию и непереносимость глюкозы, в течение 18 мес – провоцировало увеличение массы тела, гипертензию, инсулинорезистентность и нарушение эндотелийзависимой вазодилатации при воздействии ацетилхолина, а в течение 22 мес – приводило к смерти из-за развития сердечно-сосудистых заболеваний. В то же время указанные отклонения устранялись одновременной добавкой к пище нитрата натрия, что было связано с эндотелиальной регуляцией NOS. Это свидетельствовало о том, что длительный дефицит нитритов/нитратов в рационе питания приводит к возникновению МС, сопровождающегося эндотелиальной дисфункцией и развитию в последующем сердечно-сосудистых заболеваний. Таким образом, это указывает на новую патогенетическую роль экзогенной системы производства NO при МС и его сосудистых осложнениях.

Рассматривая жировую ткань в качестве эндокринного органа, исследователи отмечают [15], что инги-

битор активатора плазминогена-1 (ИАП-1), присутствующий в жировой ткани (адипоцитарный), выделяется в кровоток параллельно с увеличением жировой массы и отрицательно влияет на метаболизм в органах и тканях, в том числе и в сосудистой стенке. Поскольку ИАП-1 также является основным ингибитором ТАП, он индуцирует фибриногенез путем подавления внутрисосудистого и тканевого фибринолиза. Поэтому в наших исследованиях мы наблюдали снижение активности ТАП у крыс с МС, что, возможно, было обусловлено повышением ИАП-1. Под влиянием исследуемых пептидов активность ТАП усиливалась, что свидетельствовало о нормализации фибринолиза в условиях МС. При этом одновременно повышалась концентрация нитратов/нитритов, что позволяет нам считать глипролиновые пептиды перспективными фибринолитическими лекарственными средствами.

Обсуждая взаимосвязь МС с системой гемостаза и акцентируя внимание на функции эндотелия, отмечаем, что эндотелийзависимая вазодилатация нарушается при МС. Это в основном опосредовано сниженной экспрессией вазодилататоров (оксида азота и простациклина) с сопутствующим повышением вазоконстрикторов (эндотелина-1, ангиотензина II и тромбоспандина A2). Перекрестное взаимодействие между активированным эндотелием и тромбоцитами приводит к протромботическому порочному циклу. Также при МС наблюдается



**Рис. 1.** Влияние 7-кратного интраназального введения пептида PGP на активность ТАП (а) и уровень метаболитов NO (б) в плазме крови животных с метаболическим синдромом в зависимости от времени введения.

По оси абсцисс – активность ТАП и уровень метаболитов NO через 20 ч и 168 ч после последнего введения препаратов. \*\* –  $p < 0,01$  по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе («МС + NaCl»).

усиленная коагуляция в сочетании с нарушением фибринолиза. Это проявляется высоким уровнем фибриногена, ИАП-1, эндотелиальной дисфункцией, повышением вязкости крови. Вопрос о взаимосвязи ИАП-1 и активности ТАП при МС требует дальнейшего изучения.

В метаболизме органов и тканей важную роль играет аминокислота пролин, входящая в состав глипролиновых пептидов [16]. Пролин и гидроксипролин – самые широко распространенные аминокислоты в белках коллагена. Пролин в сочетании с другой аминокислотой лизин и витамином С способен снижать концентрацию холестерина ЛПНП. Прием этих аминокислот эффективен при сердечно-сосудистых заболеваниях [17].

Мы предполагаем, что возможный механизм стимулирующего влияния на сосудистый эндотелий исследованных нами пептидов глипролинового ряда обусловлен их структурными особенностями, а именно, наличием двух аминокислотных остатков пролина в составе молекул PGP и RERPGP.

### Заключение

На основании экспериментальных исследований установлено, что пептиды глипролинового ряда – PGP и RERPGP оказывали стимулирующее действие на фибринолиз и функцию эндотелия как в норме, так и при патологии. Об этом свидетельствовало повышение активности тканевого активатора плазминогена и уровня метаболитов NO – нитратов и нитритов. Выявлено отличие в действии PGP и RERPGP у здоровых животных. В плазме крови крыс через 20 ч после интраназального семикратного введения пептида PGP установлено значительное возрастание активности ТАП и уровня метаболитов NO, которое сохранялось на протяжении 7 сут после отмены введения пептида, в то время как под влиянием RERPGP отмечался отсроченный эффект повышения только уровня нитратов и нитритов через 168 ч после последнего введения пептида. PGP также имел устойчивые выраженные эффекты в условиях метаболических нарушений у крыс, повышая активность фибринолитической системы и улучшая функцию эндотелия сосудов. Таким образом, пептид PGP защищал организм животных от прогрессирования дисфункции эндотелия и нарушения фибринолиза при МС.

### Литература

(п.п. 1; 4-9; 12; 14-17 см. References)

1. Бабичев А.В. Роль эндотелия в механизмах гемостаза. *Педиатр.* 2013; 4(1): 122-7.
2. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови человека. *Клин. лаб. диагн.* 2005; 6: 15-8.

10. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С. Эпигенетическое действие регуляторных пептидов на цитокиновый профиль и систему гемостаза. *Вестник гематологии.* 2013; 9(2): 29-3.
11. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Пептидная регуляция метаболических процессов при гиперхолестеринемических состояниях организма. *Известия РАН. Серия биологическая.* 2015; (6): 634-44. <https://doi.org/10.7868/S0002332915060065>
13. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови.* М.: Адвансэд Солюшнз; 2012.

### References

1. Veceli Dalla Sega F., Aquila G., Fortini F., Vaccarezza M., Secchiero P., Rizzo P., Campo G. Context-dependent function of ROS in the vascular endothelium: The role of the Notch pathway in shear stress. *Biofactors.* 2017; 43(4): 475-85. <https://doi.org/10.1002/biof.1359>
2. Babichev A.V. The role of endothelium in the mechanisms of hemostasis. *Pediatr.* 2013; 4(1): 122-7. (in Russian)
3. Metelskaya V.A., Gumanova N.G. Screening method for determining the level of nitric oxide metabolites in human serum. *Klinicheskaya i laboratornaya diagnostika.* 2005; 6: 15-8. (in Russian)
4. Flavahan N.A. In the field of development – a new paradigm for understanding vascular disease. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 2017; 69(5): 248-63.
5. Kraan J., Srijbos M.H., Sieuwerts A.M. A new approach for rapid and reliable enumeration of circulating endothelial cells in patients. *J. Thromb. Haemost.* 2012; 10: 931-39.
6. Vasilijevi A., Buzadi B., Kora A., Petrovi V., Jankovi A., Kora B. Beneficial effects of L-arginine-nitric oxide-producing pathway in rats treated with alloxan. *J. Physiol.* 2007; 584(3): 921-33.
7. Brzoska T., Tanaka-Murakami A., Suzuki Y., Sano H., Kanayama N., Urano T. Endogenously generated plasmin at the vascular wall injury site amplifies lysine binding site-dependent plasminogen accumulation in microthrombi. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0122196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122196>
8. Shayo S.C., Kawade S., Ogiso K., Yoshihiko N. Strategies to ameliorate endothelial dysfunction associated with metabolic syndrome, where are we? *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2019; 13(3): 2164-9. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.05.005>
9. Dentali F., Squizzato A., Ageno W. The metabolic syndrome as a risk factors for venous and arterial thrombosis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 2009; 35(5): 451-7. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1234140>
10. Kuznik B.I., Chavinson V.Ch., Tarnonskaya S.I., Linkova N.S. Epigenetic effect of regulatory peptides on cytokine profile and hemostatic system. *Vestnik Gematologii.* 2013; 9(2): 29-33. (in Russian)
11. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Oborgan T.Yu., Shubina T.A., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. Peptide regulation of metabolic processes under hypercholesterolemia conditions of an organism. *Izvestiya Rossiyskoy Akademii Nauk. Seriya Biologicheskaya.* 2015; (6): 634-44. (in Russian) <https://doi.org/10.7868/S0002332915060065>
12. Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Oborgan T.Y., Shubina T.A., Andreeva L.A. Mechanisms for glyproline protection

- in hypercholesterolemia. *Pathophysiology*. 2016; 23(1): 27-3. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2015.11.001>
13. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the functional state of the anticoagulation system of blood. [Teoreticheskie i prakticheskie voprosy izucheniya funktsionalnogo sostoyaniya protivosvertyvayushchey sistemy krovi]*. Moscow; Advansed Solyushnz; 2012. (in Russian)
  14. 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. <https://doi.org/10.1254/fpj.151.148>
  15. Kaji H. Adipose tissue-derived plasminogen activator inhibitor-1 function and regulation. *Compr. Physiol*. 2016; 6(4): 1873-96. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160004>
  16. 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. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0715-Z>
  17. Ivanov V., Roomi M., Kalinovsky T., Niedzwiecki A., Rath M. Anti-atherogenic effects of a mixture of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, cysteine, and green tea phenolics in human aortic smooth muscle cells. *J. Cardiovascular Pharmacol*. 2007; 49(3): 140-45. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3180308489>

#### Сведения об авторах:

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

**Григорьева Марина Евгеньевна**, канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова;

**Ляпина Людмила Анисимовна**, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова;

**Шубина Татьяна Александровна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова;

**Мясоедов Николай Федорович**, доктор хим. наук, акад. РАН, руководитель отдела химии физиологически активных веществ ФГБUN «Институт молекулярной генетики РАН»;

**Андреева Людмила Александровна**, зав. сектором регуляторных пептидов отдела химии физиологически активных веществ ФГБUN «Институт молекулярной генетики РАН».

© Коллектив авторов, 2020

УДК 615.32. 615.21

Лупанова И.А., Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Мартынчик И.А., Колхир В.К., Трумпе Т.Е., Звездина Е.В.

## Сравнительная оценка нейротропной активности экстрактов котовников кошачьего и крупноцветкового

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»,  
117216, Москва, Россия, ул. Грина, д. 7, стр. 1

Перспективными источниками биологически активных веществ (БАВ), обладающих нейротропной активностью, являются представители рода *Nepeta* L. – котовник кошачий (*Nepeta cataria* L.) и котовник крупноцветковый (*Nepeta grandiflora* Bieb.). **Цель** – изучение в эксперименте *in vivo* и *in vitro* фармакологической активности экстрактов и фракций БАВ котовника кошачьего и котовника крупноцветкового.

**Методика.** Для сравнительной оценки нейротропной активности экстрактов котовников кошачьего (*Nepeta cataria* L.) и крупноцветкового (*Nepeta grandiflora* Bieb.) проведен биологический скрининг образцов, обладающих дофаминергической активностью с применением тирозингидроксилазной специфической ферментной биотест-системы в условиях *in vitro*. Определение параметров острой токсичности и противовоспалительной активности экстракта проводили в экспериментах *in vivo*. Для оценки острой токсичности экстракта по методу Кербера использованы белые нелинейные мыши-самцы. Экстракты вводили животным внутривенно в дозах 500, 1000, 1500 и 2000 мг/кг. Изучали влияние курсового (3-4 сут) введения выбранных по результатам скрининга экстрактов (дозы 10 и 100 мг/кг) на центральную нервную систему и поведение животных на моделях «приподнятый крестообразный лабиринт» и «хлоралгидратный сон». Препаратом сравнения служил экстракт пустырника (100 мг/кг).

**Результаты.** В результате проведенных скрининговых исследований в условиях опытов *in vitro* с применением специфической ферментной биотест-системы на основе тирозингидроксилазы выявлена дофаминергическая активность у котовника крупноцветкового экстракта сухого и котовника кошачьего экстракта сухого. При однократном введении экстракты не приводили к гибели животных, изменению внешнего вида и поведенческих реакций мышей. В соответствии с классификацией токсичности химических веществ по ГОСТ 12.1.007-76 экстракты являются малотоксичными веществами. В дозах 10 и 100 мг/кг экстракты оказывали статистически значимое седативное действие, снижали нервно-эмоциональное напряжение. Седативное действие проявлялось в ускорении процесса засыпания и увеличении продолжительности сна.

**Заключение.** Выявлена дофаминергическая активность экстрактов котовника крупноцветкового экстракта сухого и котовника кошачьего экстракта сухого. Экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового являются малотоксичными веществами, обладают в опытах *in vivo* выраженным седативным действием, снижают нервно-эмоциональное напряжение. Экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового перспективны для дальнейшего изучения.

**Ключевые слова:** котовник кошачий; котовник крупноцветковый; сухой экстракт; специфические ферментные биотест-системы; нейротропная активность; седативное действие; продолжительность сна; латентный период сна

**Для цитирования:** Лупанова И.А., Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Мартынчик И.А., Колхир В.К., Трумпе Т.Е., Звездина Е.В. Сравнительная оценка нейротропной активности экстрактов котовников кошачьего и крупноцветкового. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(4): 95-100

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.95-100

**Для корреспонденции:** Лупанова И.А., e-mail: iriss86@mail.ru

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

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

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Ферубко Е.В., Лупанова И.А., Колхир В.К., Трумпе Т.Е.; сбор и обработка материала – Лупанова И.А., Курманова Е.Н., Мартынчик И.А., Звездина Е.В.; статистическая обработка – Лупанова И.А., Курманова Е.Н.; написание текста – Лупанова И.А., Курманова Е.Н.; редактирование – Ферубко Е.В.

Поступила 08.06.2020

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Lupanova I.A., Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Martintchik I.A., Kolkhir V.K., Trumpe T.E., Zvezdina E.V.

**Comparison studies of neurotropic activity of the nepeta cataria and nepeta grandiflora extracts**All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants,  
Grin str. 7, bild. 1, Moscow, 117216, Russia

Promising sources of biologically active substances (BAS) with neurotropic activity are representatives of the genus *Nepeta* L. – cat's cat (*Nepeta cataria* L.) and large-flowered cat's cat (*Nepeta grandiflora* Bieb.).

**The aim of the work** is to study the pharmacological activity of extracts and fractions of BAS Catnip and large-flowered Catnip with the use of specific enzyme Biotest systems in *in vitro* experiments and using biological models on laboratory animals.

**Method.** For a comparative assessment of the neurotropic activity of cat extracts (*Nepeta cataria* L.) and large-flowered (*Nepeta grandiflora* Bieb.) biological screening of samples with dopaminergic activity was performed using a tyrosine hydroxylase-specific enzyme Biotest system in *in vitro* experiments. The parameters of acute toxicity and anti-inflammatory activity of the extract were determined. When studying the acute toxicity of the extract using the Kerber method, white non-linear male mice in the number of 30 individuals were used. Extracts were administered to animals intragastrically in doses of 500, 1000, 1500 and 2000 mg/kg. We studied the effect of course (3-4 days) administration of selected extracts based on the results of screening on the Central nervous system and animal behavior at doses of 10 and 100 mg / kg on the models «raised cruciform labyrinth» and «chloral hydrate sleep». Comparison drug-motherwort extract tablets at a dose of 100 mg/kg.

**Results.** As a result of screening studies in *in vitro* experiments based on tyrosine hydroxylase, dopaminergic activity was detected in the cat's large-flowered dry extract and cat's dry cat extract. When administered once, the extracts did not lead to the death of animals, changes in the appearance and behavioral reactions of mice were not observed. According to the chemical toxicity classification according to GOST 12.1.007-76, extracts are low-toxic substances. In doses of 10 mg / kg and 100 mg / kg, these extracts have a significantly pronounced sedative effect, reduce nervous and emotional tension. The sedative effect is shown in improving sleep and increasing the duration of sleep.

**Conclusions.** Dopaminergic activity was detected in the cat's large-flowered dry extract and the cat's dry cat extract. Extracts of Catnip and large-flowered Catnip are low-toxic substances, have a pronounced sedative effect in experiments *in vivo*, reduce nervous and emotional tension. Extracts of Catnip and large-flowered Catnip are promising for further study.

**Keywords:** *Nepeta cataria* and *Nepeta grandiflora* extracts, specific *in vitro* enzyme biotest systems *in vitro*, neurotropic activity, antianxiety effect, sleep duration, the latent period of sleep

**For citation:** Lupanova I.A., Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Martintchik I.A., Kolkhir V.K., Trumpe T.E., Zvezdina E.V. Comparison studies of neurotropic activity of the nepeta cataria and nepeta grandiflora extracts. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2020; 64(4): 95-100. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.95-100

**For correspondence:** Lupanova I.A., Ph.D. (Biol.), Head of the Center of Medicine, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow), e-mail: iriss86@mail.ru

**Contribution:** concept and design of research – Ferubko E.V., Lupanova I.A., Kolkhir V.K., Trumpe T.E.; material collection and processing – Lupanova I.A., Kurmanova E.N., Martynchik I.A., Zvezdina E.V.; statistical processing – Lupanova I.A., Kurmanova E.N.; text writing – Lupanova I.A., Kurmanova E.N.; editing – Ferubko E.V.

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

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

**Information about the authors:**Ferubko E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1949-2597>Lupanova I.A., <https://orcid.org/0000-0001-8183-2877>

Received 08.06.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

**Введение**

Профилактика стресса и стресс-индуцированных процессов является важной задачей современной медицины. В настоящее время для профилактики и лечения стресса используются психотропные препараты различных фармакологических групп: адаптогены, седативные средства, анксиолитики (транквилизаторы), антидепрессанты и нейролептики [1, 2].

По данным ВОЗ до 80% населения планеты предпочитают лечиться лекарственными средствами природного растительного происхождения, в связи с чем представляет интерес поиск лекарственных растений, снижающих нервно-эмоциональное напряжение, обладающих низкой токсичностью и не уступающих по выраженности фармакологического эффекта совре-

менным синтетическим препаратам. Перспективными источниками биологически активных веществ (БАВ), обладающих нейротропной активностью, являются представители рода *Nepeta* L. – котовник кошачий (*Nepeta cataria* L.) и котовник крупноцветковый (*Nepeta grandiflora* Vieb.). Известно, что непетолактоны, содержащиеся в эфирном масле из надземной части этих растений, обладают анксиолитической и седативной активностью [3].

**Цель исследования** – изучение фармакологической активности экстрактов и фракций БАВ котовника кошачьего и котовника крупноцветкового с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro* и с использованием биологических моделей на лабораторных животных для создания новых эффективных лекарственных растительных препаратов.

### Методика

Объекты исследования: сухие очищенные экстракты котовника кошачьего (СЭКК) и котовника крупноцветкового (СЭККр), бутанольные фракции котовника кошачьего (БФКК) и котовника крупноцветкового (БФККр), полученные сотрудниками Центра химии и фармацевтической технологии ФГБНУ ВИЛАР. Препаратом сравнения выбран пустырника экстракт (ЗАО «ВИФИТЕХ»).

Скрининг дофаминергической активности объектов исследования проводили с использованием специфической тирозингидроксилазной (ТГ) биотест-системы *in vitro*. L-тирозин, 3-окси-6-метил-2-этил-пиридина гидрохлорид, 6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптерин – реактивы фирмы «Merck KGaA» (Германия). Тирозингидроксилазу получали из гомогената лейкоцитов крови кроликов «Шиншилла», содержащихся в стандартных условиях вивария ФГБНУ ВИЛАР.

Прямой спектрофотометрический метод определения скорости ТГ реакции основан на измерении прироста поглощения для 335 нм [4]. Для сравнительной оценки непосредственного действия образцов на скорость ТГ реакции использовали данные скоростей реакций, полученные при оптимальных концентрациях изучаемых веществ (3,3 и 6,6 мкг/мл).

Фармакологические исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016, Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012 г.) и

в соответствии с Федеральными законами от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ (ред. от 28.11.2018 г.) «Об обращении лекарственных средств». Исследования одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР (протоколы № 19, № 24 от 07.10.2019 г. и от 20.01.20 г.).

Определение параметров острой токсичности проводили по методу Кербера [5]. В эксперименте использованы белые нелинейные мыши в количестве 54 особи обоего пола, массой 20–22 г, в группах по 6 животных (8 опытных групп и 1 контрольная). Экстракты вводили животным внутрижелудочно в дозах 200 мг/кг, 500 мг/кг, 1000 мг/кг, 1500 мг/кг и 2000 мг/кг. Экстракт котовника кошачьего и экстракт котовника крупноцветкового растворяли в воде очищенной. Контрольной группе животных вводили внутрижелудочно воду очищенную в эквивалентном объеме. Длительность наблюдения за лабораторными животными составила 14 сут. В ходе эксперимента проведено наблюдение за поведением мышей, внешним видом, двигательной активностью, реакцией на внешние раздражители.

Изучение влияния курсового (3–4 сут) введения экстрактов котовника кошачьего и котовника крупноцветкового на моделях «приподнятый крестообразный лабиринт» и «хлоралгидратный сон» [6] проводили на белых нелинейных мышах массой 18,0–22,0 г в количестве 48 особей.

Животные были разделены на 6 групп по 8 особей: 1-я группа – контрольные животные, 2-я и 3-я – животные, которые получали экстракт котовника кошачьего 10 мг/кг и 100 мг/кг соответственно, в 4-й и 5-й группах животные получали экстракт котовника крупноцветкового 10 и 100 мг/кг соответственно. Животные, которые получали препарат сравнения в дозе 100 мг/кг – 6-я группа. Экстракт котовника кошачьего и экстракт котовника крупноцветкового растворяли в воде очищенной. Экстракт пустырника суспендировали в 1% крахмальной взвеси. Контрольной группе животных вводили внутрижелудочно воду очищенную. На 3-и сут эксперимента через 30 мин после введения препаратов было изучено влияние экстракта котовника кошачьего и экстракта котовника крупноцветкового на поведение мышей в условиях модели «крестообразного приподнятого лабиринта» с открытыми и замкнутыми коридорами. Эксперимент проводили по общепринятой методике: животных помещали в центр лабиринта и в течение 3 мин наблюдали за их передвижениями. Анксиолитический эффект подтверждался более длительным пребыванием животных на открытой доске лабиринта, по сравнению с контролем.

На 4-е сут эксперимента через 30 мин после введения препаратов и 1% крахмального клейстера было изучено снотворное действие экстракта котовника кошачьего и экстракта котовника крупноцветкового с использованием хлоралгидрата в качестве снотворного анализатора. Хлоралгидрат в дозе 350 мг/кг вводили мышам после внутривенного введения исследуемых экстрактов. Время засыпания отмечено по боковому положению животных. Время пробуждения отмечено по принятию животными обычной позы при открытых глазах и груминге. Период наблюдения продолжительности сна – 4 ч.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ статистического анализа Statistica 10,0 (StatSoft, США). Для оценки значимости отличий между выборками с распределением, приближающимся к нормальному, использовался *t*-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости *p* при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Данные представлены в виде  $M \pm m$  [7].

Работа выполнена в соответствии с планом НИР, шифр 0576-2019-0009 «Проведение доклинических исследований отдельных фракций, субстанций и лекар-

ственных препаратов из лекарственного растительного сырья».

### Результаты и обсуждение

Для скрининга БАВ из лекарственного растительного сырья целесообразно применение специфических ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro*. Тирозингидроксилазный тест *in vitro* [7] позволяет специфически выявлять вещества, обладающие непосредственным средством к дофаминэргической нейромедиаторной системе. Это обусловлено тем, что в тирозингидроксилазе и дофаминовых рецепторах имеются одинаковые места «узнавания», обеспечивающие избирательное связывание со специфическими лигандами. Поэтому тирозингидроксилаза может использоваться в качестве модели «узнающих» сайтов дофаминовых рецепторов для выявления БАВ с указанной активностью. Используемая в данной работе ферментная биотест-система входит в состав Уникальной научной установки ФГБНУ ВИЛАР «Биологические коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС)».

Результаты определения прямого влияния образцов на скорость ТГ и реакций *in vitro* представлены в **таблице 1**. Для удобства оценки влияния веществ на активность ферментов в условиях опытов *in vitro* результаты представлены в процентах от контроля.

Из результатов, представленных в **табл 1**, следует, что образец бутанольной фракции котовника кошачьего не оказывал значимого действия на активность тирозингидроксилазы, что может быть связано с высоким содержанием спирта в образце. Остальные образцы в концентрациях 3,3 и 6,6 мг/мл оказывали непосредственное статистически значимое угнетающее действие на активность ТГ реакции, сравнимое с действием экстракта пустырника. Так как ТГ является частью дофаминовой нейромедиаторной системы, средство БАВ, содержащихся в исследуемых экстрактах котовников и пустырника к этому ферменту, указывает на существенную роль дофаминовой нейромедиаторной системы в молекулярном механизме действия этих соединений. Сильнее всего ингибировали скорость ТГ реакции экстракт пустырника в обеих концентрациях и котовника кошачьего экстракт сухой в концентрации 6,6 мг/мл, что свидетельствует об их дофаминергических свойствах.

При изучении острой токсичности экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового гибели животных во всех группах не вызвали, изменение внешнего вида и поведенческих реакций мышей не наблюдалось. Так как гибели животных в течение всего

Таблица 1

**Влияние объектов исследования в сравнении с дофамином на скорость тирозингидроксилазной реакции *in vitro***

Объект исследования / концентрации		Тирозингидроксилазная СФБТС	
		мкмоль/мин на мг белка	%
Контроль	-	11,9±0,49	100
СЭКК	3,3 мг/мл	9,5±0,50*	80
	6,6 мг/мл	7,7±0,40*	65
БФКК	3,3 мг/мл	12,3±0,55	103
	6,6 мг/мл	12,2±0,65	103
СЭККр	3,3 мг/мл	8,3±0,47*	70
	6,6 мг/мл	9,5±0,45*	80
БФККр	3,3 мг/мл	9,5±0,43*	80
	6,6 мг/мл	9,4±0,45*	79
Пустырник	3,3 мг/мл	7,1±0,34*	60
	6,6 мг/мл	7,0±0,33*	59

**Примечание.** \* – статистическая значимость отличий от контроля при  $p < 0,05$ . СЭКК и СЭККр – сухие экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового соответственно. БФКК и БФККр – бутанольные фракции котовника кошачьего и котовника крупноцветкового. ТГ СФБТС – тирозингидроксилазная специфическая ферментная биотест-система

периода наблюдения отмечено не было, не удалось установить  $LD_{50}$  исследуемых экстрактов. Таким образом, по результатам изучения острой токсичности очищенный экстракт котовника кошачьего и сухой очищенный экстракт котовника крупноцветкового относятся к малотоксичным веществам, в соответствии с классификацией токсичности химических веществ по ГОСТу 12.1.007-76 [8].

Для данных образцов мы изучали влияние курсового (3-4) введения экстракта котовника кошачьего и котовника крупноцветкового на моделях «приподнятый крестообразный лабиринт» и «хлоралгидратный сон» у мышей.

Результаты экспериментов на моделях «приподнятый крестообразный лабиринт» и «хлоралгидратный сон» представлены в **таблицах 2 и 3**.

По результатам проведенного эксперимента установлено, что изучаемые экстракты котовника кошачьего (10 мг/кг и 100 мг/кг) и котовника крупноцветкового (10 мг/кг и 100 мг/кг) удлиняют время пребывания животных на открытой доске по сравнению с контролем в 1,62 и 2 раза и в 1,8 раза соответственно, проявляя, таким образом, статистически значимо выраженный противотревожный эффект (**табл. 2**).

Препарат сравнения экстракт пустырника (100 мг/кг) удлиняет время пребывания животных на открытой доске в 2,3 раза (**табл. 2**).

Результаты экспериментов по оценке влияния исследуемых растительных препаратов на параметры сна показали (**табл. 3**), что изучаемые экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового в исследуемых дозах вызывают выраженное сокращение латентного периода сна, облегчают засыпание (в 2,3 и 2,15 и 2,26 и 2,7 раза соответственно) и существенно увеличивают продолжительность сна (на 27 %, 17% и 26,7%, 24,3% соответственно) по сравнению с контролем.

Таким образом, оба вида исследуемых экстрактов обнаруживают, аналогично пустырнику, статистически значимо выраженное седативное и противотревожное действие.

Итак, в результате первичного биологического скрининга с применением тирозингидроксилазной специфической ферментной биотест-системы в условиях опытов *in vitro* было установлено, что наибольшей нейромедиаторной активностью обладали сухие очищенные экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового по сравнению с бутанольными фракциями указанного растительного сырья. При дальнейшем изучении данных экстрактов с помощью фармакологических методов на животных было доказано их седативное и противотревожное действие. Сухие очищенные экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового малотоксичны и перспективны для дальнейшего изучения и создания на их основе современных растительных лекарственных препаратов, снижающих нервно-эмоциональное напряжение.

Таблица 2

**Изучение влияния котовника крупноцветкового и котовника кошачьего на поведение мышей на модели «крестообразный приподнятый лабиринт»**

Вариант опыта <i>n</i> = 8	Время на открытой доске, секунды
Контроль	17,5±2,36
СЭККр 10 мг/кг	31,6±1,29*
СЭККр 100 мг/кг	31,3±2,18*
СЭКК 10 мг/кг	28,4±4,02
СЭКК 100 мг/кг	36,5±3,98*
Пустырник 100 мг/кг	40,0±1,30*

**Примечание.** \* - отличия от контроля значимы,  $p < 0,05$ .

Таблица 3

**Влияние котовника крупноцветкового и котовника кошачьего на параметры сна, вызванного хлоралгидратом**

Вариант опыта, <i>n</i> =8	Время латентного периода (мин)	Время сна (мин)
Контроль	5,4±2,5	112,7±28,19
СЭКК 10 мг/кг	2,3±0,05*	143,0±2,07*
СЭКК 100 мг/кг	2,5±0,03*	132,0±16,20*
СЭККр 10 мг/кг	2,4±0,08*	142,8±1,06*
СЭККр 100 мг/кг	1,9±0,04*	140,1±3,79*
Пустырник 100 мг/кг	2,1±0,07*	145,0±12,51*

**Примечание.** \* – отличия от контроля статистически значимы при  $p < 0,05$ .

### Выводы

В результате проведенных скрининговых исследований в условиях опытов *in vitro* на основе тирозингидроксилазы была выявлена дофаминергическая активность у котовника крупноцветкового экстракта сухого и котовника кошачьего экстракта сухого. Эффект данных образцов был сопоставим с препаратом сравнения.

В результате проведенных фармакологических исследований в условиях опытов *in vivo* на лабораторных животных установлено, что экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового оказывают статистически значимо выраженное седативное и противотревожное действие

Экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового по результатам проведенных исследований перспективны для создания новых эффективных лекарственных растительных препаратов.

### Литература

1. Аляутдин, Р.Н. *Фармакология*. Москва; ГЭО-ТАР. МЕДИА. 2008.
2. Аляутдин, Р.Н. М.Д. Гусейнов, И.Н. Зильфикаров, Б.К. Романов Стресс-протекторная фитотерапия. *Биомедицина*. 2011; 3: 115-9.
3. Aydin, S. R. Beis, Y. Ozturk, K.H. Baser Nepetalactone: a new opioid analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1998; 50: 813-817.
4. Минеева-Вялых, М.Ф. Метод прямого спектрофотометрического определения скорости тирозингидроксилазной реакции. *Вопросы медицинской химии*. 1976; 22 (2): 274-9.
5. Беленький, М.Л. *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*. Ленинград: Медгиз. 1963.

### Сведения об авторах:

**Лупанова Ирина Александровна**, канд. биол. наук, руководитель Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: iriss86@mail.ru;

**Курманова Елена Николаевна**, науч. сотр. отдела экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: kurmanova1968@yandex.ru;

**Ферубко Екатерина Владимировна**, канд. мед. наук, зав. отделом экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: eferubko@yandex.ru;

**Мартыничик Ирина Александровна**, ст. науч. сотр. отдела экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»; e-mail: irina-martynchik@mail.ru;

**Колхир Владимир Карлович**, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. отдела экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: novosed@yandex.ru;

**Трумпе Татьяна Евгеньевна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр.к отдела экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: trumpe@list.ru;

**Звездина Екатерина Владимировна**, ст. науч. сотр. отдела фитохимии и стандартизации ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: vilarnii.sheychenko@mail.ru

6. Миронов А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть первая. Москва; Гриф и К: 2012.
7. Боровиков В.П. *Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA*. Москва; Горячая линия. Телеком. 2014.
8. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал*. 2003; 37(3): 32-4.

### References

1. Alyautdin R.N. *Pharmacology*. [Pharmakologiya]. Moscow: GEO-TAR. MEDIA: 2008. (in Russian)
2. Alyautdin R.N., Guseidov M.N., Zilfikarov I.N., Romanov B.K. Stress-protective herbal medicine. *Biomeditsina*. 2011; 3: 115-9. (in Russian)
3. Aydin, S.R. Beis, Y. Ozturk, K.H. Baser Nepetalactone: a new opioid analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1998; 50: 813-7.
4. Mineeva-Vyalich M.F. Method for tyrosine hydroxylase reaction rate direct spectrophotometric determination. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 1976; 22 (2): 274-9. (in Russian)
5. Belenkiy M.L. *Quantitative assessment elements for the pharmacological effect*. [Elementy kolichestvennoy otsenki farmakologicheskogo effekta]. Leningrad; Medgiz. 1963. (in Russian)
6. Mironov A.N. *Guidelines for nonclinical studies of drugs. Part one*. [Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств]. Moscow; Grif I K. 2012. (in Russian)
7. Bоровиков V.P. *A popular introduction to modern data analysis in STATISTICA*. [Popularnoe vvedenie v sovremennyy analiz dannykh v sisteme STATISTICA]. Moscow; Goryatchaya liniya. Telekom. 2014. (in Russian)
8. Berezovskaya I.V. Classification of chemicals by parameters of acute toxicity with parenteral routes of administration *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2003; 37(3): 32-4. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Яковлева М.В., Червинец В.М., Червинец Ю.В., Смирнова Л.Е.

## Микробиота кишечника и полости рта у больных артериальной гипертензией с метаболическим синдромом

ФГБОУ ВО «Тверской ГМУ» Минздрава России,  
170000, Тверская область, Тверь, Россия, ул. Советская, д. 4

Последние годы привлекает внимание роль кишечной микробиоты в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и метаболического синдрома (МС). Имеются данные, что метаболиты бактерий кишечника вносят вклад в развитие атеросклероза, АГ, сердечной недостаточности, ожирения и сахарного диабета, способствуют формированию нарушений в системе иммунитета. Изменения кишечного макробиотического пейзажа повышает проницаемость кишечной стенки, способствует развитию эндотоксемии, что играет определенную роль в развитии хронического воспаления в организме, способствуя развитию ожирения и других коморбидных проявлений МС.

**Цель** – изучение особенностей микробиоты кишечника и полости рта у больных артериальной гипертензией (АГ) на фоне МС.

**Методика.** Исследование микробиома фекалий и ротовой жидкости пациентов с АГ и МС проводили с помощью классического бактериологического анализа. Идентификация микроорганизмов осуществлялась по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам.

**Результаты.** При исследовании фекалий у больных АГ с МС, в сравнении с группой больных АГ, увеличивается частота встречаемости *E. coli*, *Klebsiella spp.*, выделяются *Bacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Proteus spp.*, *Neisseria spp.*, *S. Aureus*, уменьшается частота встречаемости *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.* при отсутствии *Bifidobacterium spp.* В ротовой жидкости у больных АГ с МС обнаруживаются *Clostridium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Klebsiella spp.* и в небольшом количестве присутствуют *Neisseria spp.*, *Fusobacterium spp.*

**Заключение.** В толстом кишечнике у больных АГ с МС отмечается выраженный дисбактериоз с преобладанием условно-патогенных клебсиелл, энтеробактерий, протей, золотистого стафилококка. Микробиом кишечника больных АГ без МС представлен нормальной микрофлорой. В полости рта у больных АГ с МС также преобладают условно-патогенные клостридии, клебсиеллы. Микробиота больных с АГ без МС более многообразна с преобладанием нормофлоры.

**Ключевые слова:** артериальная гипертензия; метаболический синдром; микробиота кишечника и полости рта

**Для цитирования:** Яковлева М.В., Червинец В.М., Червинец Ю.В., Смирнова Л.Е. Микробиота кишечника и полости рта у больных артериальной гипертензией с метаболическим синдромом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 101-105.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.101-105

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Смирнова Л.Е., Червинец В.М., Червинец Ю.В.; сбор и обработка материала – Яковлева М.В.; подготовка иллюстративного материала – Яковлева М.В., Смирнова Л.Е.; статистическая обработка данных – Червинец Ю.В., Яковлева М.В.; написание текста – Яковлева М.В., Червинец Ю.В., Смирнова Л.Е.; редактирование – Червинец В.М., Червинец Ю.В., Смирнова Л.Е.

**Для корреспонденции:** Яковлева Маргарита Викторовна, e-mail: rita99R987@rambleur.ru

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

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

Поступила 11.06.2019

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Yakovleva M.V., Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Smirnova L.E.

### Gut and oral microbiota in patients with arterial hypertension and metabolic syndrome

Tver State Medical University,  
Sovetskaya Str. 4, Tver, 170000, Russia

In recent years, the role of intestinal microbiota in the pathogenesis of cardiovascular diseases (CVD) and metabolic syndrome (MS) has attracted attention. There is evidence that intestinal bacterial metabolites contribute to development of atherosclerosis, hypertension, heart failure, obesity, diabetes, and immune disorders. Changes in the intestinal macrobiotic landscape lead to increased intestinal permeability and endotoxemia, which play a role in chronic inflammation and facilitate development of obe-

sity and other MS comorbidities. **Aim.** To study features of intestinal and oral microbiota in patients with arterial hypertension (AH) associated with MS. **Methods.** Study materials were feces and oral fluid of patients with AH and MS where the microbiome was studied with a classical bacteriological analysis. Microorganisms were identified by their morphological, tinctorial, cultural, and biochemical properties. **Results.** In feces of hypertensive patients with MS as distinct from patients with hypertension, incidences of *E. coli* and *Klebsiella spp.* were increased; *Bacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Proteus spp.*, *Neisseria spp.*, and *S. aureus* were found; incidences of *Lactobacillus spp.*, and *Bacteroides spp.* were decreased; and *Bifidobacterium spp.* were absent. In the oral fluid of patients with AH and MS, *Clostridium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Klebsiella spp.* and small amounts of *Neisseria spp.* and *Fusobacterium spp.* were found. **Conclusion.** Pronounced dysbacteriosis with predominating opportunistic *Klebsiella*, enterobacteria, *Proteus*, and *Staphylococcus aureus* was observed in the large intestine of hypertensive patients with MS. The intestinal microbiome of patients with AH (without MS) was represented by normal microflora. Conditionally pathogenic *Clostridium* and *Klebsiella* also predominated in the oral cavity of patients with hypertension and MS. The microbiota of patients with AH without MS was more diverse with predominating normal flora.

**Keywords:** arterial hypertension; metabolic syndrome; intestinal and oral microbiota

**For citation:** Yakovleva M.V., Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Smirnova L.E. Gut and oral microbiota in patients with arterial hypertension and metabolic syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 101-105. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.101-105

**For correspondence:** Yakovleva Margarita Viktorovna, post-graduate student of the Department of internal diseases, e-mail: Rita99987@rambler.ru

**Contribution:** research concept and design – Yakovleva M.V. Chervinets V.M., Chervinets Yu.V.; material collecting and processing – Yakovleva M.V.; preparation of illustrative material – Yakovleva M.V. Smirnova L.E.; statistical processing – Chervinets Yu.V., Yakovleva M.V., writing text – Smirnova L.E., Yakovleva M.V., Chervinets Yu.V.; text editing – Smirnova L.E., Chervinets V.M., Chervinets Yu.V.

#### Information about the authors:

Yakovleva M.V., <https://orcid.org/0000-0002-2485-0283>

Chervinets V.M., <https://orcid.org/0000-0001-6549-0010>

Chervinets Yu.V., <https://orcid.org/0000-0001-9209-7839>

Smirnova L.E., <https://orcid.org/0000-0002-2800-2927>

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

**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest.

Received 11.06.2019

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

Проблема артериальной гипертензии (АГ) занимает одно из ведущих мест в клинической медицине, так как АГ существенно повышает риск развития сердечно-сосудистых осложнений, таких как инфаркт миокарда, мозговой инсульт, случаи внезапной смерти. В России число больных с АГ составляет около 40% взрослого населения, а метаболический синдром (МС) встречается у 24% общей популяции [1, 2]. При АГ в сочетании с МС часто выявляются различные системные нарушения [3].

Последние годы привлекает внимание роль кишечной микробиоты в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и МС [4–6]. Имеются данные, подтверждающие, что метаболиты бактерий кишечника вносят вклад в развитие атеросклероза, АГ, сердечной недостаточности, ожирения и сахарного диабета, а также нарушений в системе

иммунитета [7, 8]. Изменения кишечного микробиотического «пейзажа» приводит к повышенной кишечной проницаемости, эндотоксемии, что играет определенную роль в развитии хронического воспаления в организме, способствуя развитию ожирения и других коморбидных проявлений МС [9]. Механизмы, лежащие в основе этой проблемы, активно изучаются для оптимизации профилактики и лечения данной категории больных. Считается, что состояние кишечной микрофлоры отражает состояние здоровья всего организма, особенно иммунной системы. Однако, в ряде случаев, дисбактериоз кишечника протекает бессимптомно, поэтому решающее значение в диагностике могут иметь микробиологические показатели. Цель исследования – изучение особенностей микробиоты кишечника и полости рта у больных с артериальной гипертензией и метаболическим синдромом.

### Методика

Обследовано 44 пациента в возрасте от 50 до 75 лет, из них 13 (30%) человек – больные АГ, 31 (70%) человек – больные АГ с МС. В исследуемой группе женщин – 29 человек, мужчин – 15 человек. У 18 пациентов (41%) имелись поражения «органов-мишеней», а у 26 пациентов (59%) имелись ассоциированные клинические состояния такие как стенокардия напряжения и хроническая сердечная недостаточность, постинфарктный кардиосклероз, цереброваскулярные заболевания (ишемический инсульт, транзиторная ишемическая атака). АГ в качестве единственного (изолированного) диагноза исключалась из числа обследованных. В представленной группе АГ I степени встречалась у 11 (25%), II степени – у 25 (57%), III степени – у 8 (18%) человек. У большинства из них наблюдались дислипидемия и избыточная масса тела. В данной группе обследованных преобладали высокий и очень высокий риск развития сердечно-сосудистых осложнений (PPCCO).

Материал для исследования – кал и ротовая жидкость. Забор материала делали утром и в течение 2 ч доставляли в бактериологическую лабораторию.

Факультативно анаэробные и аэробные микроорганизмы изучали с помощью классического бактериологического метода исследования. Были использованы следующие среды: Эндо для энтеробактерий, маннит-солевой агар (M118) для стафилококков, агар Бэрда-Паркера для выявления лецитиназной активности, М 304 – стрептококковый агар и Колумбия кровяной агар для стрептококков и энтерококков, МРС – лактоагар для лактобактерий, Сабуро декстроза агар для дрожжевых грибов рода *Candida*, а также хромогенные среды (HiMedia). Для культивирования анаэробов использовали среды бифидоагар и кровяной Шедлер агар. Анаэробные условия создавались в анаэроштатах при помощи газогенераторных пакетов BBL. Культивирование проводили при температуре 37 °С в течение 24-48 ч. Количество колоний выражали в lg КОЕ/г или lg КОЕ/мл.

Идентификация микроорганизмов осуществлялась по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам с применением API систем «Bio Mériex Vitek, Inc.». Идентификацию энтеробактерий осуществляли с помощью идентификационных систем Enterotube II и Oxi/Ferm Tube (BBL). Определение вида анаэробов проводили на API системах французской фирмы bioMériex (API 20 A), стрептококков – (API 20 Strept), стафилококков – (API 20 Staph), дрожжевых грибов – API AUX. В работе был

использован программно-аппаратный комплекс Диаморф Цито (ДиаМорф, Россия).

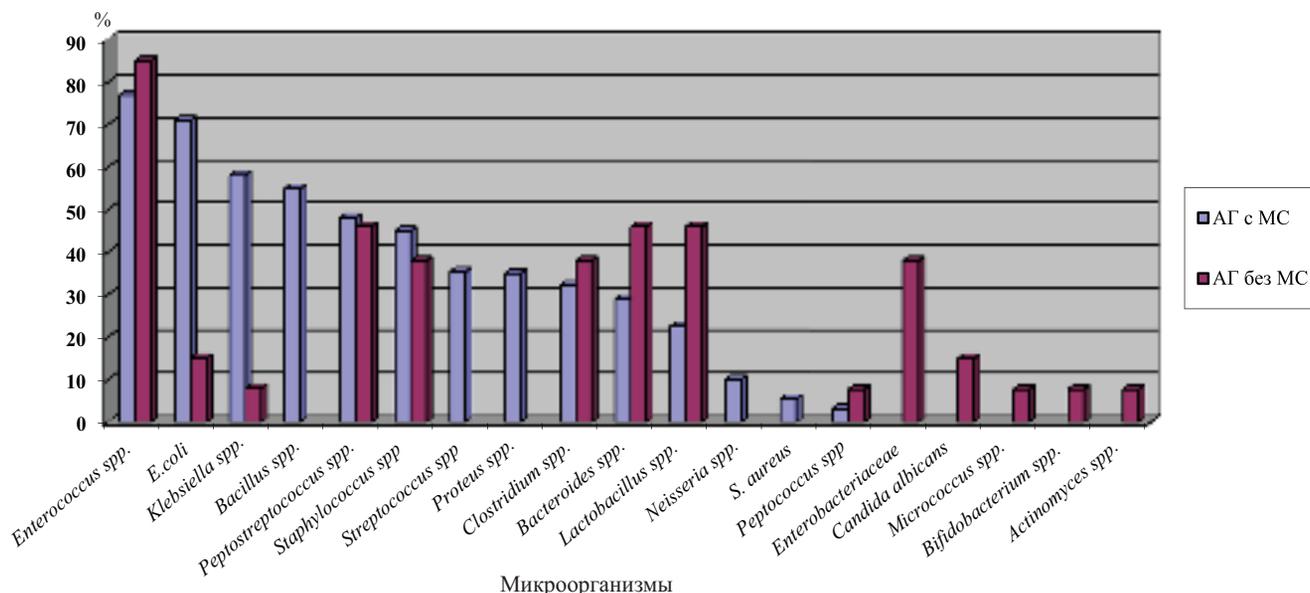
### Результаты и обсуждение

Состав микробиоты кишечника и полости рта представлен на **рис. 1 и 2**. При бактериологическом исследовании фекалий у пациентов АГ с МС (**рис. 1**) в 77% случаев обнаруживались *E. faecalis* (6,3 lg КОЕ/г), в 71% – *E. coli* (7,4 lg КОЕ/г), в 58% – *Klebsiella spp.* (7,8 lg КОЕ/г), в 55% – *Bacillus spp.* (6,2 lg КОЕ/г), в 48% – *Peptostreptococcus spp.* (8,1 lg КОЕ/г), в 45% – *Staphylococcus spp.* (5,4 lg КОЕ/г), в 35,4% – *Streptococcus spp.* (6,3 lg КОЕ/г), в 35% – *Proteus spp.* (6,5 lg КОЕ/г), в 32,2% – *Clostridium spp.* (6,8 lg КОЕ/г), в 29% – *Bacteroides spp.* (7,9), в 22,5% – *Lactobacillus spp.* (5,9 lg КОЕ/г), в 10% – *Neisseria spp.* (8,0 lg КОЕ/г), в 6,5% – *S. aureus* (5,45 lg КОЕ/г), в 3,2% случаев – *Peptococcus spp.* (8,5 lg КОЕ/г).

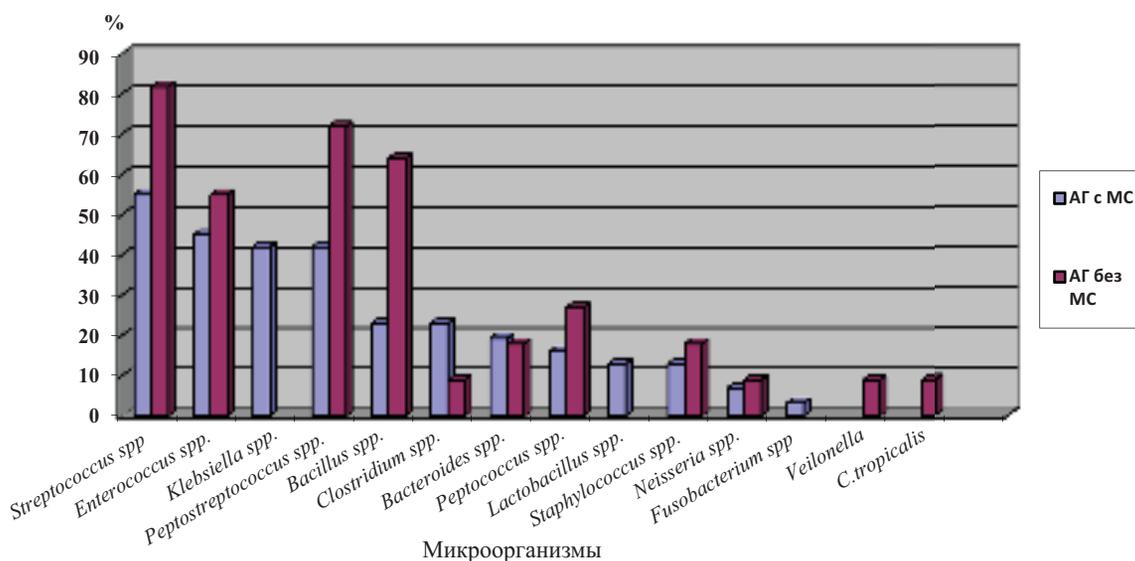
При анализе результатов бактериологического исследования фекалий (**рис. 1**) у больных АГ без МС обнаруживались: в 85% – *Enterococcus spp.* (6,3 lg КОЕ/г.), в 46% – *Lactobacillus spp.* (6,0 lg КОЕ/г.), в 46% – *Bacteroides spp.* и *Peptostreptococcus spp.* (6,65 lg КОЕ/г. и 7,8 lg КОЕ/г соответственно), в 38% – *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae* и *Clostridium spp.* (5,78 lg КОЕ/г, 6,5 lg КОЕ/г и 6,4 lg КОЕ/г соответственно, в 15% – *E. coli* (7,85 lg КОЕ/г) и *C. albicans* (5,45 lg КОЕ/г) соответственно, в 8% – *Klebsiella spp.* (7,3 lg КОЕ/г), в 7,7% – *Micrococcus spp.*, *Peptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Actinomyces spp.* (6,6 lg КОЕ/г; 8,6 lg КОЕ/г; 7 lg КОЕ/г; 8,7 lg КОЕ/г) соответственно.

При исследовании ротовой жидкости у больных АГ с МС выделялись (**рис. 2**): у 55% – *Streptococcus spp.* (7 lg КОЕ/г), у 45% – *Enterococcus spp.* (7,6 lg КОЕ/г), у 42% – *Klebsiella spp.* (9,1 lg КОЕ/г), 42% – *Peptostreptococcus spp.* (9,1 lg КОЕ/г), 23% – *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.* (6,4 lg КОЕ/г; 9,2 lg КОЕ/г) соответственно, 19,3 – *Bacteroides spp.* (9,6 lg КОЕ/г), 16% – *Peptococcus spp.* (8,8 lg КОЕ/г), 13% – *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* (6,25 lg КОЕ/г; 7,25 lg КОЕ/г) соответственно, 7% – *Neisseria spp.* (7,8 lg КОЕ/г), 3,2% – *Fusobacterium spp.* (8,3 lg КОЕ/г).

При исследовании ротовой жидкости у больных АГ без МС выделялись (**рис. 2**): у 81,8% – *Streptococcus spp.* (5,5 lg КОЕ/г), 72% – *Peptostreptococcus spp.* (6,4 lg КОЕ/г), 64% – *Bacillus spp.* (5,8 lg КОЕ/г), 55% – *Enterococcus spp.* (5,5 lg КОЕ/г), 27,7% – *Peptococcus spp.* (7 lg КОЕ/г), у 18% – *Staphylococcus spp.*, *Bacteroides spp.* (4,35 lg КОЕ/г; 4,45 lg КОЕ/г) соответственно, 9% – *Clostridium spp.*, *Veillonella spp.*, *C. tropicans*, *Neisseria spp.* (4 lg КОЕ/г; 4,7 lg КОЕ/г; 4,4 lg КОЕ/г; 8,3 lg КОЕ/г) соответственно.



**Рис. 1.** Частота встречаемости и спектр микроорганизмов кишечной микробиоты больных с артериальной гипертензией без метаболического синдрома и артериальной гипертензией с метаболическим синдромом.



**Рис. 2.** Частота встречаемости и спектр микроорганизмов ротовой жидкости у больных с артериальной гипертензией без метаболического синдрома и артериальной гипертензией с метаболическим синдромом.

Таким образом, у больных АГ с МС в сравнении с группой больных АГ без МС возрастает частота встречаемости *Klebsiella spp.* – 7,3 раза, *E.coli* – в 4,7 раза, кроме того и у данной группы пациентов выявлялись *Bacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Proteus spp.*, *Neisseria spp.*, *S. aureus*.

У больных АГ без МС отмечено увеличение частоты встречаемости *Peptococcus spp.* (в 2,4 раза), *Lactobacillus spp.* (2 раза), *Bacteroides spp.* (в 1,6 раза)

– у них выделялись микроорганизмы, которые не определялись у больных АГ с МС: *Enterobacteriaceae*, *C. albicans*, *Bifidobacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Micrococcus spp.*

В ротовой жидкости у больных АГ с МС встречаются *Clostridium spp.* в 2,5 раза чаще, и обнаруживались *Klebsiella spp.* (в 42%), *Lactobacillus spp.* (в 13%), выделялись в небольшом количестве *Neisseria spp.* и *Fusobacterium spp.*

В ротовой жидкости у больных АГ без МС в сравнении с больными АГ и МС наблюдается увеличение частоты встречаемости *Bacillus spp.* (в 2,8 раза), *Peptostreptococcus spp.*, *Peptococcus spp.* (в 1,7 раза), *Streptococcus spp.* (в 1,5 раза), *Staphylococcus spp.* (в 1,4 раза), *Neisseria spp.* (в 1,3 раза) *Enterococcus spp.* (в 1,2 раза). В небольшом количестве выделялись — *Veillonella spp.* и *C.tropicans*.

### Заключение

В толстом кишечнике у больных АГ с МС отмечается выраженный дисбактериоз с преобладанием условно-патогенных клебсиелл, энтеробактерий, протей, золотистого стафилококка. Микробиом кишечника больных АГ без МС представлен бактериями нормальной микрофлоры. В полости рта у больных с АГ и МС также преобладали условно-патогенные клостридии, клебсиеллы. Микробиота больных с АГ без МС более многообразна с преобладанием нормофлоры.

### Литература

1. Климов А. В., Денисов Е. Н., Иванова О. В. Артериальная гипертензия и ее распространенность среди населения. *Молодой ученый*. 2018; 50(236): 86-90. URL <https://moluch.ru/archive/236/54737/>
2. Акатова Е.Н., Мельник М.В. Пути снижения риска развития ишемической болезни сердца на фоне метаболического синдрома. *Кардиология*. 2017; 6: 84-8.
3. Беленков Ю.Н., Джериева И.С., Рапопорт С.М. Метаболический синдром как результат образа жизни. *Медицинское информационное агентство*. 2015.
4. Драпкина О.М., Кабурова А.Н. Кишечная микробиота — новый спутник на маршруте сердечно-сосудистых заболеваний: неожиданные роли старых соседей. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2016; 12 (1): 1-6.
5. Ощепкова Е.В. Смертность населения от сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации в 2001–2006 гг. и пути по ее снижению. *Кардиология*. 2009; 2: 62–72.
6. Хавкин А.И., Комарова О.Н. Влияние *saccharomyces boulardii* на микробиоту кишечника. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2017; 6: 126-32.

### Сведения об авторах:

**Яковлева Маргарита Викторовна**, аспирант, ассистент каф. внутренних болезней, e-mail: Rita99987@rambler.ru;  
**Червинец Вячеслав Михайлович**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии, вирусологии с курсом иммунологии;  
**Червинец Юлия Вячеславовна**, доктор мед. наук, проф. каф. микробиологии, вирусологии с курсом иммунологии;  
**Смирнова Людмила Евгеньевна**, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. внутренних болезней.

7. Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Дармов И.В., Лундовских И.А. Стратегия в коррекции нарушений микробиоценоза кишечника. *Акушерство и гинекология*. 2018; 1(12): 4-6.
8. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Серова Н.Е., Яковлева М.В., Стулов Н.М., Воеводина В.А. и др. Клинико-микробиологические особенности больных артериальной гипертензией у жителей тверского региона. *Современные проблемы науки и образования*. 2019; 3. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28791>
9. Плотникова Е. Ю., Краснов О.А. Метаболический синдром и кишечная микрофлора: что общего? *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2014; 112(12): 64–73.

### References

1. Klimov A. V., Denisov E. N., Ivanova O. V. Hypertension and its prevalence among the population. *Molodoy uchenyy*. 2018; 50(236): 86-90. URL <https://moluch.ru/archive/236/54737/> (in Russian)
2. Akatova E.N., Mel'nik M.V. Ways to reduce the risk of coronary heart disease in the background of metabolic syndrome. *Kardiologiya*. 2017; 6: 84-8. (in Russian)
3. Belenkov Yu.N., Dzherieva I.S., Rapoport S.M. Metabolic syndrome as a result of lifestyle. *Meditinskoe informatsionnoe agestvo*; 2015. (in Russian)
4. Drapkina, O.M., Kaburova A.N. Intestinal microbiota — a new satellite on the cardiovascular disease route: the unexpected roles of old neighbors. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2016; 12 (1): 1-6. (in Russian)
5. Oshchepkova E.V. Mortality from cardiovascular diseases in the Russian Federation in 2001–2006 and ways to reduce it. *Kardiologiya*. 2009; 2: 62–72. (in Russian)
6. Khavkin, A.I., Komarova O.N. Effect of *saccharomyces boulardii* on the intestinal microbiota. Literature review. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2017; 6: 126-32. (in Russian)
7. Chicherin, I.Yu., Pogorel'skiy I.P., Darmov I.V., Lundovskikh I.A. Strategy for the correction of intestinal microbiocenosis disorders. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2018; 1(12): 4-6. (in Russian)
8. Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Serova N.E., Yakovleva M.V., Stulov N.M., Voevodina V.A., Belyaev V.S., Smirnova L.E. Clinical and microbiological features of patients with arterial hypertension among residents of the Tver region. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2019; 3. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28791> (in Russian)
9. Plotnikova E. Yu., Krasnov O.A. Metabolic syndrome and intestinal microflora: what is common? *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2014; 112 (12):64–73 (in Russian)

## Обзоры

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.822.2

Соловьева Н. В.<sup>1</sup>, Чаусова С.В.<sup>2</sup>, Кичук И.В.<sup>2</sup>, Макарова Е.В.<sup>1,3</sup>

# Влияние кальциевой сигнализации на развитие расстройств аутистического спектра

<sup>1</sup>АО «Научный центр персонализированной медицины»,

105082, Москва, Россия, Большая Почтовая ул., д. 20, стр. 3;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»,

117997, Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России,

121099, Москва, Россия, ул. Новый Арбат, д. 32

Расстройства аутистического спектра (РАС) являются сложной группой нейropsychиатрических заболеваний с точки зрения этиопатогенеза. В основе нейронных нарушений, приводящих к аутистической симптоматике, лежат дисфункции сигнальных путей. Согласно последним исследованиям одним из наиболее значимых сигнальных путей в развитии данной группы заболеваний является кальциевый сигнальный путь. Кальциевая сигнализация тесно связана с такими сигнальными путями, как MAPK-, Wnt-, PI3K/AKT/mTOR-, нарушение в работе которых приводит к нарушениям серотонинергической, дофаминергической, опиоидной, холинергической, глутаматергической, ГАМКергической передачи и влечет за собой эксайтотоксичность за счёт гиперактивации NMDA- и AMPA-рецепторов, повреждение и гибель нейронов. Все эти процессы в нейронных клетках напрямую связаны с формированием долговременного потенцирования и депрессии, а нарушения в этих клетках приводят к дисфункции базисных психических процессов. С клинической точки зрения кальциевый сигнальный путь может стать одной из основных мишеней для фармакологической коррекции симптоматических проявлений РАС. Очевидно, что дальнейшие исследования на животных моделях и электрофизиологические клинические исследования необходимы для понимания патогенетических особенностей развития РАС, а также какое именно место занимает сигнальный путь Ca<sup>2+</sup> в данных состояниях. Дальнейшие исследования необходимы, для прояснения потенциальной роли сигнализации Ca<sup>2+</sup> в изменениях социального или стереотипического поведения пациентов, что является основной особенностью РАС.

**Ключевые слова:** аутизм; расстройства аутистического спектра; кальций; сигнальные пути; кальциевая сигнализация

**Для цитирования:** Соловьева Н. В., Чаусова С.В., Кичук И.В., Макарова Е.В. Влияние кальциевой сигнализации на развитие расстройств аутистического спектра. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(4): 106-117.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.106-117

**Для корреспонденции:** Соловьева Надежда Валентиновна, e-mail: drsnv@yandex.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Соловьева Н.В., Чаусова С.В.; сбор и изучение источников – Кичук И.В.; написание текста – Макарова Е.В. Утверждение окончательной версии статьи – все соавторы.

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

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

Поступила 26.06.2019

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Solov'eva N.V.<sup>1</sup>, Chausova S.V.<sup>2</sup>, Kichuk I.V.<sup>2</sup>, Makarova E.V.<sup>1,3</sup>

## The influence of calcium signaling on the development of autism spectrum disorders

<sup>1</sup> CJS «Scientific Centre of Personalized Psychiatry»,

Russia, Moscow 105082, B. Pochtovaya str. 20/3;

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University,

Russia, Moscow 117997, Ostrovityanova st., 1;

<sup>3</sup> FSBI «National medical research center of rehabilitation and balneology» Russian ministry of health,

Russia, Moscow 121099, Novyi Arbat 32

Autism spectrum disorders (ASDs) are a group of neuropsychiatric diseases with a complex etiopathogenesis. Neuronal disorders leading to autistic symptoms are determined by dysfunction of signaling pathways. Recent studies have demonstrated that the calcium signaling pathway is one of the major significant pathways for this group of disorders. Calcium signaling is closely linked to MAPK-, Wnt-, and PI3K/AKT/mTOR -pathways, which abnormalities lead to dysfunction of serotonergic, dopaminergic, opioidergic, cholinergic, glutamatergic, and GABAergic transmission and result in excitotoxicity due to hyperactivation of NMDA and AMPA receptors and neuronal damage and death. These processes in neuronal cells are associated with formation of long-term potentiation and depression, and disturbances in these cells lead to failure of basic mental processes. From a clinical point of view, the calcium signaling pathway can become one of major targets for the pharmacological treatment of symptomatic ASD. Obviously, further animal studies and electrophysiological human studies are required for understanding pathogenetic mechanisms of ASD and the contribution of Ca<sup>2+</sup> signaling. Future research will clarify a potential role of Ca<sup>2+</sup> signaling in social or stereotypic behavior, which constitutes a main feature of ADS.

**Keywords:** autistic disorder; autism spectrum disorder; calcium; signal transduction; calcium signaling

**For citation:** Solov'eva N.V., Chausova S.V., Kichuk I.V. Makarova E.V. The influence of calcium signaling on the development of autism spectrum disorders. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 106-117. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.106-117

**For correspondence:** Solov'eva Nadezhda Valentinovna, psychiatrist, general director of CJS «Scientific Centre of Personalized Psychiatry», Russia, Moscow 105082, e-mail: drsnv@yandex.ru

**Contribution:** research concept and design – Solov'eva N.V., Chausova S.V.; material collecting and processing – Kichuk I.V.; writing text – Makarova E.V. Approval of the final version of the article – all co-authors.

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

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

**Information about the authors:**

Solov'eva N.V., <https://orcid.org/0000-0003-2965-912>

Chausova S.V., <https://orcid.org/0000-0001-5799-5908>

Kichuk I.V., <https://orcid.org/0000-0002-9625-391>

Makarova E.V., <https://orcid.org/0000-0003-3767-8475>

Received 26.06.2019

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

За последние два десятилетия существенно изменился подход к изучению патогенетических механизмов, лежащих в основе нейropsychиатрических расстройств развития. В том числе и подход к изучению расстройств аутистического спектра (РАС) перешёл с клеточного уровня на уровень молекулярный, охватывая не только клинические аспекты и крупные хромосомные нарушения, но и аспекты взаимодействия сигнальных путей в нейронах. Возможность многомерных сетевых исследований позволила не только объединить данные ранее проведенных исследований, но и выявить наиболее значимые в формировании этиопатогенеза РАС сигнальные пути. Ключевая роль кальция в патогенезе РАС предполагалась давно [1], однако сейчас стало возможным выделить и сопоставить на основе интеграции данных баз SFARI Gene (проект Simons Simplex Collection, содержащий данные о генах, задействованных в патогенезе РАС), GO (The Gene Ontology Consortium) и KEGG (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) насколько это роль значима. С появлением методов проведения анализа больших массивов информации стало возможным про-

анализировать одновременно десятки сигнальных путей, как предположительно, так и достоверно связанных с аутистической симптоматикой. На основании результатов одного из последних крупномасштабных исследований [2] с уверенностью можно говорить о том, что именно кальциевый сигнальный путь особенно значим в формировании РАС.

Современные исследования кальциевого сигнального пути при РАС затрагивают оценку сетей белковых взаимодействий, генных сетей коэкспрессии и определение конкретных поражённых сигнальных путей на основе генетических баз данных РАС [3]. Анализ возможных взаимодействий ключевых молекулярных элементов обладает на сегодняшний день широким охватом задействованных механизмов. Таким образом, могут быть проанализированы взаимодействия сигнальных путей друг с другом (pathway-pathway interaction), сигнальных путей и генов (pathway-gene interaction) и т.д. Что особенно важно, пул накопленных знаний позволяет проводить сетевой анализ исключительно тех сигнальных путей, которые являются «универсальными» для аутистических расстройств [4], исключая «общие» сигнальные пути.

На данный момент значимость кальциевой сигнализации в этиопатогенезе РАС определяют 4 основных фактора [2]: 1) это наиболее крупный и насыщенный сигнальный путь, 2) сигнальный путь с наибольшим количеством взаимодействий с другими сигнальными путями, 3) тот факт, что ионы кальция играют важную роль в большинстве сигнальных путей и сетей взаимодействия сигнальных путей (так называемых «суперпутей»), 4) и то, что гены, связанные с РАС, наиболее часто встречаются в кальциевом сигнальном пути.

### **Роль $Ca^{2+}$ и кальциевых рецепторов**

Расстройства аутистического спектра – это группа нейropsychиатрических расстройств, с распространённостью 1 на 68 человек [5]. Соотношение мужчин и женщин среди лиц с аутистическими проявлениями оценивается как 4 к 1 [6]. По другим данным РАС страдает около 1% общей популяции [7], то есть это группа пациентов с достаточно часто встречаемой нейropsychиатрической патологией развития. Согласно современной концепции, аутизм представляет собой широкий спектр полиэтиологических заболеваний, характеризующихся нарушениями в социальном взаимодействии и стереотипическом поведении [8].

Предполагается, что нарушения гомеостаза кальция являются базисом для запуска патогенетических механизмов развития нейродегенеративных и нейropsychиатрических расстройств, к которым также относится и РАС. Помимо этого,  $Ca^{2+}$  играет значительную роль в работе большинства систем человеческого организма: сердечно-сосудистой, мышечной, пищеварительной, патологии которых также часто обнаруживаются при аутистических расстройствах. Согласно таким представлениям, изменение равновесной концентрации  $Ca^{2+}$  становится причиной развития множества патологических состояний [9], что подтверждает «генно-средовую» модель формирования заболевания [10].

Роль  $Ca^{2+}$  в возбуждении клеток организма огромна.  $Ca^{2+}$  влияет на возбудимость мембран: снижение внеклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  увеличивает возбудимость, напротив, её повышение влечёт за собой снижение возбудимости [11]. В клетках нейротипичного организма  $Ca^{2+}$  – один из самых универсальных и древних представителей систем биологической сигнализации, регулирующих множество физиологических явлений, начиная с мембранного потенциала до ионов-переносчиков, активности киназ и транскрипции [9] (в том числе эпигенетической регуляции транскрипции [12]), а также многих других молекулярных процессов, необходимых для нормального функционирования клетки [9].  $Ca^{2+}$  в нейронах необходим не только для элементарных

форм нейронных взаимодействий, но и для более сложных функций, таких как, например, пластичность нейронов, связанная с памятью [13]. В некоторых мышечных волокнах и нейронах кальциевые токи достигают такой величины, что либо вносят значительный вклад, либо полностью формируют фазу роста потенциала действия. Процесс этот носит регенеративный характер благодаря возрастанию проводимости  $Ca^{2+}$  при деполяризации.

Сигнальный путь кальция берёт начало в момент проникновения внеклеточного кальция через ионные каналы плазматической мембраны или из-за высвобождения кальция из внутриклеточного депо в эндоплазматическом ретикулуме, действуя опосредовано, в основном, с помощью рецепторов инозитол-трифосфата ( $IP_3$ ). Таким образом, для нарушения кальциевой сигнализации и формирования РАС обнаруживаются 2 значимые мишени — собственно кальциевые рецепторы и рецепторы  $IP_3$ .

Влияние нарушений кальциевой сигнализации на развитие РАС уже на этом этапе показано в рамках исследований фибробластов человека на животной модели синдрома хрупкой X-хромосомы и Туберозного склероза 1-го и 2-го типов. Было обнаружено, что снижение высвобождения  $Ca^{2+}$  происходит через лигандуправляемые инозитол-трифосфатные рецепторы ( $IP_3R$ ). При разнообразных моногенных формах РАС было зафиксировано выпадение указанного «звена» в кальциевой сигнализации, опосредованной рецепторами, связанными с G-белком и фотовысвобождением  $IP_3$  на всех молекулярных уровнях воздействия  $Ca^{2+}$ , все события базируются на нарушениях активности каналов  $IP_3R$  [14].

Нужно отметить, что  $IP_3R$ -опосредованное функционирование кальциевого сигнального пути играет ключевую роль в формировании нейрональной возбудимости, синаптической пластичности, экспрессии генов и влияет на общие процессы нейроразвития [15]. Аналогичные исследования были проведены и на клетках пациентов с идиопатической формой РАС. В ответ на активацию пуринаргических рецепторов было продемонстрировано значительное снижение высвобождения  $Ca^{2+}$ , опосредованное  $IP_3$ . Таким образом,  $Ca^{2+}$  – сигнальный путь играет роль и в формировании форм РАС, этиология которых до сих пор не ясна [16].

Вместе с тем наиболее значимыми участниками кальциевой сигнализации являются потенциал-зависимые кальциевые каналы, наибольшее количество которых располагается в мембранах нервов и мышечных волокон.  $Ca^{2+}$ , входящий в клетку через эти кана-

лы во время потенциала действия, оказывает влияние на самые разные процессы. К примеру, кратковременное увеличение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в ходе потенциала действия вызывает как выброс медиаторов в нервном окончании, так и сокращение мышечного волокна [11].

Нарушения в указанной группе рецепторов (так называемые кальциопатии) представляют собой разнородную группу каналопатий [17], включающих в себя множественные кальциевые каналы. Внутриклеточное депо кальция и митохондриальное функционирование участвуют в клеточном энергетическом метаболизме, что в свою очередь регулирует процессы развития нервной ткани, нарушения в которых и приводят к формированию РАС. По этой причине РАС стали объектом изучения для большинства исследователей молекулярных основ каналопатий в нейропсихиатрии. Поток ионов через мембрану регулирует различные функции клеток: от генерации потенциалов действия до экспрессии генов и изменения внутриклеточных структур — поэтому неудивительно, что каналопатии оказывают глубокое влияние на функционирование головного мозга. Скорость передачи ионных потоков в ионных каналах происходит быстрее, чем в опосредованных переносчиками системах или помпах [18]. Изучение данного рода патологий позволяет не только оценить молекулярные (генетические и нейрохимические) нарушения в работе центральной нервной системы у людей, страдающих РАС, но и расширить представления о значимости кальциевой сигнализации в функционировании и развитии нейрона.

Если говорить о головном мозге, основной «зоной влияния» кальция являются пресинаптические и постсинаптические окончания. В пресинаптических окончаниях выработка потенциалов действия закономерно приводит к увеличению пресинаптических кальциевых токов через активацию высокопороговых кальциевых каналов N и P/Q-типов, нарушение в которых наблюдаются при аутизме продемонстрированном на животных моделях [19] — Ca (V) 2.1 и Ca (V) 2.2. Такой приток кальция приводит, в свою очередь, к высвобождению нейротрансмиттеров. В синдромальных формах РАС встречаются нарушения в функционировании и высокопороговых кальциевых каналов L-типа [20], что приводит к дезонтогенетическим нарушениям, характерным для этих форм (показано на животной модели). Следует особо отметить факт установления роли кальция в постсинаптическом нейрональном звене у людей с РАС, при наличии у последних соответствующих генетических изменений [19].

Кроме того, кальциопатии напрямую связаны с другими сигнальными путями и могут привести к их

нарушению. Основой большинства кальциопатий являются aberrации в генах, кодирующих субъединицы потенциал-зависимых кальциевых каналов. Исследования показали значимость при РАС однонуклеотидных мутаций в генах в *CACNA1I* и локусе *CACNA1C* [21]. Крупномасштабные исследования полного генома также показали значимость таких субъединиц кальциевых рецепторов, как *CACNA1C* и, дополнительно, *CACNB2* [22]. Было дополнительно определено, что высокой степенью риска являются мутации *de novo* в субъединицах рецепторов *CACNA1D* и *CACNA1E* [23]. Вместе с тем был обнаружен другой значимый для РАС тип кальциевых каналов — TRP или канал транзитного рецепторного потенциала, кодируемый геном *TRPM1*, который, в свою очередь, участвует в глутаматном сигнальном пути [24].

Такая значимость генов, кодирующих кальциевые каналы, в формировании РАС связана также с неизбежным взаимодействием сигнальных путей. Одним из основных «патогенных» взаимодействий сигнальных путей является связь кальциевой сигнализации и MAPK-сигнального пути (т.е. сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы), являющегося одним из наиболее изученных сигнальных путей [25]. Данный сигнальный путь ответственен за такие клеточные механизмы, как пролиферация, воспаление, дифференциация, апоптотические и анти-апоптотические процессы и, в целом, за клеточный цикл. Также MAPK-сигнальный путь напрямую связан с Wnt-сигнальным путём [26], который тоже зависит от участия  $\text{Ca}^{2+}$ . MAPK-сигнальный путь отвечает за регуляцию клеточного цикла и взаимодействует с mTOR-сигнальным путём, который играет ключевую роль в механизмах формирования РАС [27], входя в состав так называемого PI3K/АКТ/mTOR-сигнального пути (ферменты фосфоинозитид-3-киназа/серин-треонин-киназа/мишень рапамицина — сигнальный путь). На рисунке продемонстрирована связь с другими сигнальными путями [28]. Так, NOS входит помимо прочих в сигнальный путь долговременной депрессии (LTD), ADCY входит в сигнальные пути ГАМК-ергической, глутаматергической, холинергической и других нейромедиаторных путей передачи сигнала; PDE1 — в сигнальный путь пуринового метаболизма; FAK2 — в сигнальный путь гонадотропин-высвобождающего гормона; IP3K — в сигнальный путь инозитол-фосфатного метаболизма и в фосфатидилинозитол сигнальный путь, а PCK — в MAPK-сигнальный путь, mTOR-сигнальный путь, PI3K-сигнальный путь, Wnt-сигнальный путь, нарушения в которых наблюдаются при РАС [2, 26, 29]. Помимо этого, нарушения, связан-

ные с кальциевой сигнализацией, могут приводить к нарушениям таких нейротрансмиттерных систем, которые включают в себя серотонинергическую, дофаминергическую, опиоидную, холинергическую, ГАМК-ергическую системы, задействованные при синдромальных формах РАС. Несмотря на такое огромное количество взаимодействующих сигнальных путей, при РАС на данный момент ключевыми всё же считаются взаимодействия кальциевого сигнального пути и MAPK-сигнального пути [25].

Общими и значимыми для развития заболевания для обоих сигнальных путей оказались гены группы *CACNA* — *CACNA1B*, *CACNA1C*, *CACNA1D*, *CACNA1F*, *CACNA1G*, *CACNA1H*, *CACNA1I*, *PRKCB*. Эти же гены и кодируемые ими белки рецепторов потенциал-зависимых каналов кальция также стали мишенью для разработки новых методов лекарственной терапии [29]. Наиболее универсальным с позиции коммуникационных трудностей в рамках нейропсихиатрических заболеваний (в условиях животной модели и у человека) рассматривается ген *CACNA1C* [30], кодирующий  $\alpha 1C$  субъединицу потенциал-зависимого кальциевого канала Ca (V) 1.2. Вторым из «универсальных» для нейропсихиатрических заболеваний геном стал — *CACNA1D*, кодирующий Ca (V) 1.3. Одно из последних исследований показало, что у 60 % пациентов с мутациями в гене, кодирующем кальциевые каналы Ca (V) 1.2. L-типа [30] наблюдаются фенотипические проявления в виде аутистических расстройств в случае синдрома Тимоти. Ca (V) 1.2-рецепторы синергически усиливают сигнализацию NMDA-рецепторов, а также известно что активация глутаматергических рецепторов происходит за счёт долговременной потенциации, обусловленной  $Ca^{2+}$  [31]. Американскими исследователями (2016) было подтверждено, что нарушение в потенциал-зависимых каналах коррелирует с аутистической симптоматикой при синдроме Тимоти [32]. Дополнительно на животной модели была выявлена возможность Ca (V) 1.2-зависимой регуляции в виде подавления роста стволовых клеток [33].

Но не только потенциал-зависимые кальциевые каналы, как «транспортёры» кальция, могут сыграть роль в развитии аутизма. В ряде исследований была показана важность нарушений гена кальциевой АТФазы *ATP2B2*, кодирующего помпу переносчика кальция через мембраны в внеклеточное пространство. Мутации данного гена встречаются в разных популяциях и связываются с РАС [34].

Также такая вовлечённость нарушений в генах, кодирующих кальциевые каналы, обуславливает свойство  $Ca^{2+}$  как наиболее вероятного триггера в форми-

ровании эксайтотоксического повреждения клетки.  $Ca^{2+}$  играет основную роль в таких процессах, как возбудимость мембран, клеточный рост, экзоцитоз и синаптическая активность. В физиологических условиях нейроны обладают гомеостатическими механизмами, обеспечивающими контроль над концентрацией  $Ca^{2+}$ , направленными на поддержание низких концентраций. Избыточный выброс глутамата из синапса, а также гиперактивация глутаматных рецепторов приводит к избыточной возбудимости синаптических рецепторов, включающих такие рецепторы, как NMDA, AMPA и каинатный рецептор [35]. В исследовании 2013 г. [36] под наблюдением было 1967 детей с РАС (1553 мальчика и 414 девочек). Среди выборки был обнаружен недостаток следующих металлов — цинка, магния и кальция; у части детей обнаружился избыток алюминия, кадмия и свинца. Следует отметить тот факт, что в данном исследовании дефицит кальция был выявлен лишь в группе детей младше 10 лет — именно в данном возрасте формируется основная симптоматика акустических расстройств.

Помимо этого, мобилизация внутриклеточного кальция напрямую связана с выбросом таких нейрональных молекул, как глутамат, АТФ, D-серин, NO, простагландин, гомоцистеиновая кислота, таурин, фактор некроза опухоли [37]. Таким образом,  $Ca^{2+}$  и непосредственно сама кальциевая сигнализация влияют на множество процессов, таких как формирование синапсов, синаптическая пластичность, нейрогенез, которые в свою очередь играют ключевую роль в динамике процессов социального функционирования, нарушения которых и обуславливают основную симптоматику РАС.

Исходя из значимости роли ионов металлов в функционировании нейронов и организма в целом, логично было предположить, что, регулируя поступление в организм  $Ca^{2+}$ , можно повлиять на выраженность симптоматики РАС, однако на практике такой подход не оправдал себя [38], что является подтверждением необходимости исследования всей кальциевой сигнализации в совокупности, а не только концентрации ионов. Это необходимо потому, что основываясь на взаимодействии сигнальных путей разрабатываются новые методики регулирования уровней цитозольного  $Ca^{2+}$  [39]. Так было показано, что тапсигарин увеличивает уровни  $Ca^{2+}$  и CREB-зависимую экспрессию генов; обнаружены химические вещества, позволяющие уменьшать уровень  $Ca^{2+}$  в цитозоле. Таким образом было показано, что фармакологическая коррекция активности CREB и  $Ca^{2+}$  может помочь в лечении нейродегенеративных заболеваний, в частности, за счёт уве-

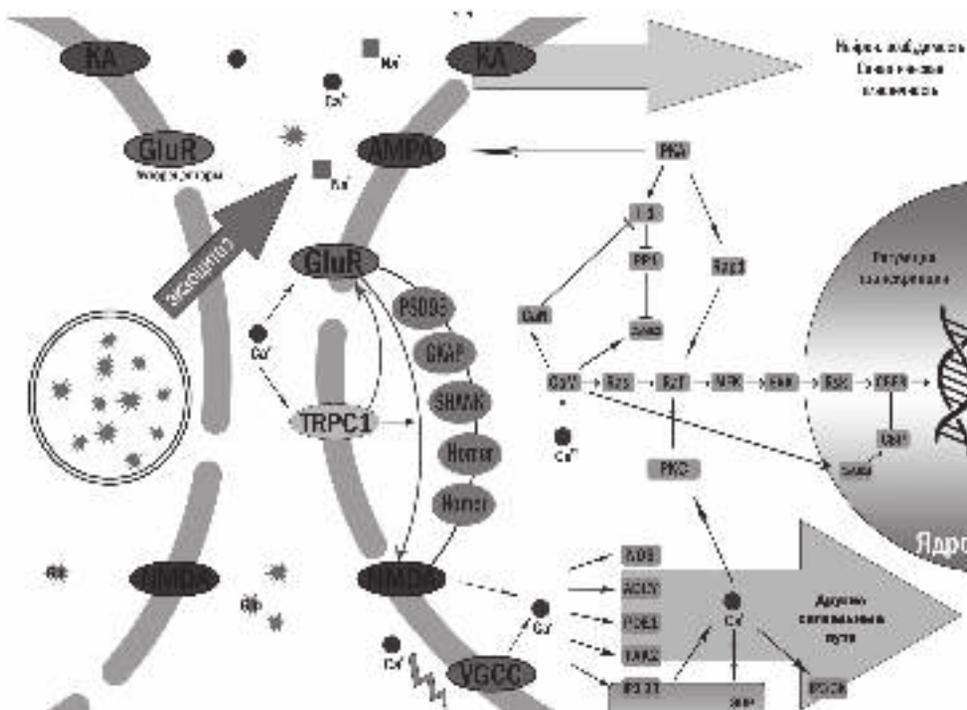
личения зависимой от активности CREB и Ca<sup>2+</sup> экспрессии гена митохондриальных переносчиков аспартата и глутамата.

Именно такой подход, учитывающий разнородность кальциопатий и затрагиваемых сигнальных путей, позволил начать исследования, направленные на изучение возможных этиопатогенетических методов лечения пациентов с нейропсихиатрическими заболеваниями [40].

**Роль взаимодействия Ca<sup>2+</sup>, кальмодулина (CaM) и CaM-киназы**

Помимо Ca<sup>2+</sup> и кальциевых и IP<sub>3</sub>-рецепторов одну из ключевых ролей в патогенезе PAC играет белок

кальмодулин (кальций-модулирующий протеин или CaM), который вызывает передачу сигналов к дополнительным CaM-киназам [20]. С кальмодулином связываются кальциевые эффекты, наблюдаемые в рамках постсинаптического функционирования, в частности, возбуждения. Глутаминовая кислота, в свою очередь, вызывает кальциевые токи в постсинаптическом окончании посредством связывания с N-метил-D-аспаратными (NMDARs) рецепторами и с метаботропными глутаматными рецепторами (рисунок) [31], которые инициируют выделение внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> из депо [20]. После связывания Ca<sup>2+</sup> CaM может привести к активации CaMKII или CaMK-киназы (CaMKK2). Помимо данных каскадов реакций следу-



**Рисунок.** Краткое схематичное изображение основных звеньев кальциевых сигнальных путей, участвующих в патогенетических механизмах PAC (пресинаптическая мембрана — справа; постсинаптическая — слева). AMPA — рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропиононовой кислоты; NMDA — рецепторы N-метил-D-аспартата; GluR — глутаматные рецепторы; KA — каинатный рецептор, VGCC — потенциал-зависимые кальциевые каналы; TRPC1 — катионный канал транзиторного рецепторного потенциала 1; Glu — глутамат; Ca<sup>2+</sup> — ионы кальция; Na<sup>+</sup> — ионы натрия; PSD95 — поддерживающий белок постсинаптической плотности; GKAP — белок, связанный с гуанилаткиназой; SHANK — белок, содержащий повторяющиеся SH3 и множественные анкириновые домены; Homer — адаптерные белки семейства Homer; NOS — синтаза оксида азота; ADCY — аденилатциклаза; IP3 3R — рецепторы инозитол-1,4,5-трифосфата; IP3 3K — инозитолтрифосфат-3-киназа; CaM — кальмодулин; CaN — каталитическая субъединица 2B серин/треониновой протеинфосфатазы; CaMK2/4 — кальций/кальмодулин-зависимые протеинкиназы 2/4; PDE1 — кальций/кальмодулин-зависимые 3',5'-фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов; FAK2 — протеин-тирозин киназа; PP1 — каталитическая субъединица PP1 серин/треониновой протеинфосфатазы; I-1 — регуляторная субъединица 1A протеинфосфатазы 1; PKA — протеинкиназа A; Rap1 — Ras-связанный протеин Rap-1A; PCK — классическая протеинкиназа C тип альфа; Ras — Hras ГТФаза; Raf — Braf протоонкогенная серин/треониновая протеинкиназа; MEK1/2 — киназа митоген-активируемой протеинкиназы 1; ERK1/2 — киназа митоген-активируемой протеинкиназы 1/3; Rsk — рибосомальный протеин-S6-киназа альфа-1/2/3/6; CBP — циклический аденозинмонофосфат-зависимый транскрипционный фактор ATF; CBP — E1A/CREB-связывающий белок; ЭПР — эндоплазматический ретикулум (содержащей депо ионов кальция).

ет отметить тот факт, что нейронное возбуждение параллельно может также вызывать новую транскрипцию мРНК, или так называемое возбуждение транскрипции. Среди нескольких путей, происходящих с возбуждением транскрипции, активация каналов  $\text{Ca}^{2+}$  L-типа в плазматической мембране может инициировать сигнальный путь, который в конечном счете увеличивает ядерное CREB-фосфорилирование и, в большинстве случаев, экспрессию генов немедленного реагирования [41].

СаМКII расположена в основном в шипиках и дендритах возбуждающих нейронов [42]. Активность СаМК наиболее выражено регистрируется в тканях мозга, по сравнению с другими тканями, роль СаМК рассматривается в качестве одной из самых важных в процессах формирования нейропсихиатрических расстройств [43]. Значимость СаМК обусловлена тем, что данные киназы являются основными регуляторами синаптической пластичности, экспрессии генов и ремоделирования цитоскелета, что приводит к контролю за широким спектром функций мозга. Структура киназ состоит из домена, который содержит сайт для связывания АТФ, регуляторный домен (содержащий  $\text{Ca}^{2+}$ /СаМ-связывающий домен и аутоингибирующий домен), вариабельный домен и «самоассоциированный» домен, ответственный за формирование мультимеров. Таким образом, типичная киназа представляет собой додекамер, который связывается через «самоассоциированный» домен каждой субъединицы [44]. Когда концентрация внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  возрастает, активный комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ /СаМ связывается с  $\text{Ca}^{2+}$ /СаМ-связывающим доменом одной из субъединиц, и это вызывает высвобождение соседнего аутоингибирующего домена. Данная цепочка взаимодействий приводит к активации СаМКII.

СаМК-киназы (киназы киназ) же активирует другие киназы, такие как АКТ и АМПК, путем фосфорилирования. Их активация требует связывания  $\text{Ca}^{2+}$ /СаМ с их уникальным  $\text{Ca}^{2+}$ /СаМ-связывающим доменом, и на сегодняшний день неизвестны точные данные о том, как динамика  $\text{Ca}^{2+}$  физиологически активирует этот уникальный  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый каскад фосфорилирования [43].

Среди группы СаМ-киназ наиболее изученными и представляющими интерес для исследователей долгое время были, в первую очередь,  $\alpha$ СаМКII и  $\beta$ СаМКII, что обусловлено их значительной ролью в пластичности глутаматергических нейронов. Во взрослой нервной системе преобладают  $\alpha$  и  $\beta$ -изоформы СаМКII. Количество белков СаМКII составляет 1–2% от общего количества белка в гиппокампе. Хотя указанные бел-

ки достаточно распределены в тканях гиппокампа, наибольшая их концентрация встречается в постсинаптической плотности [43]. К тому же получение СаМКII путём аутофосфорилирования рассматривается в качестве молекулярного механизма памяти, так как способствует сохранению активности синапса.

$\gamma$ СаМКII долгое время не рассматривался как киназа, способная оказывать влияние на нервные клетки. Однако в 2014 г. было продемонстрировано, что в симпатических нейронах после стимуляции/деполяризации происходит перенос  $\gamma$ СаМКII к ядру [45]. Соотношения  $\gamma$ СаМКII в ядре с цитоплазматическим коррелировало с отношением СаМКII, что указывает на то, что  $\gamma$ СаМКII действительно может отвечать за перенос  $\text{Ca}^{2+}$ /СаМ в ядро. Необходимость СаМКII для нормального функционирования синаптической системы стала очевидной для исследователей [46]. Активные формы кальмодулина связываются с субъединицами СаМКII и тем самым опосредуют реакцию аутоингибирования, которая приводит к аутофосфорилированию и активизации киназ [40]. Активация СаМКII-киназы является неотъемлемой частью формирования долговременного потенцирования (LTP), лежащего в основе таких фундаментальных процессов для ЦНС, как поведение, обучение и память [47]. Удаление СаМКII $\alpha$  или ингибирование процесса связывания СаМ и  $\text{Ca}^{2+}$  с СаМКII, приводит к ингибированию возбуждения долговременной потенциации в синапсах [47]. LTP, зависящая от СаМКII, имеет под собой несколько молекулярных механизмов, таких как накопление мРНК, увеличение постсинаптического  $\text{Ca}^{2+}$ , активация СаМКII $\alpha$ , образующих додекамерные структуры (они связываются с постсинаптическими белками, в частности, NMDA-рецепторов), активация фосфорилирования СаМКII и увеличение проводимости рецептора AMPA, а также дополнительная регуляция фосфорилирования TARP (трансмембранного белка, взаимодействующего с рецептором AMPA) [48].

Помимо этого, значимая роль СаМКII определяется во взаимодействии с такими элементами цитоскелета, как F-актин,  $\alpha$ -катинин и белок PSD Densin-180 (который в свою очередь ответственен за сигнализацию  $\text{Ca}^{2+}$  (V) 1.2 [47]). СаМКII, как киназа, выполняет функцию структурного белка. В случае F-актина — СаМКII (находится в постсинаптической плотности) связывает F-актин за счёт  $\beta$ -субъединицы [46]. Находящийся в шипиках СаМКII $\beta$ , связанный с F-актином, предотвращает взаимодействие F-актина с актин-модулирующими белками. После активации СаМКII СаМКII $\beta$  отделяется от F-актина посредством механизма аутофосфорилирования, который позволяет вза-

имодействовать F-актину и актин-модулирующим белкам, а также инициирует последующее ремоделирование F-актина.

Таким образом, основной задачей киназ является регулирование размеров шипиков дендритов, долговременного потенцирования, синаптической пластичности посредством связывания и регулирования рецепторов [42, 46]. Кроме того, накопленные доказательства демонстрируют, что CaMKII участвует в фосфорилировании субъединиц ГАМК и регулирует поток ГАМК через синаптическую мембрану [43]. Поскольку ГАМК является основным тормозным нейромедиатором, эти данные показывают, что CaMKII играет важную роль как для возбуждающей, так и для тормозной передачи сигнала.

CaM также активирует CaMKK2, чья активность является ключевой в процессах формирования пространственной памяти и последующей активации дополнительных киназ. CaMKI является передатчиком, стимулирующим движение конуса роста нейрона, необходимого для удлинения и древовидного разветвления нейронов [49]. Так же фосфорилирование CaMKIV приводит к увеличению экспрессии генов и синтезу белка, что является, в том числе, необходимым элементом процессов формирования контекстуального страха [50]. CaMKK2 фосфорилирует другие киназы, такие как АМФ-активируемую протеинкиназу (АМПК), активность которой необходима для регулирования потребления энергии, которая требуется для «рутинного» функционирования мозга [51]. В свою очередь АМПК-сигнальный путь (АМФ-активируемая протеинкиназа) зависит от  $Ca^{2+}$  в связи с работой рецепторов адипонектина и взаимосвязан с mTOR-сигнальным путём (или путь протеинкиназы серин-треониновой специфичности — белок мишени рапамицина у млекопитающих), который является основным в патогенезе синдромальных и несиндромальных форм РАС [24, 26].

Так, например, такие гены, как *CaMKI* и *CaMKIV*, были рассмотрены среди генов, которые были особенно необходимы для кальциемодулин-связанного сигнального пути [52] и нарушения в которых чаще всего наблюдаются при РАС. Данные представления дают возможность с уверенностью говорить о том, что нарушения в сигнальных путях с участием кальция и CaM приводят к патологии неврологических процессов, влияя на различные синаптические характеристики, нейротрансмиссию посредством регуляции возбуждающих и ингибирующих рецепторов, а также через важнейшие биологические функции клеток, такие как долговременная потенциация и долгосрочная память. Дефицитные нарушения в сигнальных путях CaM и

его «разветвляющихся» каскадах могут быть причиной множества нейропсихиатрических состояний из-за их широкого влияния на множественные биологические системы, а более конкретно — на регуляцию нейротрансмиссии и синаптические характеристики.

На данный момент разрабатываются методики, позволяющие проводить фармакологическое ингибирование CaMKK2 в рамках лечения неалкогольной жировой болезни печени, что даёт возможность предполагать, что в скором времени будет возможна таргетная терапия и при РАС [53]. Если учитывать центральную роль  $Ca^{2+}$  и CaM-сигнальных путей в функционировании синапсов и взаимосвязях нейронов, то логичным было бы предположить, что нарушения в данных молекулярных путях могут приводить к аутистической симптоматике, как и в случае изолированных форм кальциопатии.

### **Проблемы изучения нарушений кальциевой сигнализации при РАС**

На сегодняшний день всё ещё технически трудно выполнить процесс дифференциации таких фундаментальных нарушений (например, таких как изменение LTP) у людей, страдающих РАС, тогда как на моделях мышах с РАС уже обнаружена достоверная связь с нарушением кальциевой сигнализации [52].

Понимание значимости роли кальциевой сигнальной передачи в развитии РАС пока находится в стадии развития, по сравнению с таким уже относительно изученным сигнальным путём, как Wnt-сигнальный путь и другие, ранее упомянутые сигнальные пути. По этой причине сейчас приобрели популярность такие исследования, в которых методом исследования стала транскраниальная магнитная стимуляция (ТМС), позволяющая оценить изменения LTP подобно синаптической пластичности у людей, страдающих РАС [50]. Так, исследователи смогли провести ТМС в различных областях коры головного мозга, исследуя двигательные потенциалы. У людей с РАС не было обнаружено изменений потенциалов в исследуемых зонах, тогда как у нейротипичных людей из группы контроля (то есть людей без нейропсихиатрических и неврологических заболеваний) данные потенциалы фиксировались. Таким образом, в данном исследовании был обнаружен «дефицит пластичности», который напоминает дефицитные нарушения LTP. Такие исследования не стали единичными, и последующие наблюдения лишь подтвердили аналогичные дефицитные нарушения в отношении нейронной сети у пациентов с РАС [11, 23, 30]. Исследования проводились с помощью регистрации изменений электроэнцефалографических сиг-

налов после различных сенсорных стимулов у людей с РАС. Такие изменения связываются с нарушениями в кальциевой сигнализации.

Хотя исследование сигнальной передачи кальция в человеческом мозге является одной из сложнейших задач, уже сейчас получены данные об изменениях передачи сигнала кальция в клетках, полученных от людей с РАС. Было показано, что сигнальная передача, обусловленная  $\text{Ca}^{2+}$ , была нарушена в фибробластах кожи людей с РАС [8]. Также стало возможным моделирование заболеваний из группы расстройств аутистического спектра на плюрипотентных стволовых клетках для изучения патофизиологических процессов, происходящих в клетках [52]. Было проведено исследование на плюрипотентных стволовых клетках, выделенных из популяции клеток, полученных от людей, страдающих синдромом Тимоти — формы синдромального аутизма, при котором аутистическую симптоматику (РАС) можно наблюдать у 80 % диагностированных. Эти плюрипотентные стволовые клетки были дифференцированы в нейроны *in vitro*, что позволило обнаружить влияние нарушений кальциевой сигнализации, а также нарушения в транскрипции, зависящей от активности кальциевого пути. Хотя указанные исследования демонстрируют, что сигнализация  $\text{Ca}^{2+}$  и CaM участвует в патогенетических механизмах РАС, технически необходимо улучшить методы изучения и визуализации кальциевых изменений сигнализации для более корректного сопоставления влияния роли сигнализации  $\text{Ca}^{2+}$  и социального поведения, а также стереотипного поведения, которые являются клинической основой РАС.

Отдельную важную роль в исследовании влияния нарушений обмена  $\text{Ca}^{2+}$  и CaM-связывания на развитие патологических процессов нейроразвития при РАС сыграли работы, выполненные на животных моделях. Так, было выяснено, что *CaMKIV* обладает положительной регуляцией транскрипции FMRP (Fragile-X Mental Retardation Protein), который кодируется FXS [53]. В более позднем исследовании также было обнаружено, что одиночный нуклеотидный полиморфизм (SNP) в гене *CaMKIV* связан с более высоким риском развития РАС в европейской когорте. Данный SNP, по-видимому, расположен на связывающем участке фактора сплайсинга, и, по всей видимости, может изменять баланс между изоформами CaMKIV [54], что, как было показано выше, может иметь огромное значение из-за соотношения зон влияния субъединиц CaMK. Так было обнаружено что CaMKII $\alpha$ , регулирующий ак-

тивность mGluR5, является потенциальной мишенью при лечении FXS [54]. Пока до конца неясно, как активность CaMKII $\alpha$  влияет на нарушения активности mGluR5 при FXS, однако один из предложенных механизмов предполагает, что CaMKII $\alpha$  значительно повышен в синапсе мышей с-FXS, что могло вызвать гиперфосфорилирование поддерживающих белков Homer 1 (H1) и 2 (H2), что приводит к их диссоциации из-за mGluR5. Эта диссоциация позволяет короткому изомеру Homer1, H1 $\alpha$ , связывать mGluR5 и индуцировать лиганд-независимую активность рецептора [55]. Ингибирование mGluR5 у нокаутированных мышей *FMR1* улучшило процессы обучения и памяти, что подтвердило догадки о возможностях перспективного метода лекарственной терапии [55]. Необходимо отметить, что нарушения в поддерживающих белках группы Homer нередко встречаются у пациентов с РАС [56].

Несмотря на это, аналогичные исследования лекарственного подхода с использованием ингибирования mGluR5 и других связанных с ним путей у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, дали лишь частично положительные результаты [57]. В одном из клинических исследований было выяснено, что фенобам (селективный антагонист mGluR5) индуцировал улучшение преимпульсного ингибирования, но не влиял на избыточную импульсивность, наблюдаемую у пациентов с синдромом хрупкой X-хромосомы [58]. Другое клиническое исследование использования лития на небольшой выборке людей с синдромом хрупкой X-хромосомы продемонстрировало, что литий позволяет ослабить сигнальные пути, активируемые посредством mGluR5-сигнальных путей, что, в свою очередь, приводило к значительным улучшениям в сфере поведенческих процессов. Таким образом, были скорректированы такие симптомы, как гиперактивность и речевые нарушения, вместе с этим было отмечено усиление раздражительности и апатии.

Ещё одну форму синдромального аутизма, связываемую с нарушением регуляции кальциевой сигнализации, представляет собой синдром Ангельмана. Причиной развития данного синдрома рассматривается делеция материнского аллеля 15q13-11, включая ген *UBE3A*. На животной модели нулевой мутации материнского аллеля с *UBE3A* наблюдается нарушение аутофосфорилирования CaMKII $\alpha$ . Аутофосфорилирование необходимо для киназной активности, а также может быть ответственно за дефицит LTP в гиппокампе [59]. Вместе с тем было найдено, что CaMKII $\alpha$  взаимодействует непосредственно с поддерживающи-

## References

ми белками, которые связывают с развитием РАС. Так, с помощью методов иммунопреципитации для выделения СаМКП из разных фракций нейрональных клеток переднего мозга было показано, что СаМКП, помимо прочих поддерживающих белков, связывает Shank3 в синапсе, который, как известно, наиболее часто подвергается нарушениям при аутизме [60]. Наиболее известной (синдромальной) формой РАС с поражением гена *SHANK3* является синдром Фелан–МакДермид.

## Заклучение

Резюмируя всё вышеописанное, с уверенностью можно сказать, что кальциевая сигнализация является ключевым патогенетическим звеном в формировании РАС. Вовлечённость Са<sup>2+</sup> в развитие аутистической патологии становится всё очевиднее. Вне зависимости от влияния Са<sup>2+</sup> — прямым или опосредованным путём на другие сигнальные пути — его действие направлено на нарушение развития нейронов, синаптической пластичности, возбудимости нейронов. С тем же связано нарушение серотонинергической, дофаминергической, опиоидной, холинергической, глутаматергической, ГАМКергической передачи, что в свою очередь может приводить к явлению эксайтотоксичности за счёт гиперактивации NMDA- и AMPA-рецепторов, и как следствие к повреждению и гибели нейронов. Все эти процессы в нейрональных клетках напрямую связаны с формированием долговременного потенцирования и развитием депрессии, что приводит к дисфункции базисных психических процессов, таких как память, социальное взаимодействие и т.д.

Таким образом, с практической точки зрения кальциевый сигнальный путь может стать одной из основных мишеней для фармакологической коррекции симптоматических проявлений РАС. Очевидно, что дальнейшие исследования на животных и электрофизиологические исследования на людях всё же необходимы для понимания патогенетических механизмов развития РАС, а также какое именно место занимает сигнальный путь Са<sup>2+</sup> в данных состояниях. Дальнейшие исследования особенно необходимы, чтобы прояснить потенциальные роли сигнализации Са<sup>2+</sup> в социальном поведении или стереотипном поведении, которые составляют основные особенности РАС.

## Литература

## (п.п. 1-10; 12-60 см. References)

11. Николлс Д.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Д., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. Изд. 4-е, УРСС: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», М.: 2017.

1. Krey J.F., Dolmetsch R.E. Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca<sup>2+</sup> signaling. *Curr Opin Neurobiol.* 2007; 17: 112–19. doi: 10.1016/j.conb.2007.01.010
2. Wen Y., Alshikho M.J., Herbert M.R. Pathway Network Analyses for Autism Reveal Multisystem Involvement, Major Overlaps with Other Diseases and Convergence upon MAPK and Calcium Signaling. *PLoS One.* 2016; 11(4): e0153329. doi: 10.1371/journal.pone.0153329
3. Skafidas E., Testa R., Zantomio D., Chana G., Everall I. P., Pantelis C. Predicting the diagnosis of autism spectrum disorder using gene pathway analysis. *Mol. psychiatry.* 2014; 19(4): 504–10. DOI: 10.1038/mp.2012.126
4. David M.M., Erland D., Ozturk A., Daniels J., Jung J.Y., Diaz-Beltran L. et al. Comorbid Analysis of Genes Associated with Autism Spectrum Disorders Reveals Differential Evolutionary Constraints. *PLoS One.* 2016; 11(7): e0157937. doi: 10.1371/journal.pone.0157937
5. Christensen D.L., Bilder D.A., Zahorodny W., Pettygrove S., Durkin M.S., Fitzgerald R.T. et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among 4-Year-Old Children in the Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 2016; 37(1): 1–8. doi: 10.1097/DBP.0000000000000235
6. Fombonne E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr. Res.* 2009; 65(6): 591–8. doi: 10.1203/PDR.0b013e31819e7203
7. Pinto D., Delaby E., Merico D., Barbosa M., Merikangas A., Klei L. et al. Convergence of Genes and Cellular Pathways Dysregulated in Autism Spectrum Disorders. *Am. J. Hum. Genet.* 2014; 94(5): 677–94. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.03.018
8. APA. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, Fifth Edition (DSM-5®). 2013. pp. 87–105.
9. Schmunk G., Gargus J.J. Channelopathy pathogenesis in autism spectrum disorders. *Front Genet.* 2013; 4: 222. doi: 10.3389/fgene.2013.00222
10. Zeidán-Chuliá F., Rybarczyk-Filho J.L., Salmina A.B., De Oliveira B.H.N., Noda M., Moreira J.C.F. Exploring the multifactorial nature of autism through computational systems biology: calcium and the Rho GTPase RAC1 under the spotlight. *Neuromolecular medicine.* 2013; 5(2): 364–83. DOI: 10.1007/s12017-013-8224-3
11. Nikolls D.G., Martin A.R., Vallas B.D., Fuks P.A. *From neuron to brain [Ot neyrona k mozgu]*. Izd. 4-е, URSS: Knizhnyy dom “LIBROKOM”, Moscow: 2017. (in Russian)
12. Cortés-Mendoza J., de León-Guerrero S.D., Pedraza-Alva G., Pérez-Martínez L. Shaping synaptic plasticity: the role of activity-mediated epigenetic regulation on gene transcription. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2013; 31: 359–69. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2013.04.003
13. Napolioni V., Persico A.M., Porcelli V., Palmieri L. The mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1 and calcium homeostasis: Physiological links and abnormalities in autism. *Mol. Neurobiol.* 2011; 44(1): 83–92. Doi: 10.1007/s12035-011-8192-2
14. Schmunk G., Boubion B.J., Smith I.F., Parker I., Gargus J.J. Shared functional defect in IP3R-mediated calcium signaling in diverse monogenic autism syndromes. *Translational psychiatry.* 2015; 5(9): e643. DOI: 10.1038/tp.2015.123
15. Schmunk G., Nguyen R.L., Ferguson D.L., Kumar K., Parker I., Gargus J.J. High-throughput screen detects calcium signaling dysfunction in typical sporadic autism spectrum disorder. *Sci Rep.* 2017; 7: 40740. doi: 10.1038/srep40740

16. Gargus J.J. Genetic calcium signaling abnormalities in the central nervous system: seizures, migraines and autism. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1151 (1): 133–56. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03572.x
17. Schmunk G., Gargus J.J. The versatility and universality of calcium signalling. *Front Genet.* 2013; 4: 222. DOI: 10.1038/35036035
18. Takada Y., Hirano M., Kiyonaka S., Ueda Y., Yamaguchi K., Nakahara K. et al. Rab3 interacting molecule 3 mutations associated with autism alter regulation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell Calcium.* 2015; 58(3): 296–306. doi: 10.1016/j.ccca.2015.06.007
19. Ramachandran K.V., Hennessey J.A., Barnett A.S., Yin X., Stadt H.A., Foster E. et al. Calcium influx through L-type CaV1.2 Ca<sup>2+</sup> channels regulates mandibular development. *J Clin Invest.* 2013; 123: 1638–46. doi: 10.1172/JCI66903
20. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium (Collaboration). Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *The Lancet.* 2013; 381(9875): 1371–9. doi:10.1016/S0140-6736(12)62129-1
21. O’Roak B.J., Vives L., Girirajan S., Karakoc E., Krumm N., Coe B.P. et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature.* 2012; 485(7397): 246–50. doi: 10.1038/nature10989
22. Devi S., Markandeya Y., Maddodi N., Dhingra A., Vardi N., Balijepalli R.C. et al. Metabotropic glutamate receptor 6 signaling enhances TRPM1 calcium channel function and increases melanin content in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013; 26(3): 348–56. doi: 10.1111/pcmr.12083
23. Phan N.N., Wang C.Y., Chen C.F., Sun Z., Lai M.D., Lin Y.C. Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncol Lett.* 2017; 14(2): 2059–74. doi: 10.3892/ol.2017.6457
24. Oron O., Elliott E. Delineating the Common Biological Pathways Perturbed by ASD’s Genetic Etiology: Lessons from Network-Based Studies. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(4): E828. doi: 10.3390/ijms18040828
25. Magdalon J., Sánchez-Sánchez S.M., Griesi-Oliveira K., Sertié A.L. Dysfunctional mTORC1 Signaling: A Convergent Mechanism between Syndromic and Nonsyndromic Forms of Autism Spectrum Disorder? *Int J Mol Sci.* 2017; 18(3): E659. doi: 10.3390/ijms18030659
26. Ebrahimi-Fakhari D., Sahin M. Autism and the synapse: emerging mechanisms and mechanism-based therapies. *Curr Opin Neurol.* 2015; 28(2): 91–102. doi: 10.1097/WCO.0000000000000186
27. KEGG PATHWAY Database, *Metab. Clin. Exp.* 2007. URL: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
28. Okerlund N.D., Cheyette B.N. Synaptic Wnt signaling – a contributor to major psychiatric disorders? *J Neurodev Disord.* 2011; 3(2): 162–74. doi: 10.1007/s11689-011-9083-6
29. Dedic N., Pöhlmann M.L., Richter J.S., Mehta D., Czamara D., Metzger M.W. et al. Cross-disorder risk gene CACNA1C differentially modulates susceptibility to psychiatric disorders during development and adulthood. *Mol Psychiatry.* 2018; 23(3): 533–43. doi: 10.1038/mp.2017.133
30. Li B., Tadross M.R., Tsien RW. Sequential ionic and conformational signaling by calcium channels drives neuronal gene expression. *Science.* 2016; 351(6275): 863–7. DOI: 10.1126/science.aad3647
31. Yucel G., Altindag B., Gomez-Ospina N., Rana A., Panagiotakos G., Lara M.F. et al. State-dependent signaling by Cav1.2 regulates hair follicle stem cell function. *Genes Dev.* 2013; 27(11): 1217–22. doi:10.1101/gad.216556.113
32. Carayol J., Sacco R., Tores F., Rousseau F., Lewin P., Hager J. et al. Converging evidence for an association of ATP2B2 allelic variants with autism in male subjects. *Biol Psychiatry.* 2011; 70(9): 880–7. doi:10.1016/j.biopsych.2011.05.020
33. Prandini P., Pasquali A., Malerba G., Marostica A., Zusi C. Italian Autism Network (Collaboration) et al. The association of rs4307059 and rs35678 markers with autism spectrum disorders is replicated in Italian families. *Psychiatr Genet.* 2012; 22: 177–81. doi: 10.1097/YPG.0b013e32835185c9
34. Essa M.M., Braidy N., Vijayan K.R., Subash S., Guillemin G.J. Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer’s disease. *Neurotox Res.* 2013; 23(4): 393–400. doi: 10.1007/s11064-012-0799-9
35. Haydon P.G. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(3): 185–93. DOI: 10.1038/35058528
36. Fellin T., Pascual O., Haydon P.G. Astrocytes coordinate synaptic networks: balanced excitation and inhibition. *Physiology (Bethesda).* 2006; 21: 208–15. DOI: 10.1152/physiol.00161.2005
37. Menga A., Iacobazzi V., Infantino V., Avantiaggiati M.L., Palmieri F. The mitochondrial aspartate/glutamate carrier isoform 1 gene expression is regulated by CREB in neuronal cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015; 60: 157–66. doi: 10.1016/j.biocel.2015.01.004
38. Berger S.M., Bartsch D. The role of L-type voltage gated calcium channels Cav 1.2 and Cav 1.3 in normal and pathological brain function. *Cell Tissue Res.* 2014; 357(2): 463–76. doi: 10.1007/s00441-014-1936-3
39. Sandoval A., Duran P., Gandini M.A., Andrade A., Almanza A., Kaja S. et al. Regulation of L-type CaV1.3 channel activity and insulin secretion by the cGMP-PKG signaling pathway. *Cell Calcium.* 2017; 66: 1–9. doi: 10.1016/j.ccca.2017.05.008
40. Kabir Z.D., Lee A.S., Burgdorf C.E., Fischer D.K., Rajadhyaksha A.M., Mok E. et al. Cacna1c in the Prefrontal Cortex Regulates Depression-Related Behaviors via REDD1. *Neuropsychopharmacology.* 2017; 4(10) 2032–42. doi: 10.1038/npp.2016.271
41. Hell JW. CaMKII: claiming center stage in postsynaptic function and organization. *Neuron.* 2014; 81(2): 249–65. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.024
42. Takemoto-Kimura S., Suzuki K., Horigane S.I., Kamijo S., Inoue M., Sakamoto M. et al. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *J Neurochem.* 2017; 141(6): 808–18. doi: 10.1111/jnc.14020
43. Stratton M.M., Chao L.H., Schulman H., Kuriyan J. Structural studies on the regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II. *Curr Opin Struct Biol.* 2013; 23(2): 292–301. doi: 10.1016/j.sbi.2013.04.002
44. Wang X., Marks C.R., Perfitt T.L., Nakagawa T., Lee A., Jacobson D.A. et al. A novel mechanism for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to L-type Ca<sup>2+</sup> channels that initiates long-range signaling to the nucleus. *J Biol Chem.* 2017; 292(42): 17324–36. doi: 10.1074/jbc.M117.788331
45. Houston C.M., He Q., Smart T.G. CaMKII phosphorylation of the GABAA receptor: receptor subtype- and synapse-specific modulation. *J Physiol.* 2009; 587(10): 2115–25. doi: 10.1113/jphysiol.2009.171603
46. Arruda-Carvalho M., Restivo L., Guskjolen A., Epp J.R., Elgersma Y., Josselyn S.A. et al. Conditional Deletion of  $\alpha$ -CaMKII Impairs Integration of Adult-Generated Granule Cells into Dentate Gyrus Circuits and Hippocampus-Dependent Learning. *J Neurosci.* 2014; 34(36): 11919–28. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0652-14.2014
47. Achterberg K.G., Buitendijk G.H., Kool M.J., Goorden S.M., Post L., Slump D.E. et al. Temporal and region-specific requirements of

- $\alpha$ CaMKII in spatial and contextual learning. *J Neurosci*. 2014; 34(34): 11180–7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0640-14.2014
48. Huang L., Wang C., Zhao S., Ge R., Guan S., Wang J.H. PKC and CaMK-II inhibitions coordinately rescue ischemia-induced GABAergic neuron dysfunction. *Oncotarget*. 2017; 8(24): 39309–22. doi: 10.18632/oncotarget.16947
  49. Marcelo K.L., Means A.R., York B. The Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin/CaMKK2 Axis: Nature's Metabolic CaMshaft. *Trends Endocrinol Metab*. 2016; 27(10): 706–18. doi: 10.1016/j.tem.2016.06.001
  50. Ben-David E., Shifman S. Networks of Neuronal Genes Affected by Common and Rare Variants in Autism Spectrum Disorders. *PLoS Genet*. 2012; 8(3): e1002556. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002556>
  51. York B., Li F., Lin F., Marcelo K.L., Mao J., Dean A. et al. Pharmacological inhibition of CaMKK2 with the selective antagonist STO-609 regresses NAFLD. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 11793. doi: 10.1038/s41598-017-12139-3
  52. Yun S.H., Trommer B.L. Fragile X mice: reduced long-term potentiation and N-Methyl-D-Aspartate receptor-mediated neurotransmission in dentate gyrus. *J Neurosci Res*. 2011; 89(2): 176–82. doi: 10.1002/jnr.22546
  53. Jung N.H., Janzarik W.G., Delvendahl I., Münchau A., Biscaldi M., Mainberger F. et al. Impaired induction of long-term potentiation-like plasticity in patients with high-functioning autism and Asperger syndrome. *Dev Med Child Neurol*. 2013; 55(1): 83–89. doi: 10.1111/dmcn.12012
  54. Yazawa M., Dolmetsch R.E. Modeling Timothy syndrome with iPSC cells. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013; 6(1): 1–9. doi: 10.1007/s12265-012-9444-x
  55. Waltes R., Duketis E., Knapp M., Anney R.J., Huguet G., Schlitt S. et al. Common variants in genes of the postsynaptic FMRP signaling pathway are risk factors for autism spectrum disorders. *Hum Genet*. 2014; 133(6): 781–92. doi: 10.1007/s00439-013-1416-y
  56. Pop A.S., Gomez-Mancilla B., Neri G., Willemsen R., Gasparini F. Fragile X syndrome: a preclinical review on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists and drug development. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014; 231(6): 1217–26. DOI: 10.1007/s00213-013-3330-3
  57. Guo W., Ceolin L., Collins K.A., Perroy J., Huber K.M. Elevated CaMKII $\alpha$  and hyperphosphorylation of Homer mediate circuit dysfunction in a Fragile X Syndrome mouse model. *Cell Rep*. 2015; 13(10): 2297–311. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.013
  58. Schaefer T.L., Davenport M.H., Erickson C.A. Emerging pharmacologic treatment options for fragile X syndrome. *Appl Clin Genet*. 2015; 8: 75–93. doi: 10.2147/TACG.S35673
  59. Harony-Nicolas H., Kay M., Hoffmann J.D., Klein M.E., Bozdagi-Gunal O., Riad M. et al. Oxytocin improves behavioral and electrophysiological deficits in a novel Shank3-deficient rat. *Elife*. 2017; 6: e18904. doi: 10.7554/eLife.18904
  60. Kolevzon A., Angarita B., Bush L., Wang A.T., Frank Y., Yang A. et al. Phelan-McDermid syndrome: a review of the literature and practice parameters for medical assessment and monitoring. *J Neurodevelopmental Disorders*. 2014; 6: 39. doi: 10.1186/1866-1955-6-39

**Сведения об авторах:**

**Соловьева Надежда Валентиновна**, врач-психиатр, генеральный директор АО «Научный центр персонализированной медицины», e-mail: drsnv@yandex.ru;

**Чаусова Светлана Витальевна**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. общей патологии МБФ РНИМУ им. Пирогова, e-mail: svetlana\_chau@mail.ru;

**Кичук Ирина Викторовна**, канд. мед. наук, доцент каф. неврологии РНИМУ им. Пирогова, e-mail: mail2irina@mail.ru;

**Макарова Екатерина Владимировна**, врач-эндокринолог, науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ РК» Минздрава России, e-mail: gue-royal@inbox.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.9

**Иванов А.В.<sup>1</sup>, Вирюс Э.Д.<sup>1</sup>, Логинов В.И.<sup>1</sup>, Зими́на И.С.<sup>1</sup>, Бурдённы́й А.М.<sup>1</sup>,  
Александрин В.В.<sup>1</sup>, Кубатиев А.А.<sup>1,2</sup>**

## Метаболизм гомоцистеина на экспериментальных моделях гипергомоцистеинемии у грызунов. Часть 1: генетические модели

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

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

<sup>2</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России,  
125993, Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

Моделирование гипергомоцистеинемии на грызунах является одним из основных способов изучения роли гомоцистеина в патофизиологии различных заболеваний (инфаркта миокарда, инсультов, когнитивных нарушений, болезни Альцгеймера, почечной недостаточности и др.). В настоящем обзоре рассмотрены биохимические аспекты метаболизма гомоцистеина, генетические способы моделирования гипергомоцистеинемии на крысах и мышах и их влияние на метаболизм как самого гомоцистеина так и на связанные с ним метаболиты: метионин, цистеин, S-аденозилметионин, S-аденозилгомоцистеин.

**Ключевые слова:** гипергомоцистеинемия; моделирование; метаболизм; метионин; S-аденозилгомоцистеин

**Для цитирования:** Иванов А.В., Вирюс Э.Д., Логинов В.И., Зими́на И.С., Бурдённы́й А.М., Александрин В.В., Кубатиев А.А. Метаболизм гомоцистеина на экспериментальных моделях гипергомоцистеинемии у грызунов. Часть 1: генетические модели. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 118-124.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.118-124

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Кубатиев А.А., сбор и обработка материала – Иванов А.В., анализ и интерпретация данных – Вирюс Э.Д., Логинов В.И., выполнение эксперимента – Александрин В.В., Бурдённы́й А.М., редактирование – Зими́на И.С.

**Для корреспонденции:** *Иванов Александр Владимирович*, e-mail: ivanov\_av82@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10340).

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

Поступила 22.10.2020

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

**Ivanov A.V.<sup>1</sup>, Virus E.D., Loginov V.I.<sup>1</sup>, Zimina I.S.<sup>1</sup>, Burdenny A.M.<sup>1</sup>, Alexandrin V.V.<sup>1</sup>, Kubatiev A.A.<sup>1,2</sup>**

## Homocysteine metabolism in rodent models with hyperhomocysteinemia. Part 1: genetic models

<sup>1</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology,

Baltiyskaya Str. 8, Moscow, 125315, Russia;

<sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuous Professional Education,

Barrikadnaya Str., 2/1, bld. 1, Moscow, 125993, Russia

Modeling hyperhomocysteinemia in rodents is a common way to study the role of homocysteine in pathogenesis of various diseases (myocardial infarction, stroke, cognitive impairment, Alzheimer's disease, kidney failure, etc.). This review focuses on biochemical aspects of homocysteine metabolism, genetic methods for modeling hyperhomocysteinemia in rats and mice, and effects of these models on metabolism of both homocysteine itself and related metabolites (methionine, cysteine, S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine).

**Keywords:** homocysteine; hyperhomocysteinemia; modeling; metabolism; methionine S-adenosylhomocysteine

**For citation:** Ivanov A.V., Virus E.D., Loginov V.I., Zimina I.S., Burdenny A.M., Alexandrin V.V., Kubatiev A.A. Homocysteine metabolism in rodent models with hyperhomocysteinemia. Part 1: genetic models. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2020; 64(4): 118-124. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.118-124

**For correspondence:** *Ivanov Alexander Vladimirovich*, Ph.D., Leading Researcher, Laboratory of Regulation of the Aggregate State of Blood of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of NIOPP", e-mail: ivanov\_av82@mail.ru

**Contribution:** research concept and design – Kubatiev A.A., collection and processing of material – Ivanov A.V., analysis and interpretation of data – Virus E.D., Loginov V.I., execution of the experiment – Alexandrin V.V., Burdenny A.M., editing – Zimina I.S.

**Acknowledgment.** This work was presented with the support of the Russian Science Foundation (project 16-15-10340).

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest.

**Information about the authors:**

Ivanov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2424-6115>

Virus E.D., <https://orcid.org/0000-0001-9371-6494>

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

Zimina I.S., <https://orcid.org/0000-0003-3304-4686>

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

Alexandrin V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4625-6522>

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Received 22.10.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

Роль гомоцистеина (Гцис) в развитии широкого круга патологий, в первую очередь сердечно-сосудистых заболеваний, начали исследовать ещё в 60-е годы XX века, когда обнаружили связь его аномально высокого уровня в моче с многочисленными врожденными патологиями. Постоянно высокий уровень Гцис в плазме крови (гипергомоцистеинемия – ГГц) может быть обусловлен различными факторами и сам по себе представляет один из важных факторов развития атеросклероза, тромбоза, нейродегенеративных заболеваний и почечной недостаточности [1, 2]. Так, согласно клиническим метаанализам увеличение уровня Гцис на каждый 1 мкМ сопровождается повышением риска инсульта или инфаркта на 6-7%, а снижение этого показателя на каждые ~ 3 мкМ снижает риск инсульта на 19-24%, риск ишемической болезни сердца на 11% и инфаркта на 15% [3, 4].

Несмотря на высокий интерес к проблеме ГГц, механизмы, через которые опосредуется действие Гцис, пока недостаточно ясны, а данные клинических исследований недостаточны и противоречивы. Для исследования роли Гцис и молекулярных механизмов его цитотоксичности было разработано множество моделей ГГц на животных, прежде всего на мелких грызунах (крысы и мыши). В данном обзоре модели ГГц на более крупных млекопитающих рассматриваться не будут, внимание как к объектам моделирования будет уделено именно грызунам. Выбор этих животных определяется их широким использованием в экспериментальной медицине, низкой стоимостью их содержания, высокой плодовитостью, короткими сроками беременности и относительной легкостью моделирования, а также благодаря успехам генной инженерии и хорошо отлаженным методикам получения линейных животных. Механизмы возникновения ГГц в ис-

кусственной среде определяются различными факторами, в числе которых следует выделить генетические и факторы среды. Первые – связаны с различными генными aberrациями, возникающими спонтанно или в результате повреждения, вторые – связаны с питанием и фармакологическим стрессом. Также возможны сочетания двух групп факторов [5]. Хотя использование экспериментальных моделей ГГц позволило серьезно продвинуться в понимании механизмов действия Гцис, важно отметить, что модели имеют всё же серьезные ограничения в понимании полной картины, из-за отличий реальной клинической картины гипергомоцистеинемии. Большинство обзоров, посвященных этому вопросу, вышло уже около десяти лет назад [6,7] и не в полной мере отражают современное состояние проблемы. Данная часть обзора посвящена рассмотрению генетических моделей ГГц.

## Метаболизм гомоцистеина

1) *Метиониновый цикл и транссульфурация.* Метаболизм Гцис находится в тесной связи с метионином (Мет), холином, бетаином, фолатами и другими низкомолекулярными аминотиолами, включая цистеин (Цис) и глутатион (Глн). Образование Гцис проходит в одном из циклов обмена одноуглеродных соединений. Метиониновый цикл (**рис. 1**) представляет собой каскад преобразования метионина, при котором с участием АТФ на первом этапе из метионина образуется S-аденозилметионин (SAM). Далее при участии цитинозил-5-метилтрансферазы образуется S-аденозилгомоцистеин (SAH). Этот продукт с помощью аденозилгомоцистеиназы преобразуется в гомоцистеин. Важно отметить, что при избытке гомоцистеина в здоровом организме его часть превращается обратно в метионин путем реметилирования.

Передача метильных групп с SAM на многочисленные субстраты катализируется метилтрансфера-

зами (MTs). В качестве нуклеофила могут выступать ДНК, аминокислоты, катехоламины, белки и др. соединения. Как продукт этих реакций, SАН вызывает ингибирование MTs и тем самым играет большую роль в регуляции цикла, т.к. его  $K_1$  имеет тот же порядок, что и  $K_m$  SAM [8]. Утилизация SАН осуществляется SАН-гидролазой (SАНН).

Реметилирование Гцис проходит под действием метионинсинтазы (MS), и является точкой сопряжения метионинового цикла с метаболизмом фолатов, т.к. MS использует 5-метил-ТГФ в качестве субстрата. Также в этой реакции используется  $B_{12}$  (кобаламин) в качестве кофактора. В печени и митохондриях (где импорт 5,10-метилтен-ТГФ затруднен) значительную роль в реметилировании выполняет бетаин-гомоцистеин метилтрансфераза (BHMT) с использованием бетаина в качестве донора метильной группы.

Альтернативный вариант превращения Гцис проходит по т.н. пути транссульфурации и включает необратимую реакцию образования цистатионина при участии серина и цистатион-синтазы (CBS) и  $B_6$  (в форме пиридоксаль-5-фосфата). Цистатионин далее расщепляется цистатионин-гамма-лиазой (CSE) на цистеин (Цис) и -кетобутират. Цис, в свою очередь, участвует в образовании глутамина, а также вовлечён в процессы образования таурина и ацетил-СоА.

Внутриклеточное содержание Гцис является важным фактором в регуляции работы этих путей. Так, при низком содержании внутриклеточного Гцис преобладает синтез из него Мет, а при высоком содержании – образование Цис. Дополнительным регулятором процессов одноуглеродного обмена является SAM. Его роль заключается в поддержании собственного уровня в системе, участии в регуляции всех процессов

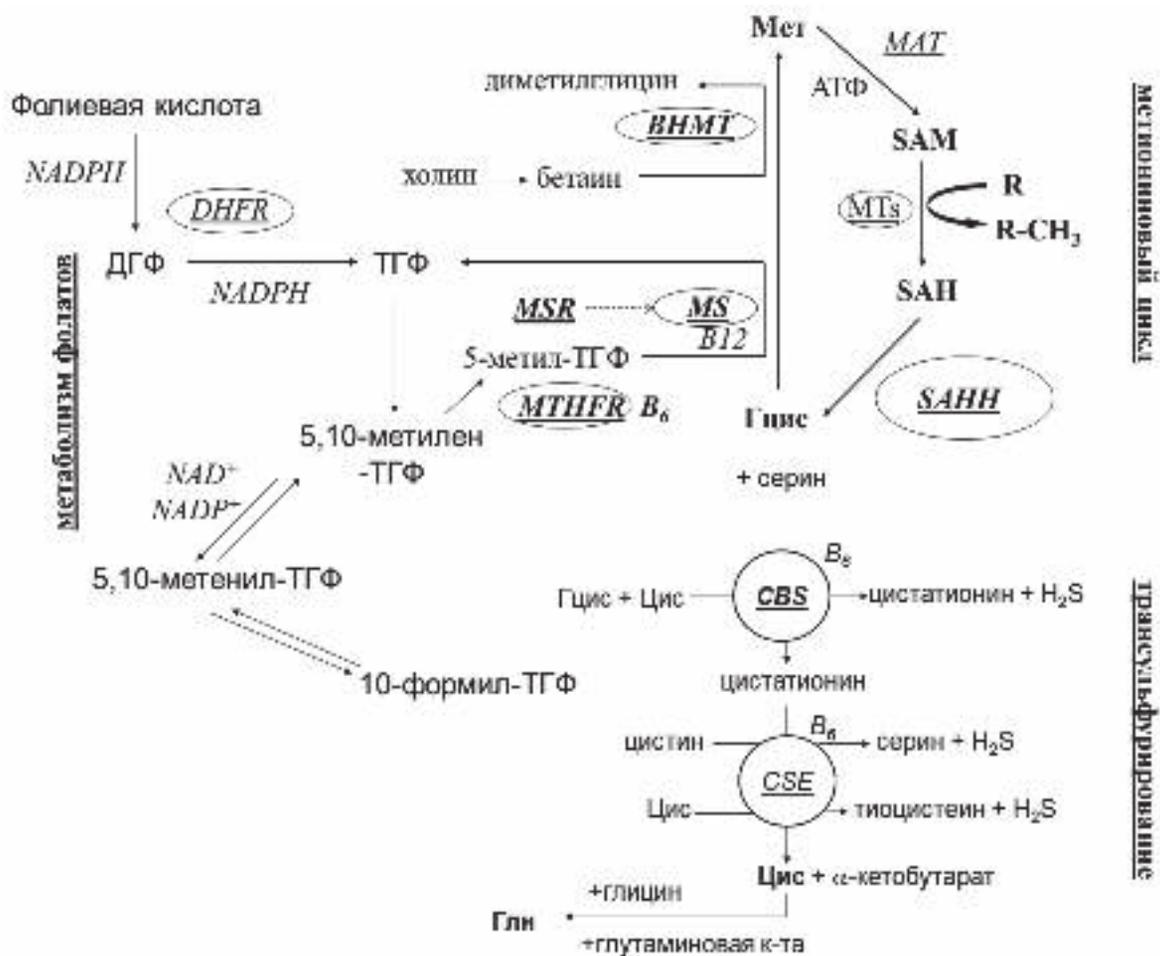


Рис. 1. Схема метаболизма гомоцистеина и фолатов.

обмена, а также ингибировании процесса реметилирования с активацией CBS [9].

2) *Метаболизм фолатов и гомоцистеина.* Фолиевая кислота является провитамином и участвует в процессе реметилирования Гцис. Таким образом, она должна быть восстановлена до ТГФ и далее до 5-метилТГФ чтобы осуществлять этот процесс (рис. 1). Фолиевая кислота, повышая скорость реметилирования и трансметилирования, не интенсифицирует транссульфурацию [10]. Попадая в клетку, фолиевая кислота восстанавливается дигидрофолатредуктазой до дигидрофолиевой кислоты (ДГФ) и далее до ТГФ при участии NADPH. Под действием серингидроксиметилтрансферазы (кофактор В<sub>6</sub>), ТГФ превращается в 5,10-метилтен-ТГФ, а серин при этом превращается в глицин. Метилтен-ТГФ дегидрогеназы (NAD<sup>+</sup> и NADP<sup>+</sup>-зависимые) катализируют переход 5,10-метилтен-ТГФ в 5,10-метенил-ТГФ. МетенилТГФ циклогидролаза катализирует обратимый переход 5,10-метенилТГФ в 10-формилТГФ. Кроме того, ТГФ может быть непосредственно превращен в 10-формилТГФ формат-ТГФ-лигазой с участием АТФ и муравьиной кислоты. 10-формил- и 5,10-метилтен-ТГФ используются в синтезе пуринов и тимидина соответственно.

Ещё одним ключевым ферментом фолатного цикла, который катализирует реакцию превращения 5,10-метилтен-ТГФ в 5-МТГФ при участии NADPH яв-

ляется МТНFR. Данный процесс является самым медленным в цикле фолатов. В регуляцию этого процесса, помимо SAM, также вовлечен ДГФ и вместе с фосфорилированием МТНFR оказывает ингибирующее влияние [11].

*Генетические модели.* Для того, чтобы разобраться какую роль играют нарушения в ключевых генах, вовлечённых в процесс одноуглеродного обмена, в развитии патогенетических состояний, связанных с нарушением экспрессии отдельных элементов цикла, реализованы модельные животные (преимущественно грызуны) с «нокаутом» отдельного гена в линии животных.

Экспериментально были разработаны модели гомо/гетерозиготного нокаута следующих генов (рис. 1 и табл. 1): CBS, МТНFR, MS, MSR, ВНMT и SAHH.

*Линии мышей, нокаутированные по MS, MSR.* Гены, кодирующие ферменты метионин синтазу (MS) и метионин синтазу редуктазу (MSR) являются ключевыми элементами всего цикла. Ген *MTR*, кодирующий MS участвует в образовании Met, запуская путь реметилирования [12]. Другой ген *MTRR*, кодирующий MSR, вместе с кобаламином участвует в синтезе метионина запуская другой путь. Данный процесс является жизненно важной функцией, поэтому нокаут по MS ведет к 100% летальности у гомозиготных животных [13], что обусловлено накоплением 5-метил-ТГФ и не-

Таблица 1

**Генетические и комбинированные модели ГТц мышей**

Модель	Диета		Уровень Гцис, мкМ	Ссылка
	Мет	Дефицит В <sub>9</sub>		
CBS <sup>-/-</sup>	-	-	>250	[23,26]
CBS <sup>+/-</sup>	-	-	5-28	[30]
CBS <sup>+/-</sup>	+	-	20-25	[30]
CBS <sup>+/-</sup>	-	+	16-25	[34]
CBS <sup>+/-</sup>	+	+	43-98	[30]
MS <sup>+/-</sup>	-	-	~5	[13]
MS <sup>+/-</sup>	-	+	10	[14]
MSR <sup>-/-</sup>	-	-	~18	[15]
МТНFR <sup>-/-</sup>	-	-	~30-40	[16,17,19]
МТНFR <sup>+/-</sup>	-	-	<15-20	[16,20]
МТНFR <sup>+/-</sup>	+	+	9	[21]
Протон-ассоциированный транспортер фолатов <sup>-/-</sup>	-	-	~135	[17]
ВНMT <sup>-/-</sup>	-	-	50	[33]
ВНMT <sup>-/-</sup>	-	+	60-80	[33]

способностью осуществлять синтез пуринов. Гетерозиготы по *MS* характеризовались нормальным развитием, а также нормальным уровнем Гцис (~5 мкМ) и высоким уровнем Мет в плазме, кроме того, повышением уровня SAM и снижением уровня SAH в печени [13, 14]. На фоне дефицита витамина B<sub>9</sub> у *MS*<sup>+/-</sup> мышей развивалась мягкая ГГц (~10 мкМ [15]).

Животные *MSR*<sup>+/-</sup> характеризовались нормальным развитием, несмотря на значительное снижение уровня экспрессии этого гена (1-37% от нормы), умеренной ГГц (~18 мкМ) и сходными изменениями протон-ассоциированного транспортера фолатов. Блокирование («нокаут») ключевого фермента метаболизма фолатов, кодируемого геном *MTHFR*, у мышей, гомозиготных по данному гену, сопровождался умеренной ГГц (около 30-40 мкМ) из-за снижения уровня 5-метил-ТГФ, главным образом продуцируемого в мозге и печени [16, 17]. У животных также наблюдалось снижение выживаемости [18]. Для них была характерна гипометионинемия (из-за снижения реметилирования Гцис), снижение уровня SAM и возрастанием уровня SAH в печени [19]. Интересно отметить, что, несмотря на однонаправленное влияние «нокаута» *MS* и *MSR* на реакцию реметилирования Гцис, эти вмешательства вызывали кардинально различные изменения глобального индекса метилирования.

**2) Линии грызунов *MTHFR*<sup>+/-</sup>** характеризовались мягкой ГГц (до 15-20 мкМ), а также снижением SAM/SAH в плазме и нормальной выживаемостью [16, 20]. В отличие от линии *CBS*<sup>+/-</sup>, эти мыши были более устойчивы к метиониновой нагрузке, но более чувствительны к дефициту витамина B<sub>9</sub> [21].

При нокауте гена протон-ассоциированного транспортера фолатов у мышей *C57BL/6* развивалась выраженная ГГц (~135 мкМ), сопровождавшаяся значительным повышением уровня N-гомоцистеинилирования плазмы (~60 мкМ против ~2 мкМ у обычных мышей). В печени также происходило значительное увеличение этих показателей (с ~100 до ~1500 и с 90 до 320 нмоль/г белка соответственно) [17].

**3) Линии мышей, нокаутированные по генам *CBS* и *CSE*.** Особенностью этих моделей является то, что они не только оказывают непосредственное влияние на транссульфурирование, но сильно влияют на метаболизм физиологического вазодилатора H<sub>2</sub>S. Нокаут гена *CBS* у мышей линии *C57BL/6* был одной из первых моделей гомоцистинурии. Она сопровождалась у гомозигот тяжелой ГГц (>200 мкМ) [22]. В спинномозговой жидкости также наблюдался 25-кратный рост уровня Гцис. При этом не было отмечено значимого изменения уровней Цис и Глн в плазме крови и спин-

номозговой жидкости. Эта модель характеризовалась задержкой роста и небольшим сроком жизни мышей (3-5 нед) [23].

Дальнейшим развитием данных исследований в этом направлении стала разработка трансгенной модели *CBS*<sup>+/-</sup>, в которой к нокауту родного гена была добавлена трансфекция модифицированного гена *CBS* человека (*Tg*), активность которого могла регулироваться диетической добавкой цинка [24]. Это позволило решить проблему высокой ранней летальности животных. При нормальном содержании цинка модель давала умеренную ГГц (25-90 мкМ), а на обедненной цинком диете – тяжелую ГГц (~170 мкМ [24], при этом у гетерозиготы *CBS*<sup>+/-</sup>-*Tg* не отмечалось ГГц [26]. При замене «дикого» человеческого гена *CBS* на дефицитный *I278T* была получена модель тяжелой хронической ГГц (более 250 мкМ) с низкой ранней летальностью [23, 26]. Уровень Цис в плазме у них был в 2 раза ниже нормы, а уровень Мет – в 1,8 раз выше. За счет большей тяжести ГГц «*CBS*<sup>+/-</sup>-*Tg I278T* мыши» характеризовались снижением веса, остеопорозом, дистрофией жировой ткани, что не наблюдалось при более мягкой ГГц у мышей *CBS*<sup>+/-</sup>, со встроенным нормальным геном *CBS* человека. Но даже у *CBS*<sup>+/-</sup>-*TgI278T* мышей не наблюдалось спонтанного тромбообразования, которое характерно для гомоцистинурии из-за недостаточности *CBS* у человека [27]. У *CBS*<sup>+/-</sup> и *CBS*<sup>+/-</sup>-*TgI278T* мышей наблюдалось повышение уровня N-гомоцистеинилирования в плазме крови (15-17 мкМ при норме ~2 мкМ), а также в печени (около 1900 нмоль/г белка при нормальном содержании около 160 нмоль/г белка). В печени при этом рост уровня Гцис был ещё более выраженным, чем в плазме крови (с 75 до 5680 нмоль/г белка) [17].

Мыши *CBS*<sup>+/-</sup>, содержащиеся на стандартной диете в течение 8-20 нед [28,29], имели 50%-снижение активности *CBS* и незначительный подъем уровня Гцис (до 9-15 мкМ), а на обедненной витамином B<sub>9</sub> – 11 мкМ, на обогащенной Мет – 20-25 мкМ, а при их комбинации – 43-95 мкМ [6,30]. Теми же авторами было показано, что это сопровождалось ростом содержания SAH в головном мозге (до ~130 нмоль/г) и печени (до ~8 нмоль/г), при этом уровень SAM в этих органах не отличался от такового группы обычных мышей *C57BL/6* находившихся на стандартной диете. Поэтому значение SAM/SAH было значительно снижено (в печени – с 2,5 до 0,7 и в мозге – с ~8,5 до 4,5).

Нокаут гена *CSE* у мышей *C57BL/6* также приводил к тяжелой ГГц (~180 мкМ в плазме крови) и 7-кратному возрастанию его уровня в спинномозговой жидкости [22], при этом существенных изменений уровня Цис и Глн в этих жидкостях при этом не наблюдалось.

4) SAHH На модели повышенной активности SAHH у мышей CBS<sup>-/-</sup> не было выявлено существенного влияния повышения её активности на уровень Гцис, а также Мет в плазме, SAM и SAH в печени и почках [31]. У мышей SAHH<sup>+/-</sup> - ApoE<sup>-/-</sup> наблюдалось повышение уровня SAH в плазме с 30 до 55-60 нМ, а индекс метилирования падал с ~1.3 до 0,5-0,6 [32].

5) BHMT. Модель мышей BHMT<sup>-/-</sup> линии C57BL/6 была использована в работе [33]. Она характеризовалась умеренной ГГц, с существенно более высоким уровнем Гцис в плазме крови (~50 мкМ), чем при дефиците холина. В печени также наблюдался выраженный (6-кратный) рост содержания Гцис. Добавление В<sub>9</sub> в рацион таких мышей не приводило к значимому снижению уровня Гцис, как и депривация В<sub>9</sub> [33]. Там же было показано, что в печени наблюдалось значительное падение редокс-статуса глутатиона и глобального индекса метилирования. Индекс метилирования ДНК в гепатоцитах снижался на 76% за 1 год жизни животных.

### Заключение

Нарушение функционирования ферментов метионинового цикла, транссульфурирования, метаболизма фолатов и бетаина приводит к ГГц той или иной степени. Было разработано множество генетических моделей, которые позволили выявить роль отдельных ферментов в обмене Гцис и связанных с ним метаболитов, а также установлено, что повышение уровня Гцис может сопровождаться специфичными паттернами фолатов, SAM и SAH. Все это играет важную роль в исследованиях клинической проблемы ГГц, что особенно актуально при выявлении прямых и опосредованных эффектов Гцис. К сожалению, в большинстве моделей ГГц ещё не достаточно исследован метаболизм Гцис, особенно на органном и тканевом уровнях. Поэтому одним из перспективных направлений здесь является разработка комбинированных моделей с тканеспецифичными (эндотелий, миокард, нейроны и глиальные клетки) мутациями генов.

Известно, что дефицит В<sub>6</sub> (кофактор для CBS и CSE) сам по себе не приводит к тяжелой ГГц, однако наиболее тяжелые генетические модели ГГц были получены на моделях CBS<sup>-/-</sup>, которые на сегодняшний день изучены наиболее подробно. И хотя эти модели характеризовались многочисленными патологиями, пока ещё не получена модель ГГц, удовлетворяющая клинической картине нарушений гемостаза при гомоцистинурии. Недавние исследования показали, что Гцис оказывает значительное влияние на регуляцию экспрессии CBS и CSE, опосредуемое механизмом ме-

тилирования этих генов. Это свидетельствует о необходимости проведения более подробных исследований влияния ГГц на транссульфурирование и метаболизм H<sub>2</sub>S. Однако пока не исследованы модели ГГц на основе мутаций генов отдельных MTs. Также практически не исследован вопрос о влиянии на метаболизм Гцис нарушений работы ферментов синтеза полиаминов и утилизации тиолактона Гцис.

### Литература

#### (п.п. 4 – 11; 13 – 34 см. References)

1. Каражанова Л.К., Жунуспекова А.С. Гипергомоцистеинемия как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний (обзор литературы). *Наука и здравоохранение*. 2016; 4: 129-44.
2. Круглова М.П., Иванов А.В., Введенская О.Ю., Кубатиев А.А. Гипергомоцистеинемия и хроническая болезнь почек. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 195-201.
3. Пизова Н.В., Пизов Н.А. Гипергомоцистеинемия и ишемический инсульт. *Медицинский совет*. 2017; 10: 12-7.
12. Бурденный А.М., Логинов В.И., Заварыкина Т.М., Брага Э.А., Кубатиев А.А. Молекулярно-генетические нарушения генов фолатного и гомоцистеинового обмена в патогенезе ряда многофакторных заболеваний. *Генетика*. 2017; 53(5): 526-40.

### References

1. Karazhanova L.K., Zhunuspekova A.S. Hyperhomocysteinemia as a factor in cardiovascular disease (literature review). *Nauka i Zdravookhranenie*. 2016; 4: 129-44. (in Russian)
2. Kruglova M.P., Ivanov A.V., Vvedenskaya O.Yu., Kubatiev A.A. Hyperhomocysteinemia and chronic kidney disease. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(4): 195-201. (in Russian)
3. Pizova N.V., Pizov N.A. Hyperhomocysteinemia and ischemic stroke. *Meditsinskiy sovet*. 2017; 10: 12-7. (in Russian)
4. Debreceni B., Debreceni L. The role of homocysteine-lowering B-vitamins in the primary prevention of cardiovascular disease. *Cardiovascular Therapeutics*. 2014; 32(3): 130-8.
5. Tinelli C., Di Pino A., Ficulle E., Marcelli S., Feligioni M. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor and Potential Nutraceutical Target for Certain Pathologies. *Front Nutr*. 2019; 24(6): 49. doi: 10.3389/fnut.2019.00049. PMID: 31069230; PMCID: PMC6491750
6. Dayal S., Lentz S.R. Murine models of hyperhomocysteinemia and their vascular phenotypes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008; 28(9): 1596-605.
7. Beard R.S.Jr., Bearden S.E. Vascular complications of cystathionine β-synthase deficiency: future directions for homocysteine-to-hydrogen sulfide research. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2011; 300(1): 13-26.
8. Finkelstein J.D. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1990; 1(5): 228-37.
9. Prudova A., Bauman Z., Braun A., Vitvitsky V., Lu S.C., Banerjee R. S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(17): 6489-94.
10. Stam F., van Guldener C., Ter Wee P.M., Jakobs C., de Meer K., Stehouwer C.D. Effect of folic acid on methionine and homocysteine metabolism in end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2005; 67(1): 259-64.

11. Yamada K., Strahler J.R., Andrews P.C., Matthews R.G. Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102(30): 10454-9.
12. Budenny A.M., Loginov V.I., Zavarykina T.M., Braga E.A., Kubatiev A.A. The role of molecular genetic alterations in the genes involved in folate and homocysteine metabolism in multifactorial diseases pathogenesis. *Genetika*. 2017; 53(5): 526-40. (in Russian)
13. Swanson D.A., Liu M.L., Baker P.J., Garrett L., Stitzel M., Wu J., Harris M., Banerjee R., Shane B., Brody L.C. Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 1058-65.
14. Dayal S., Devlin A.M., McCaw R.B., Liu M.L., Arning E., Bottiglieri T., Shane B., Faraci F.M., Lentz S.R. Cerebral vascular dysfunction in methionine synthase-deficient mice. *Circulation*. 2005; 112: 737-44.
15. Elmore C.L., Wu X., Leclerc D., Watson E.D., Bottiglieri T., Krupenko N.I., et al. Matthews R.G. Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase. *Mol. Genet. Metab.* 2007; 91: 85-97.
16. Chen Z., Karaplis A.C., Ackerman S.L., Pogribny I.P., Melnyk S., Lussier-Cacan S., et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10: 433-43.
17. Jakubowski H., Perla-Kaján J., Finnell R.H., Cabrera R.M., Wang H., Gupta S., Kruger W.D., Kraus J.P., Shih D.M. Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylolation in mice. *FASEB J.* 2009; 23(6): 1721-7.
18. Neves M.F., Endemann D., Amiri F., Virdis A., Pu Q., Rozen R., Schiffrin E.L. Small artery mechanics in hyperhomocysteinemic mice: effects of angiotensin II. *J. Hypertens.* 2004; 22: 959-66.
19. Matthews R.G., Elmore C.L. Defects in homocysteine metabolism: diversity among hyperhomocyst(e)inemia. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007; 45(12): 1700-3.
20. Mikael L.G., Wang X.L., Wu Q., Jiang H., Maclean K.N., Rozen R. Hyperhomocysteinemia is associated with hypertriglyceridemia in mice with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 2009; 98: 187-94.
21. Devlin A.M., Arning E., Bottiglieri T., Faraci F.M., Rozen R., Lentz S.R. Effect of Mthfr genotype on diet-induced hyperhomocysteinemia and vascular function in mice. *Blood*. 2004; 103: 2624-9.
22. Akahoshi N., Yokoyama A., Nagata T., Miura A., Kamata S., Ishii I. Abnormal Amino Acid Profiles of Blood and Cerebrospinal Fluid from Cystathionine  $\beta$ -Synthase-Deficient Mice, an Animal Model of Homocystinuria. *Biol Pharm Bull.* 2019; 42(6): 1054-7.
23. Jiang X., Yang F., Tan H., Liao D., Bryan R.M., Jr. Randhawa J.K., et al. Hyperhomocysteinemia impairs endothelial function and eNOS activity via PKC activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 2515-21.
24. Wang L., Jhee K.H., Hua X., DiBello P.M., Jacobsen D.W., Kruger W.D. Modulation of cystathionine  $\beta$ -synthase level regulates total serum homocysteine in mice. *Circ. Res.* 2004; 94: 1318-24.
25. Gupta S., Kühnisch J., Mustafa A., Lhotak S., Schlachterman A., Slifker M.J., Klein-Szanto A., High K.A., Austin R.C., Kruger W.D. Mouse models of cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency reveal significant threshold effects of hyperhomocysteinemia. *FASEB J.* 2009; 23: 883-93.
26. Gu S.X., Sonkar V.K., Katare P.B., Kumar R., Kruger W.D., Arning E., Bottiglieri T., Lentz S.R., Dayal S. Memantine Protects From Exacerbation of Ischemic Stroke and Blood Brain Barrier Disruption in Mild But Not Severe Hyperhomocysteinemia. *J. Am. Heart Assoc.* 2020; 9(4): e013368.
27. Kruger W.D., Gupta S. The effect of dietary modulation of sulfur amino acids on cystathionine  $\beta$  synthase-deficient mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2016; 1363: 80-90.
28. Weiss N., Heydrick S., Zhang YY, Bierl C, Cap A, Loscalzo J. Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine  $\beta$ -synthase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:34-41.
29. Baumbach G.L., C.D. Sigmund, T. Bottiglieri, S.R. Lentz, Structure of cerebral arterioles in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ. Res.* 2002; 91: 931-7.
30. Devlin A.M., Bottiglieri T., Domann F.E., Lentz S.R. Tissue-specific changes in H19 methylation and expression in mice with hyperhomocysteinemia. *J Biol. Chem.* 2005; 280(27): 25506-11.
31. Lee H.O., Wang L., Kuo Y.M., Andrews A.J., Gupta S., Kruger W.D. S-adenosylhomocysteine hydrolase over-expression does not alter S-adenosylmethionine or S-adenosylhomocysteine levels in CBS deficient mice. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2018; 15: 15-21.
32. Xiao Y., Xia J., Cheng J., Huang H., Zhou Y., Yang X., Su X., Ke Y., Ling W. Inhibition of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Induces Endothelial Dysfunction via Epigenetic Regulation of p66shc-Mediated Oxidative Stress Pathway. *Circulation*. 2019; 139(19): 2260-77.
33. Teng Y.W., Mehedint M.G., Garrow T.A., Zeisel S.H. Deletion of betaine homocysteine S-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon metabolism, resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas. *J Biol. Chem.* 2011; 286: 36258-67.
34. Symons J.D., Zaid U.B., Athanassios C.N., Mullick A.E., Lentz S.R., Rutledge J.C. Influence of folate on arterial permeability and stiffness in the absence or presence of hyperhomocysteinemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 814-18.

**Сведения об авторах:**

**Иванов Александр Владимирович**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ НИИОПП, e-mail: ivanov\_av82@mail.ru;

**Вирюс Эдуард Даниэлевич**, канд. хим. наук, вед. науч. сотр., лаб. функциональной протеомики и метаболомики ФГБНУ НИИОПП, e-mail: edwardvirus@yandex.ru;

**Логинов Виталий Игоревич**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. «Патогеномики и транскриптомики» ФГБНУ НИИОПП, e-mail: werwolf2000@mail.ru;

**Зимина Илья Сергеевна**, лаборант-исследователь лаб. функциональной протеомики и метаболомики ФГБНУ НИИОПП, e-mail: allakivi@gmail.com;

**Бурденный Алексей Михайлович**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. «Патогеномики и транскриптомики» ФГБНУ НИИОПП, e-mail: burdennyu@gmail.com;

**Валерий Васильевич Александрин**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ НИИОПП, e-mail: alexsandrinn-54@mail.ru;

**Аслан Амирханович Кубатиев**, акад. РАН, проф., доктор мед. наук, науч. руководитель ФГБНУ НИИОПП, зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО. e-mail: niiopp@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.248:616-092.18

Кытикова О.Ю., Новгородцева Т.П., Денисенко Ю.К., Антонюк М.В., Гвозденко Т.А.

## Взаимоотношения толл-подобных рецепторов и ядерных транскрипционных факторов при бронхиальной астме

ВФ ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, 690105, Владивосток, Россия, ул. Русская, 73-г

Бронхиальная астма (БА) является широко распространенным, хроническим, гетерогенным заболеванием. В течение последних нескольких лет клинические исследования предоставили новую информацию о фенотипировании, эндотипировании и вариантах лечения астмы. При всей эффективности традиционных методов лечения БА у ряда пациентов заболевание либо частично контролируется, либо не контролируется, несмотря на интенсивное, основанное на рекомендациях лечение. Данное состояние вопроса делает крайне актуальным дальнейшее изучение патогенеза хронического воспаления при БА для поиска и разработки новых терапевтических стратегий. Развитие и прогрессирование БА обусловлены активацией внутриклеточных сигнальных путей и генов воспаления в ответ на действие триггерных факторов. Внутриклеточными модуляторами воспалительной реакции на генном уровне являются ядерные транскрипционные факторы, к которым относят активирующий протеин-1 (activator protein-1, AP-1) и ядерный фактор каппа В (nuclear factor-каппа В, NF-κB), обладающие провоспалительной активностью. К внутриклеточным модуляторам относят также рецептор глюкокортикоидов (glucocorticoid receptor, GR) и рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) с противовоспалительной активностью. Взаимоотношения между провоспалительными и противовоспалительными ядерными транскрипционными факторами являются предметом пристального изучения в настоящее время, так как последние могут служить мишенью для разработки стратегий управления активностью воспалительного процесса, в том числе при БА. Важную роль в сигнальных механизмах воспалительной реакции играют толл-подобные рецепторы (TLRs), инициирующие воспаление через активацию NF-κB и AP-1. В то же время, TLRs обладают способностью модулировать экспрессию PPARs и GR, противовоспалительный механизм действия которых осуществляется за счет подавления активности NF-κB и AP-1. В данном обзоре суммированы современные взгляды на структуру, функцию ядерных транскрипционных факторов и TLRs, а также их участие в патогенезе хронического воспаления при БА. Регуляция взаимоотношений между TLRs и ядерными транскрипционными факторами может быть важной терапевтической мишенью при БА.

**Ключевые слова:** толл-подобные рецепторы; ядерные транскрипционные факторы; активирующий протеин-1; рецептор глюкокортикоидов; бронхиальная астма

**Для цитирования:** Кытикова О.Ю., Новгородцева Т.П., Денисенко Ю.К., Антонюк М.В., Гвозденко Т.А. Взаимоотношения толл-подобных рецепторов и ядерных транскрипционных факторов при бронхиальной астме. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64 (4): 125-133.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.125-133

**Для корреспонденции:** Кытикова Оксана Юрьевна, e-mail: kytikova@yandex.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Кытикова О.Ю., Новгородцева Т.П.; сбор и обработка материала – Кытикова О.Ю., Новгородцева Т.П., Денисенко Ю.К., Антонюк М.В., Гвозденко Т.А.; написание текста – Кытикова О.Ю.; редактирование – Новгородцева Т.П., Денисенко Ю.К.

**Финансирование.** Исследование проводилось за счет средств федерального бюджета в рамках государственного задания.

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

Поступила 10.11.2019

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Kytikova O.Yu., Novgorodtseva T.P., Denisenko Yu.K., Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A.

### Relationship of toll-like receptors and nuclear transcription factors in asthma

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment, Russian Str. 73-g, Vladivostok 690105, Russia

Bronchial asthma is a common, chronic and heterogeneous disease. During the last few years, clinical studies have provided new information about asthma phenotyping, endotyping, and therapeutic options. With all effectiveness of traditional asthma treatments, in a number of patients the disease is either controlled partially or not controlled, despite intensive, recommendation-based treatment. This makes further study of the pathogenesis of asthma-related chronic inflammation essential for developing new therapeutic strategies.

The development and progression of asthma are caused by activation of intracellular signaling pathways and inflammation genes in response to action of trigger factors. Intracellular modulators of the inflammatory response at the gene level are nuclear transcription factors, which include proinflammatory activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B). Intracellular modulators also include the glucocorticoid receptor (GR) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), which have an anti-inflammatory activity. The relationship between pro- and anti-inflammatory nuclear transcription factors is presently under close investigation since it may represent a target for strategies of managing the inflammatory process, including in asthma. Toll-like receptors (TLRs) play an important role in the signaling mechanisms that initiate inflammation through activation of NF- $\kappa$ B and AP-1. At the same time, TLRs can modulate the expression of PPARs and GR, which have an anti-inflammatory action due to suppressing the activity of NF- $\kappa$ B and AP-1. This review summarizes current views on the structure and function of nuclear transcription factors and TLRs, as well as their participation in the pathogenesis of chronic inflammation in asthma. Regulation of the relationship between TLRs and nuclear transcription factors may be an important therapeutic target in asthma.

**Keywords:** toll-like receptors; peroxisome proliferator-activated receptors; nuclear factor- kappa B; activator protein-1; glucocorticoid receptor; asthma.

For citation: Kytikova O.Yu., Novgorodtseva T.P., Denisenko Yu.K., Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A. Relationship of toll-like receptors and nuclear transcription factors in asthma. *Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 125-133. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.125-133

**For correspondence:** *Oxana Yu. Kytikova*, Doctor of Medical Sciences, Reseacher of laboratory of rehabilitative treatment, VB FSBSI "Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration" – Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment, Russian street, 73-g, Vladivostok, 690105, Russian Federation, e-mail: kytikova@yandex.ru

**Contributions:** concept and design of research – Kytikova O.Yu., Novgorodtseva T.P.; material collection and processing – Kytikova O.Yu., Novgorodtseva T.P., Denisenko Yu.K., Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A.; text writing: – Kytikova O.Yu.; editing – Novgorodtseva T.P., Denisenko Yu.K.

**Acknowledgment.** The study was carried out at the expense of the federal budget as part of the state assignment.

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

**Information about the authors:**

Kytikova O. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-5018-0271>

Novgorodtseva T.P., <http://orcid.org/0000-0002-6058-201x>

Denisenko Yu. K., <http://orcid.org/0000-0003-4130-8899>

Antonyuk M.V., <https://orcid.org/0000-0002-2492-3198>

Gvozdenko T.A., <https://orcid.org/0000-0002-6413-9840>

Received 10.11.2019

Accepted 16.10.2020

Published 26.10.2020

## Введение

Бронхиальная астма (БА) является хроническим, прогрессирующим, гетерогенным воспалительным заболеванием с сложным этиопатогенезом и высокой вариабельностью течения, обусловленными влиянием генетических и экологических факторов [1]. Несмотря на эффективность традиционных методов лечения БА, у ряда пациентов сохраняются частые обострения при быстро прогрессирующем ухудшении легочной функции [2]. Это обусловлено тем, что некоторые фенотипы БА часто не реагируют на классическую глюкокортикоидную терапию, и причина данного стероидного сопротивления все еще недостаточно ясна. Обсуждается роль повышенной экспрессии ряда цитокинов – интерлейкина 13 и 17 (IL-13 и IL-17), а также нарушение функционирования ядерных транскрипционных факторов в развитии хронического воспаления при БА. Данное состояние вопроса делает крайне актуальным дальнейшее изучение патогенеза хронического воспаления при БА для поиска и разработки новых терапевтических стратегий.

Ядерные транскрипционные факторы представляют собой группу внутриклеточных белков, которые являются регуляторами транскрипции генов, вовлеченных в модуляцию активности воспалительных процессов. К основным провоспалительным транскрипционным факторам относят активирующий протеин-1 (activator protein-1, AP-1) и ядерный фактор каппа В (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) [3, 4], к противовоспалительным – рецептор глюкокортикоидов (glucocorticoid receptor, GR) и рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом (Peroxisome proliferatoractivated receptors, PPARs) [5, 6]. Одним из путей реализации противовоспалительного механизма действия PPARs и GR является подавление ими активности NF- $\kappa$ B и AP-1. В этой связи, взаимоотношения между данными про- и противовоспалительными ядерными транскрипционными факторами активно изучаются в настоящее время, так как они могут служить важной мишенью для управления активностью воспалительного процесса, в частности, при БА [7–10].

Сигнальные пути толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLRs) задействованы как в активации провоспалительных ядерных транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и AP-1, так и в регуляции активности противовоспалительных ядерных транскрипционных факторов GR и PPARs [11-14]. Очевидно, что изучение взаимоотношений между TLRs и ядерными транскрипционными факторами позволит найти новые и эффективные терапевтические подходы при БА.

В данном обзоре суммированы современные взгляды на структуру, функцию TLRs и ядерных транскрипционных факторов, а также на их участие в патогенезе хронического воспаления при БА. обсуждаются взаимоотношения между ними в ключе возможного использования в качестве терапевтической мишени при БА.

В базе данных PubMed осуществлялся поиск научных публикаций по данной теме за последние 10 лет. В обзор включали источники информации, в которых освещались вопросы структуры, функционирования и взаимоотношений между TLRs и ядерными транскрипционными факторами при БА. Информационные запросы включали следующую совокупность ключевых слов: «toll-like receptors, peroxisome proliferator-activated receptors, nuclear factor-kappa B, activator protein-1, glucocorticoid receptor, asthma». Найденные по запросу названия статей просматривали и в случае их соответствия тематике литературного обзора, подвергали анализу рефераты статей. При соответствии реферата критериям включения, проводили поиск и анализ полнотекстового варианта статьи.

### **Провоспалительные ядерные транскрипционные факторы**

Основные провоспалительные ядерные транскрипционные факторы AP-1 и NF- $\kappa$ B запускают процесс развития воспалительной реакции в ответ на воздействие триггерных факторов. Активированные AP-1 и NF- $\kappa$ B транслоцируются в ядро клетки и координируют транскрипционное репрограммирование иммунных клеток, стимулируя экспрессию молекул воспаления.

*Активирующий протеин-1.* Активирующий протеин-1 является ключевым фактором транскрипции, который регулирует широкий спектр клеточных процессов, включая апоптоз, дифференцировку, миграцию и трансформацию клеток, а также участвует в экспрессии генов цитокинов [3, 15]. Активность AP-1 индуцируется рядом физиологических и экологических стимулов (факторы роста, нейротрансмиттеры, полипептидные гормоны, цитокины, УФ-влияние, бактериальные и вирусные инфекции) [16]. Данный белок может быть не только активирован данными стимулами, но и спосо-

бен контролировать экспрессию ФНО- $\alpha$ , интерлейкинов 1, 2, 4, 5, 13 (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13) и ряда других цитокинов [15]. Кроме того, AP-1 участвует в регуляции окислительного статуса клетки, контролируя защитные гены через TRE-последовательности ДНК, к которым он высоко специфичен.

Активирующий протеин-1 представлен 4 подтипами: Jun (v-Jun, c-Jun, JunB, and JunD), Fos (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, and Fra2), ATF (ATF2, ATF3/LRF1, B-ATF, JDP1, and JDP2) и MAF (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K, and Nrl). Данные подтипы способны образовывать димеры. Несмотря на высокую степень структурной гомологии, димеры проявляют различия в способности активировать или подавлять экспрессию генов, что предполагает их специфические регуляторные функции. Основными и наиболее изученными подтипами AP-1 являются Jun и Fos, однако их роль в развитии БА недостаточно изучена. Ген Muc5B, который отвечает за выработку слизи в дыхательных путях, содержит сайт AP-1 в своем промоторе. Гиперэкспрессия AP-1 была обнаружена в дыхательных путях больных БА [15]. Повышенные уровни c-Fos описаны в экспериментальной модели БА крыс [17]. Исследованиями Anna Gungl и соавт. показано, что Fra2 может представлять собой ключевую молекулу, координирующую сразу несколько аспектов патогенеза БА [18].

Поскольку AP-1 играет важную патофизиологическую роль в развитии многих хронических воспалительных заболеваний, в частности, БА, в настоящее время интенсивно изучаются его ингибиторы.

*Ядерный фактор каппа В.* Ядерный фактор каппа В — один из важнейших мессенджеров, стимулирующих экспрессию генов в ответ на провоспалительные стимулы. NF- $\kappa$ B регулирует развитие и апоптоз клеток, модулирует иммунный ответ и развитие воспаления. Поэтому изучение сигнальных функций NF- $\kappa$ B необходимо для поиска новых терапевтических подходов при воспалительных заболеваниях. В клетках млекопитающих есть 5 известных членов семейства NF- $\kappa$ B, к которым относятся RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- $\kappa$ B1) и p52/p100 (NF- $\kappa$ B2). В отсутствие активирующих влияний NF- $\kappa$ B удерживается в цитоплазме клетки ингибиторным белком (NF- $\kappa$ B inhibitor (I $\kappa$ B)). Активация NF- $\kappa$ B осуществляется рецепторами TNFR (Tumour necrosis factor receptor), TLR, IL-1R (Interleukin-1 receptor). Кроме того, данный фактор активируется при повреждении ДНК, развитии окислительного стресса. Посредством стимулирующих воздействий и с участием гетеродимерной киназы I $\kappa$ B (I $\kappa$ B kinase, IKK) происходит активация NF- $\kappa$ B, который транслоцируется в ядро и инициирует выработку медиаторов воспаления [4].

При БА NF- $\kappa$ B рассматривается как главный регулятор врожденных и адаптивных иммунных реакций [19]. Экспрессия NF- $\kappa$ B значительно повышена у пациентов с тяжелой БА. Стимуляция сигнального пути NF- $\kappa$ B способствует повышению экспрессии эпителиальных цитокинов дыхательных путей, таких как IL-4 и TNF- $\alpha$ . Кроме того, NF- $\kappa$ B регулирует гены, участвующие в воспалении дыхательных путей, связанном с БА [4]. Ингибирование активности NF- $\kappa$ B нивелирует воспаление и предотвращает ремоделирование дыхательных путей. Так, в исследовании J. Sun и соавт. было продемонстрировано, что метформин, используемый при терапии диабета 2 типа, посредством подавления сигнализации NF- $\kappa$ B уменьшает повреждение эпителиальных клеток бронхов, индуцированное липополисахаридом [20]. Результаты Yong Wang и соавт. демонстрируют, что GRP78, принадлежащий к семейству белков теплового шока, способствует развитию воспалительной реакции и гиперпродукции слизи в эпителиальных клетках дыхательных путей за счет активации NF- $\kappa$ B и AP-1 [21].

Таким образом, провоспалительные ядерные транскрипционные факторы играют значимую роль в патофизиологии хронического воспаления при БА и могут являться важной терапевтической мишенью.

### **Противовоспалительные ядерные транскрипционные факторы**

Противовоспалительные ядерные транскрипционные факторы GR и PPARs нивелируют процесс развития воспалительной реакции.

*Рецептор глюкокортикоидов.* Рецептор GR экспрессируется по всему организму и имеет несколько изоформ, наиболее изученными из которых являются GR $\alpha$  и GR $\beta$  [5]. Изоформа GR $\alpha$  опосредует транскрипционную активность GR, в то время как GR $\beta$  ингибирует активность GR $\alpha$ . Известно, что GR находится в цитоплазме клетки, но после связывания с глюкокортикоидным лигандом транслоцируется в ядро и взаимодействует со специфическими последовательностями ДНК, иницируя геномный ответ [22]. Как фактор транскрипции, GR опосредует транскрипцию многочисленных генов, участвующих в метаболических процессах и иммунных механизмах, однако он также подавляет транскрипцию без прямого взаимодействия с ДНК [23].

У человека активность GR регулируется кортизолом и экзогенными глюкокортикоидами (ГКС), такими как дексаметазон. Терапия БА включает в себя ингаляционные агонисты  $\beta$ 2-адренорецепторов, ингаляционные и системные кортикостероиды и ингибиторы синтеза лейкотриенов вместе с антагонистами рецепто-

ров лейкотриенов. Глюкокортикостероиды (ГКС) и бронходилататоры являются препаратами первой линии и наиболее часто используются для лечения БА [10]. Однако, при тяжелой БА, как и при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) ГКС неэффективны и дают незначительное клиническое улучшение, что объясняется окислительным стрессом и повреждением ДНК, приводящими к увеличению экспрессии воспалительных генов [24]. Кроме того, продолжительное введение ГКС приводит к многочисленным побочным эффектам, снижению эффективности лечения, что обуславливает актуальность дальнейшего изучения механизмов модуляции активности воспаления при БА. Противовоспалительное действие ГКС реализуется за счет их связывания с GR [3], поэтому актуальность изучения данного рецептора при БА связана с его способностью к уменьшению степени выраженности воспалительной реакции в бронхолегочной системе [10].

*Рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом.* Рецепторы PPARs входят в суперсемейство 48 гормональных ядерных транскрипционных факторов, ответственных за метаболизм и энергетический гомеостаз клетки [6]. Данные рецепторы играют важную роль в регуляции клеточных процессов (дифференцировка, пролиферация, апоптоз) и воспалительных реакций. Все 3 изомера PPARs (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  и PPAR $\gamma$ ) имеют сходную структуру благодаря наличию лиганд-связывающего домена (LBD) [6].

PPAR $\alpha$  экспрессируется преимущественно в печени, почках, сердце, скелетных мышцах, бурой жировой ткани, эпителиальных клетках, макрофагах, лимфоцитах и дендритных клетках слизистой оболочки дыхательных путей [25]. Активация PPAR $\alpha$  снижает продукцию провоспалительных медиаторов (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 и IL-8). С другой стороны, активированный PPAR $\alpha$  может индуцировать выработку противовоспалительных агентов (IL-10), что подтверждает его модулирующее влияние на активность воспаления.

PPAR $\beta/\delta$  (PPAR $\delta$ , PPAR $\beta$ , hNUC1, FAAR) экспрессируется во всех органах и тканях, наиболее выражено в мозге, печени, коже, жировой ткани, скелетных мышцах. PPAR $\beta/\delta$  участвует в окислении жирных кислот, регулирует уровень глюкозы в крови, предотвращает развитие ожирения, участвует в процессах заживления ран [26].

PPAR $\gamma$  экспрессируется практически во всех тканях и клетках, однако преимущественно в жировой ткани, толстой кишке и селезенке. Этот рецептор является участником воспалительных реакций [27], регулятором клеточного гомеостаза, энергетического обмена [28] и иммунной системы легких [29].

Все изомеры PPARs экспрессируются в легочном эпителии, эндотелии, фибробластах, макрофагах и играют важную роль в гомеостазе бронхолегочной системы [25, 29]. Так, PPAR $\gamma$  участвует в воспалении и ремоделировании дыхательных путей при БА [30]. Активация PPAR- $\gamma$  подавляет гиперреактивность дыхательных путей, лейкоцитарную инфильтрацию и приток эозинофилов, угнетает провоспалительную продукцию хемокинов и цитокинов Th-2 типа [31]. Дефицит PPAR $\gamma$  способствует развитию гиперреактивности дыхательных путей и ремоделированию бронхов [32]. В то же время, уровень PPAR $\gamma$  при БА может изменяться в зависимости от стадии воспаления, что требует пристального внимания при интерпретации результатов [27]. Лиганд-индуцированная активация PPARs эффективна в терапии БА. Агонисты PPAR оказывают противовоспалительное действие путем подавления провоспалительных медиаторов и функций различных провоспалительных клеток, имеющих отношение к патофизиологии БА [27].

Можно заключить, что противовоспалительные ядерные транскрипционные факторы (GR и PPARs) вовлечены в патогенез хронического воспаления при БА и должны быть предметом пристального изучения для разработки эффективных терапевтических стратегий для данной патологии.

#### **Взаимоотношения провоспалительных и противовоспалительных ядерных транскрипционных факторов**

Противовоспалительные факторы непосредственно влияют на некоторые гены и подавляют транскрипционную активность AP-1 и NF- $\kappa$ B.

В состоянии покоя NF- $\kappa$ B удерживается в цитоплазме клетки ингибиторным белком I $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B inhibitor, I $\kappa$ B). Активация NF- $\kappa$ B осуществляется рядом рецепторов, в том числе TLRs, при повреждении ДНК и развитии окислительного стресса. Посредством участия гетеродимерной киназы IKK (I $\kappa$ B kinase, IKK) происходит деградация белка I $\kappa$ B и активация NF- $\kappa$ B. Далее NF- $\kappa$ B транслоцируется в ядро и координирует репрограммирование иммунных клеток, стимулируя экспрессию молекул воспаления [4]. Влияние провоспалительных факторов на NF- $\kappa$ B сопровождается синтезом простагландинов D<sub>2</sub> и E<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub> и PGE<sub>2</sub>), активирующих PPARs [11]. Активированные PPARs (все изоформы) ингибируют NF- $\kappa$ B, подавляя воспалительные реакции.

Возможные механизмы инактивации NF- $\kappa$ B включают прямое связывание PPAR $\gamma$  с NF- $\kappa$ B, которое приводит к протеолитической деградации NF- $\kappa$ B [33]. Косвенное влияние PPARs происходит за счет стимуляции выработки антиоксидантных ферментов и снижения

концентрации активных форм кислорода, вовлеченных в патогенез воспаления.

PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  могут ингибировать ацетилирование NF- $\kappa$ B и, соответственно, активацию этого фактора [34]. Активация PPAR $\alpha$  повышает экспрессию сиртуина 1 (SIRT1), который ингибирует функцию NF- $\kappa$ B [35]. Влияние PPAR $\alpha$  на SIRT1 зависит от AMP-активированной протеинкиназы (AMPK). Активация AMPK приводит к фосфорилированию P300, что снижает активность последнего фермента. Тем не менее SIRT1 и AMPK являются ферментами, которые активируют друг друга. Установлено, что PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  также повышают экспрессию I $\kappa$ B $\alpha$  – белка семейства I $\kappa$ B, связывающего NF- $\kappa$ B во время воспалительных реакций [36]. Активация PPAR $\beta$ / $\delta$  также нарушает функцию NF- $\kappa$ B. В результате воспалительные реакции, вызванные высокой концентрацией глюкозы, активацией рецептора TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  или активацией TLR4, снижаются [7].

GR-опосредованная модуляция активности воспалительных генов обусловлена связыванием противовоспалительного фактора GR с провоспалительными транскрипционными факторами AP-1 и NF- $\kappa$ B. Нарушение взаимоотношений между GR и NF- $\kappa$ B, обладающих противоположными механизмами действия, составляет важную часть инициации и прогрессирования хронического воспаления [8]. Данные транскрипционные факторы могут быть основными кандидатами для развития воспалительной дисрегуляции из-за их быстрой активации и способности регулировать сотни генов одновременно [37]. Кроме того, GR является мощным ингибитором активности AP-1, что обуславливает популярность его изучения в качестве мишени для противовоспалительной терапии [9].

*Толл-подобные рецепторы.* Толл-подобные рецепторы (TLRs1–13), относящиеся к 1 из 4 семейств рецепторов распознавания паттерна или образ-распознающих рецепторов (pattern recognition receptors, PRRs), являются участниками врожденных и адаптивных иммунных реакций, вовлеченных в инициацию воспаления [38]. TLRs способны распознавать патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular pattern, PAMPs) и молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (damage-associated molecular pattern, DAMPs). Лигандами для TLRs, экспрессируемых на мембране клетки (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR10), служат компоненты микробных мембран, бактериальные протеины и белки вирусов, для эндосомальных TLRs (TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9) – нуклеиновые кислоты микробов.

Структура TLRs представлена LRR доменом (Leucine-Rich Repeat domain) и TIR доменом (Toll/

interleukin-1 receptor and Resistance domain) [39]. Все TLRs (кроме TLR3) посредством TIR домена передают сигнал через адапторные молекулы на киназы, активирующие факторы NF- $\kappa$ B, AP-1 и IRF [38]. К адапторным молекулам относят MyD88 (myeloid differentiation protein 88, TIRAP (TIR-доменсодержащие адапторы), TICAM1 (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ , TRIF), TICAM2 (TIR-containing adapter molecule). Все TLRs реализуют свое действие через MyD88, кроме TLR3, передающего сигнал через TRIF. TLR4 активирует как MyD88-зависимые, так и TRIF-зависимые сигнальные пути, что делает его уникальным рецептором, распознающим значительное количество лигандов [39].

TLRs локализованы на поверхности клеток иммунной системы (макрофаги, дендритные, тучные клетки, нейтрофилы, базофилы, В- и Т- лимфоциты, натуральные киллеры) и на неиммунных клетках (фибробласты, эпителиальные клетки, кератиноциты). TLRs не только широко экспрессируются в клетках дыхательных путей, но и представляют собой первую линию защиты слизистой оболочки, участвуя в распознавании и устранении патогенных микроорганизмов и аллергенов воздушной среды [40].

Изучение функционирования TLRs может являться эффективным направлением для подавления воспаления, эозинофилии и гиперреактивности дыхательных путей, наблюдаемых при БА [39]. Растущее количество научных данных указывает на важную роль TLRs в патофизиологии БА [38, 41, 42]. Стоит отметить, что модуляция TLRs-сигнализации может быть направлена как на активацию, так и на разрешение воспалительной реакции в дыхательных путях [38, 43].

Тучные клетки экспрессируют большинство TLRs и участвуют в индукции секреции цитокинов и хемокинов, инициирующих Th2-тип иммунного ответа [44]. Активация базофильных TLRs сопровождается увеличением продукции IL-4, IL-8 и IL-13. Стимуляция TLRs на эозинофилах также приводит к высвобождению цитокинов, вовлеченных в развитие Th2-иммунного ответа [45]. Кроме того, TLRs индуцируют окислительный стресс и стимулируют высвобождение факторов роста и цитокинов, связанных с ремоделированием дыхательных путей [19].

В настоящее время в патогенезе БА активно изучается роль как эндосомальных TLRs, так и TLRs, экспрессируемых на клеточной мембране [41].

Активация аллергенами рецепторов, экспрессируемых на клеточной мембране (преимущественно TLR2 и TLR4), сопровождается формированием Th2-ответа и развитием аллергического воспаления [40]. Активация агонистов TLR2 приводит как к ингибированию разви-

тия БА [43], так и может способствовать ее развитию [46]. Эндосомальные TLRs (TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9) связаны с индукцией астматического воспаления и развитием обострений БА в ответ на вирусные и бактериальные инфекции [42]. Все эндосомальные TLRs распознают нуклеиновые кислоты микробов, TLR3, TLR7 и TLR8 – РНК, а TLR9 распознает ДНК. Механизмом усиления воспаления дыхательных путей при присоединении вирусной инфекции является активация TLR3. TLR7/8 могут быть ответственны за обострение БА при развитии вирусной инфекции [45]. Активация TLR9 способствует развитию Th1-типа иммунного ответа и снижению уровня цитокинов Th2-типа (IL-4, -5, -12; IL-1 $\beta$ ). Вероятно, усиление Th1-типа иммунного ответа может быть механизмом, с помощью которого TLR9 ингибирует активацию воспаления Th2-типа. TLR9 вовлечен в обострение БА при возникновении вирусной инфекции [45].

Таким образом, TLRs (эндосомальные и экспрессируемые на клеточной мембране) играют немаловажную роль в патофизиологии БА и могут являться перспективной мишенью для купирования хронического воспаления дыхательных путей.

#### ***Взаимоотношения толл-подобных рецепторов и провоспалительных ядерных транскрипционных факторов при бронхиальной астме***

Сигнальные пути TLRs задействованы в активации провоспалительных транскрипционных факторов, таких как NF- $\kappa$ B (через IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ ), AP-1 (через MAPS) и IRF. TLRs вовлечены в механизм ремоделирования дыхательных путей [19] через активацию провоспалительного NF- $\kappa$ B [13]. TLR4 активирует NF- $\kappa$ B через MyD88-зависимые и MyD88-независимые пути, стимулируя продукцию провоспалительных факторов. Существуют данные, указывающие, что экспрессия TLR2 увеличивает продукцию стромального лимфопоэтина тимуса (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) через NF- $\kappa$ B и JNK сигнальные пути, предрасполагая к инициации воспаления Th2-типа, играющего важную роль в патогенезе БА [14]. Экспрессия TLR2 у больных БА значительно выше, чем у здоровых лиц. В то же время, дефицит TLR2 нарушает секрецию TSLP, блокируя развитие Th2-ответа. Данные результаты показывают провоспалительную роль эпителиальных клеток дыхательных путей, реализующуюся через TLR2-зависимую продукцию TSLP.

В исследовании Н. Jiang и соавт. была выдвинута гипотеза, что взаимоотношения между TLR4, NF- $\kappa$ B и амфотерином (High mobility group box 1, HMGB1) могут иметь важное значение в патогенезе БА [47]. Амфотерин, или ядерный белок HMGB1, является цитокиновым медиатором, который пассивно высвобождает

ся из поврежденных и некротических клеток, а также секретируется иммунными клетками после их стимуляции липополисахаридом, TNF- $\alpha$  или IL-1. Данный белок относится к DAMPs. Являясь важным эндогенным провоспалительным фактором, HMGB1 участвует в патогенезе многих заболеваний, в частности БА [48]. HMGB1 способствует высвобождению цитокинов через митоген-активированную протеинкиназу (MAPK), ERK1/2 и NF- $\kappa$ B пути. HMGB1 также активирует TLR 2 и TLR4, что приводит к иницированию воспаления через MyD88 и NF- $\kappa$ B и высвобождению провоспалительных цитокинов (IL- $\beta$ , IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ ).

В обзоре Mishra Vikas и соавт. были суммированы данные об участии TLRs и NF- $\kappa$ B в механизме обострения БА и их связи с окислительным стрессом [49]. При определенных концентрациях активные формы кислорода могут влиять на клеточные сигнальные пути и молекулы на цитоплазматическом и ядерном уровнях. В этом контексте окислительная модуляция TLRs и NF- $\kappa$ B имеет важное значение для терапевтического контроля БА.

Таким образом, TLRs вовлечены в активацию провоспалительных транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и AP-1 и развитие хронического воспаления при БА.

#### **Взаимоотношения толл-подобных рецепторов и провоспалительных ядерных транскрипционных факторов при бронхиальной астме**

Противовоспалительное действие ГКС реализуется за счет их связывания с GR, который подавляет активность транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию NF- $\kappa$ B, AP-1 и IRF. Данный механизм известен как трансрепрессия и является основной мишенью для действия ГКС [3]. С другой стороны, ГКС также подавляют TLR-сигнализацию через индукцию эндогенных ингибиторов (например, MKP-1 и GILZ) [37]. Важной мишенью действия ГКС является TLR-зависимая продукция интерферона. Так, введение ГКС сопровождалось усилением регуляции сигнального пути PPAR, что приводило к ослаблению/подавлению продукции TLR-зависимого интерферона [50]. Центральной воспалительной молекулой в PRR-путях, играющих значимую роль в индукции и прогрессировании воспаления, является рецептор NLRP3 (nod-like receptor with pyrin domain containing 3). В свою очередь, TLR2 играет важную роль в регулировании воспаления посредством NLRP3 [51]. Вышеизложенное указывает на тесную связь противовоспалительных факторов GR и PPARs с TLRs.

Интересно, что существует достаточно доказательств, демонстрирующих двусторонние взаимосвя-

зи между TLRs и PPARs [12]. Так, активация TLRs сопровождается гиперэкспрессией PPAR $\beta/\delta$  и подавлением активности PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  через NF- $\kappa$ B [11].

Эксперименты *in vitro* показали, что TLR4 участвует в прогрессировании иммуноглобулиновой нефропатии (IgAN) путем индукции провоспалительных цитокинов, агонисты PPAR $\gamma$  оказывают противовоспалительное действие путем подавления экспрессии и активности TLR4 [52]. Активация PPAR $\gamma$  подавляет пролиферацию и индуцирует апоптоз раковых клеток пищевода путем ингибирования TLR4-зависимого MAPK-пути [53]. Стоит отметить, что следствием ослабленной экспрессии PPARs является повышение уровня провоспалительных цитокинов и инициация воспалительной реакции. Эти результаты показывают, что существует перекрестная связь между PPARs и TLRs, которая регулирует воспалительную реакцию при различных заболеваниях. Понимание противоположных регуляторных эффектов и связанных с ними механизмов влияния TLRs и PPAR на воспалительный сигнальный каскад является крайне важным и может привести к разработке альтернативных стратегий профилактики и лечения БА.

Представленные данные свидетельствуют, что как стимуляция PPARs может влиять на уровень экспрессии TLRs, так и TLRs обладают способностью модулировать экспрессию PPARs. Взаимоотношения между PPARs и TLRs и их способность оказывать влияние на активность NF- $\kappa$ B могут быть важной терапевтической мишенью в лечении БА.

#### **Заключение**

Бронхиальная астма является хроническим, гетерогенным воспалительным заболеванием с сложным этиопатогенезом и прогрессирующим течением. Несмотря на эффективность традиционных методов лечения БА, у ряда пациентов сохраняются частые обострения при быстро прогрессирующем ухудшении легочной функции. Среди причин недостаточной эффективности терапии при некоторых фенотипах БА, обсуждается роль повышенной экспрессии ряда цитокинов и нарушение функционирования и взаимоотношений ядерных транскрипционных факторов.

Механизмы, связанные с развитием и прогрессированием БА, обусловлены активацией внутриклеточных сигнальных путей и воспалительных генов в ответ на действие аллергенов и других триггеров. Ядерные транскрипционные факторы являются регуляторами транскрипции генов, вовлеченных в модуляцию активности воспалительных процессов. К провоспалительным ядерным транскрипционным факторам относятся AP-1 и NF- $\kappa$ B, к противовоспалительным – GR и

PPARs. Между про- и противовоспалительными факторами существует тесная взаимосвязь. Так, PPARs проявляют противовоспалительный эффект через ингибирование провоспалительного фактора NF- $\kappa$ B. GR-опосредованная модуляция активности воспалительных генов обусловлена связыванием противовоспалительного фактора GR с провоспалительными транскрипционными факторами AP-1 и NF- $\kappa$ B. Нарушение взаимоотношений про- и противовоспалительных факторов приводит к инициации и прогрессированию хронического воспаления.

Толл-подобные рецепторы — участники врожденных и адаптивных иммунных реакций, также вовлечены в инициацию воспаления. Стоит отметить, что модуляция TLRs-сигнализации может быть направлена как на активацию, так и на разрешение воспалительной реакции в дыхательных путях. Сигнальные пути TLRs прежде всего направлены на активацию NF- $\kappa$ B и AP-1, провоспалительная активность которых подавляется посредством влияния PPARs и GR. В то же время, TLRs также обладают способностью модулировать экспрессию PPARs, а PPARs способны влиять на уровень экспрессии TLRs.

Таким образом, между TLRs и ядерными транскрипционными факторами существуют взаимоотношения, которые могут быть точкой приложения для терапии БА.

### Литература

(п.п. 1; 3-53 см. References)

2. Кыткова О.Ю., Гвозденко Т.А., Антонюк М.В. Современные аспекты распространенности хронических бронхолегочных заболеваний. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2017; 64: 94–100.

### References

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). 2018.
2. Куткова О.Ю., Гвозденко Т.А., Антонюк М.В. Modern aspects of the prevalence of chronic bronchopulmonary diseases. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2017. 64: 94–100. (in Russian)
3. Karolien De. Bosscher, Ilse M. Beck, Lien. Dejager, Nadia. Bougarne, Anthoula. Gaigneaux, Sébastien. Chateauvieux, et al. Selective modulation of the glucocorticoid receptor can distinguish between transrepression of NF- $\kappa$ B and AP-1. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71(1): 143–63. doi: 10.1007/s00018-013-1367-4
4. Schuliga M. NF-kappaB signaling in chronic inflammatory airway disease. *Biomolecules*. 2015; 5: 1266–83. doi: 10.3390/biom5031266.
5. Steven Timmermans, Jolien Souffriau, Claude Libert. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Front Immunol*. 2019; 10: 1545. doi: 10.3389/fimmu.2019.01545
6. Muralikumar S., Vetrivel U., Narayanasamy A., Das U.N. Probing the intermolecular interactions of PPAR $\gamma$ -LBD with polyunsaturated fatty acids and their anti-inflammatory metabolites to infer most potential binding moieties. *Lipids Health Dis*. 2017; 16: 17. doi: 10.1186/s12944-016-0404-3

7. Su X., Zhou G., Wang Y., Yang X., Li L., Yu R., Li D. The PPAR $\beta$ / $\delta$  agonist GW501516 attenuates peritonitis in peritoneal fibrosis via inhibition of TAK1-NF $\kappa$ B pathway in rats. *Inflammation*. 2014; 37: 729–37. doi: 10.1007/s10753-013-9791-z
8. Mandakh Bekhbat., Sydney A. Rowson., Gretchen N. Neigh. Checks and Balances: the Glucocorticoid Receptor and NF $\kappa$ B in Good Times and Bad. *Front Neuroendocrinol*. 2017; 46: 15–31. doi: 10.1016/j.yfrne.2017.05.001
9. Clark A.R., Belvisi M.G. Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. *Pharmacol. Ther*. 2012; 134: 54–67. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.12.004
10. Mahmoud M. Mostafa, Christopher F. Rider, Suharsh Shah, Suzanne L. Traves, Paul M.K. Gordon, Anna Miller-Larsson. Glucocorticoid-driven transcriptomes in human airway epithelial cells: commonalities, differences and functional insight from cell lines and primary cells. *BMC Med Genomics*. 2019; 12: 29. doi: 10.1186/s12920-018-0467-2
11. Chistyakov D.V., Aleshin S.E., Astakhova A.A., Sergeeva M.G., Reiser G. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) alpha and -gamma of rat brain astrocytes in the course of activation by toll-like receptor agonists. *J Neurochem*. 2015; 134(1): 113–24. doi: 10.1111/jnc.13101
12. Nasim Dana, Golnaz Vaseghi, Shaghayegh Haghjooy Javanmard. Crosstalk between Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Toll-Like Receptors: A Systematic Review. *Adv Pharm Bull*. 2019; 9(1): 12–21. doi: 10.15171/apb.2019.003
13. MacLeod H., Wetzler L.M. T cell activation by TLRs: A role for TLRs in the adaptive immune response. *Sci STKE*. 2007; 2007:pe48. doi: 10.1126/stke.4022007pe48
14. Chun E., Lee S.H., Lee S.Y., Shim E.J., Cho S.H., Min K.U., et al. Toll-like receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in asthmatics; implications for asthma management. *J Clin Immunol*. 2010; 30: 459–64. doi: 10.1007/s10875-009-9363-z
15. Na Ye, Ye Ding, Christopher Wild, Qiang Shen, Jia Zhou. Small Molecule Inhibitors Targeting Activator Protein 1 (AP-1). *J Med Chem*. 2014; 57(16): 6930–48. doi: 10.1021/jm5004733
16. Wang A., Al-Kuhlani M., Johnston S.C., Ojcius D.M., Chou J., Dean D. Transcription factor complex AP-1 mediates inflammation initiated by Chlamydia pneumoniae infection. *Cell Microbiol*. 2013; 15: 779–94. doi: 10.1111/cmi.12071
17. Liu H., Yang X., Hou W. Correlation of c-fos protein expression with neuropeptide content in the lung of bronchial asthmatic rat. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7: 8657–65.
18. Anna Gungl, Valentina Biasin, Jochen Wilhelm, Andrea Olschewski, Grazyna Kwapiszewska, Leigh M. Marsh. Fra2 Overexpression in Mice Leads to Non-allergic Asthma Development in an IL-13 Dependent Manner. *Front Immunol*. 2018; 9: 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.02018
19. Tian B., Zhao Y., Sun H., Zhang Y., Yang J., Brasier A.R. BRD4 Mediates NF $\kappa$ B-dependent Epithelial-Mesenchymal Transition and Pulmonary Fibrosis via Transcriptional Elongation. *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2016; 311(6): L1183–L201. doi: 10.1152/ajplung.00224.2016
20. Sun J., Huang N., Ma W., Zhou H., Lai K. Protective effects of metformin on lipopolysaccharide-induced airway epithelial cell injury via NF- $\kappa$ B signaling inhibition. *Mol Med Rep*. 2019; 19(3): 1817–23. doi: 10.3892/mmr.2019.9807
21. Yong Wang, Jie-Sen Zhou, Xu-Chen Xu, Zhou-Yang Li, Hai-Pin Chen, Song-Min Ying. Endoplasmic reticulum chaperone GRP78 mediates cigarette smoke-induced necroptosis and injury in bronchial epithelium. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018; 13: 571–81. doi: 10.2147/COPD.S150633
22. Weikum E.R., Knuesel M.T., Ortlund E.A., Yamamoto K.R. Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allosteric. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2017; 18: 159–74. doi: 10.1038/nrm.2016.152
23. Ratman D., Vanden Berghe W., Dejager L., Libert C., Tavernier J., Beck I.M., et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2013; 380: 41–54. doi: 10.1016/j.mce.2012.12.014

24. Kytikova O.Y., Gvozdenko T.A., Vitkina T.I. Oxidative DNA Damage in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Older Patients. *Advances in Gerontology*. 2017; 7 (2): 163–5.
25. Patel B., Mann G.E., Chapple S.J. Concerted redox modulation by sulforaphane alleviates diabetes and cardiometabolic syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2018; 122: 150–60. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.004
26. Magadam A., Engel F.B. PPAR $\beta$ / $\delta$ : Linking Metabolism to Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(7). pii: E2013. doi: 10.3390/ijms19072013
27. Banno A., Reddy A.T., Lakshmi S.P., Reddy R.C. PPARs: Key Regulators of Airway Inflammation and Potential Therapeutic Targets in Asthma. *Nucl Receptor Res*. 2018; 5. pii: 101306. doi: 10.11131/2018/101306
28. Wang Q., Umar Imam M., Yida Z., Wang F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) as a target for concurrent management of diabetes and obesity-related cancer. *Curr Pharm Des*. 2017; 23: 3677–88. doi: 10.1016/j.immuni.2015.11.015
29. Nobs S.P., Kopf M. PPAR- $\gamma$  in innate and adaptive lung immunity. *J Leukoc Biol*. 2018; 104(4): 737–41. doi: 10.1002/JLB.3MR0118-034R
30. Yoon Y.S., Kim S.Y., Kim M.J., Lim J.H., Cho M.S., Kang J.L. PPARgamma activation following apoptotic cell instillation promotes resolution of lung inflammation and fibrosis via regulation of efferocytosis and proresolving cytokines. *Mucosal Immunol*. 2015; 8(5): 1031–46. doi: 10.1038/mi.2014.130
31. Anderson J.R., Mortimer K., Pang L., Smith K.M., Bailey H., Hodgson D.B. Evaluation of the PPAR-gamma Agonist Pioglitazone in Mild Asthma: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *PLoS ONE*. 2016; 11(8): e0160257. doi: 10.1371/journal.pone.0160257
32. Lakshmi S.P., Reddy A.T., Banno A., Reddy R.C. Airway Epithelial Cell Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Regulates Inflammation and Mucin Expression in Allergic Airway Disease. *J Immunol*. 2018; 201(6): 1775–83. doi: 10.4049/jimmunol.1800649
33. Hou Y., Moreau F., Chadee K. PPAR $\gamma$  is an E3 ligase that induces the degradation of NF $\kappa$ B/p65. *Nat Commun*. 2012; 3: 1300. doi: 10.1038/ncomms2270
34. Diamant G., Dikstein R. Transcriptional control by NF- $\kappa$ B: elongation in focus. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1829: 937–45. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.04.007
35. Wang W., Bai L., Qiao H., Lu Y., Yang L., Zhang J. The protective effect of fenofibrate against TNF- $\alpha$ -induced CD40 expression through SIRT1-mediated deacetylation of NF- $\kappa$ B in endothelial cells. *Inflammation*. 2014; 37: 177–85.
36. Scirpo R., Fiorotto R., Villani A., Amenduni M., Spirli C., Strazzabosco M. Stimulation of nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  limits NF- $\kappa$ B-dependent inflammation in mouse cystic fibrosis biliary epithelium. *Hepatology*. 2015; 62: 1551–62. doi: 10.1002/hep.28000
37. Busillo J.M., Cidlowski J.A. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2013; 24: 109–19. doi: 10.1016/j.tem.2012.11.005
38. Zakeri A., Russo M. Dual Role of Toll-like Receptors in Human and Experimental Asthma Models. *Front Immunol*. 2018; 9: 1027. doi: 10.3389/fimmu.2018.01027
39. Mirotti L., Alberca Custodio R.W., Gomes E., Rammauro F., de Araujo E.F., Garcia Calich V.L. et al. CpG-ODN shapes alum adjuvant activity signaling via MyD88 and IL-10. *Front Immunol*. 2017; 8: 47. doi: 10.3389/fimmu.2017.00047
40. Lv J., Yu Q., Lv J., Di C., Lin X., Su W. et al. Airway epithelial TSLP production of TLR2 drives type 2 immunity in allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2018; 48 (11): 1838–50. doi: 10.1002/eji.201847663
41. Athari S.S., Athari S.M., Beyzay F., Movassaghi M., Mortaz E., Taghavi M. Critical role of Toll-like receptors in pathophysiology of allergic asthma. *Eur J Pharmacol*. 2017; 808: 21–7. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.11.047
42. Christou E.A.A., Giardino G., Stefanaki E., Ladomenou F. Asthma: An Undermined State of Immunodeficiency. *Int Rev Immunol*. 2019; 1–9. doi: 10.1080/08830185.2019.1588267
43. Yu Y., Yip K.H., Tam I., Sam S.W., Ng C.W., Zhang W. et al. Differential effects of the toll-like receptor 2 agonists, PGN and Pam3CSK4 on anti-IgE induced human mast cell activation. *PLoS One*. 2014; 9(11): e112989. doi: 10.1371/journal.pone.0112989
44. Suurmond J., Dorjée A.L., Knol E.F., Huizinga T.W.J., Toes R. EM. Differential TLR-induced cytokine production by human mast cells is amplified by Fc $\epsilon$ RI triggering. *Clin Exp Allergy*. 2015; 45: 788–96. doi: 10.1111/cea.12509
45. Kvarnhammar A.M., Cardell L.O. Pattern-recognition receptors in human eosinophils. *Immunology*. 2012; 136: 11–20. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03556.x
46. Yang D., Chen Q., Su S.B., Zhang P., Kurosaka K., Caspi R.R. et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med*. 2008; 205(1): 79–90. doi: 10.1084/jem.20062027
47. Jiang H., Duan J., Xu K., Zhang W. Resveratrol protects against asthma-induced airway inflammation and remodeling by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. *Exp Ther Med*. 2019; 18(1): 459–66. doi: 10.3892/etm.2019.7594
48. Yang Q., Liu X., Yao Z., Mao S., Wei Q., Chang Y. Penhexylidene hydrochloride inhibits the release of high-mobility group box 1 in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells and cecal ligation and puncture-induced septic mice. *J Surg Res*. 2014; 186: 310–7. doi: 10.1016/j.jss.2013.08.015
49. Vikas Mishra, Jaspreet Banga, Patricia Silveyra. Oxidative stress and cellular pathways of asthma and inflammation: Therapeutic strategies and pharmacological targets. *Pharmacol Ther*. 2018; 181: 169–82. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.08.011
50. Diez D., Goto S., Fahy J.V., Erle D.J., Woodruff P.G., Wheelock A.M. et al. Network analysis identifies a putative role for the PPAR and type I interferon pathways in glucocorticoid actions in asthmatics. *BMC Med Genomics*. 2012; 5: 27. doi: 10.1186/1755-8794-5-27
51. Bruchard M., Rebé C., Derangère V., et al. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of T H 2 differentiation. *Nat Immunol*. 2015; 16: 859–70.
52. Zou J.N., Xiao J., Hu S.S., Fu C.S., Zhang X.L., Zhang Z.X. et al. Toll-like Receptor 4 Signaling Pathway in the Protective Effect of Pioglitazone on Experimental Immunoglobulin A Nephropathy. *Chin Med J (Engl)*. 2017; 130(8): 906–13. doi: 10.4103/0366-6999.204101
53. Wu K., Yang Y., Liu D., Qi Y., Zhang C., Zhao J. et al. Activation of PPARgamma suppresses proliferation and induces apoptosis of esophageal cancer cells by inhibiting TLR4-dependent MAPK pathway. *Oncotarget*. 2016; 7(28): 44572–82. doi: 10.18632/oncotarget.10067

**Сведения об авторах:**

**Кытикova Оксана Юрьевна**, доктор мед. наук, науч. сотр. лаб. восстановительного лечения; e-mail: kytikova@yandex.ru;  
**Новгородцева Татьяна Павловна**, доктор биол. наук, проф., зам. директора по научной работе, гл. науч. сотр. лаб. биомедицинских исследований; e-mail: nauka@niivl.ru;  
**Денисенко Юлия Константиновна**, доктор биол. наук, зав. лаб. биомедицинских исследований; e-mail: karaman@inbox.ru;  
**Антонык Марина Владимировна**, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. восстановительного лечения; e-mail: antonyukm@mail.ru;  
**Гвозденко Татьяна Александровна**, доктор мед. наук, проф. РАН, гл. науч. сотр. лаб. восстановительного лечения; e-mail: vfdnz@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

Тугузбаева Г.М., Павлов В.Н., Еникеев Д.А.

## Анализ противоопухолевого эффекта эндостатина в отношении плоскоклеточного рака полости рта по результатам экспериментальных исследований

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

При плоскоклеточном раке полости рта основной причиной летальных исходов является метастазирование в регионарные лимфатические узлы. Злокачественный рост и формирование метастазов напрямую зависят от степени кровоснабжения первичного очага новообразования. Известно, что по мере прогрессирования опухолевой процесс сопровождается нарушением сбалансированной в норме системы регуляции ангиогенеза с превалированием уровня ангиогенных стимуляторов над ингибиторами. В связи с этим, использование антиангиогенных средств является патофизиологически обоснованным методом борьбы со злокачественным ростом. В обзоре обсуждаются данные доклинических исследований участия эндостатина, природного ингибитора ангиогенеза, в процессах подавления прогрессии и метастазирования плоскоклеточного рака челюстно-лицевой области. Проанализированы патогенетические механизмы ингибирования эндостатином опухолевого роста в экспериментальных моделях рака полости рта. Эндостатин можно рассматривать в качестве потенциального противоопухолевого средства для лечения данной нозологии.

**Ключевые слова:** эндостатин; плоскоклеточный рак полости рта; неоангиогенез; метастазирование

**Для цитирования:** Тугузбаева Г.М., Павлов В.Н., Еникеев Д.А. Анализ противоопухолевого эффекта эндостатина в отношении плоскоклеточного рака полости рта по результатам экспериментальных исследований». *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(4): 134-139.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.134-139

**Для корреспонденции:** Павлов Валентин Николаевич, e-mail: pavlov@bashgmu.ru

**Участие авторов:** Тугузбаева Г.М. – сбор и обработка материала, написание текста; Павлов В.Н. – концепция и дизайн исследования, анализ публикаций по теме статьи, редактирование текста рукописи; Еникеев Д.А. – концепция и дизайн исследования, анализ публикаций по теме статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Республики Башкортостан молодым ученым

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

Поступила 30.08.2019

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Tuguzbaeva G.M., Pavlov V.N., Enikeev D.A.

## Analysis of the anticancer effect of endostatin on oral squamous cell carcinoma based on results of experimental studies

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

The main reason for cancer-associated mortality in patients with oral squamous cell carcinoma is metastatic spread to regional lymph nodes. It is known that the processes of malignant growth and metastasis are highly dependent on blood supply to the primary cancerous focus. The development of malignancy is accompanied by failure of the normally well-balanced system of angiogenesis regulation with prevalence of proangiogenic factors over inhibitors. Therefore, the use of angiogenic inhibitors is a pathophysiologically justified method aimed at suppression of cancer progression. This review presents reports of experimental studies on the role of endostatin, a natural inhibitor of angiogenesis, in processes of tumour shrinkage in squamous cell carcinoma of the maxillofacial region. The authors analysed pathogenic mechanisms of the anticancer effects exhibited by endostatin in preclinical models of oral malignancy. Endostatin can be regarded as a potential antitumor agent for the treatment of oral squamous cell carcinoma.

**Keywords:** endostatin; oral squamous cell carcinoma; neoangiogenesis; metastasis

**For citation:** Tuguzbaeva G.M., Pavlov V.N., Enikeev D.A. Analysis of the anticancer effect of endostatin on oral squamous cell carcinoma based on results of experimental studies. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 134-139. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.134-139

**For correspondence:** **Pavlov Valentin Nikolaevich**, MD, PhD, corresponding member of Russian Academy of Sciences, Head of Department of Urology, Rector of Bashkir State Medical University; e-mail: pavlov@bashgmu.ru

**Contributions:** Tuguzbaeva G.M. – material collection and processing, text writing; Pavlov V.N. – concept and design of research, analysis of publications, editing; Enikeev D.A. – concept and design of research, analysis of publications

**Acknowledgment.** The work was supported by the Grant of Republic Bashkortostan for Young Scientists.

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

**Information about the authors:**

Tuguzbaeva G.M., <https://orcid.org/0000-0001-7713-1891>

Pavlov V.N., <https://orcid.org/0000-0003-2125-4897>

Enikeev D.A., <https://orcid.org/0000-0001-6270-583x>

Received 30.08.2019

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

Показатель заболеваемости злокачественными новообразованиями полости рта на территории Российской Федерации за последнее десятилетие имеет тенденцию к увеличению, занимая 5-е место по темпам прироста среди всех впервые выявленных случаев злокачественных новообразований (прирост 36,36% за 2008–2018 гг.) [1]. В общей структуре онкологических заболеваний полости рта плоскоклеточный рак слизистой оболочки диагностируется в 90% случаев и характеризуется быстрым темпом роста и ранним распространением метастазов [2–5]. Несмотря на достигнутые успехи в диагностике и комплексном лечении, показатель смертности при плоскоклеточной карцине полости рта (ПКПР) остается относительно высоким [6, 7]. Основной причиной летального исхода при указанном диагнозе значится метастазирование в регионарные лимфатические узлы [8]. Являясь важным прогностическим фактором, данный процесс определяет пятилетнюю выживаемость пациентов [9, 10].

Неоангиогенез, образование новых кровеносных сосудов, играет решающую роль как при становлении опухолевого процесса, так и при формировании метастазов [11]. Условно в течении канцерогенеза можно выделить 2 фазы: аваскулярную и васкулярную. На начальном этапе система регуляции ангиогенеза сохраняет баланс между позитивными и негативными сигналами в опухолевом микроокружении, что соответствует бессосудистой фазе онкогенеза [12]. Ввиду отсутствия должной системы кровоснабжения, обмен веществ в опухоли на данном этапе реализуется путем диффузии питательных веществ и продуктов катаболизма. В этом случае ограниченный базальной мембраной патологический процесс не превышает 1–2 мм в диаметре и не имеет признаков инвазии в подлежащие ткани [13]. По мере прогресси-

рования опухоль вступает во 2-ю фазу, при которой равновесие между стимуляторами и ингибиторами ангиогенеза нарушается, и опухолевые клетки начинают усиленно секретировать проангиогенные факторы (фактор роста эндотелия сосудов VEGF, основной фактор роста фибробластов bFGF, эпидермальный фактор роста EGF) [14]. Так запускается процесс неоангиогенеза, главной задачей которого является доставка кислорода и питательных веществ к новообразованию. В итоге, опухолевый процесс приобретает злокачественный характер течения, что сопровождается увеличением первичного очага, его инвазией и метастазированием. Показано, что повышенная экспрессия проангиогенного фактора VEGF в тканях плоскоклеточной карциномы полости рта ассоциирована с неблагоприятным клиническим исходом заболевания [15, 16]. Кроме того, при исследовании уровня васкуляризации рака челюстно-лицевой области установлена прямая корреляция между плотностью микроциркуляторного русла опухолевого очага и активностью метастазирования [17, 18]. Таким образом, развитая сеть кровеносных сосудов, с одной стороны, поддерживает высокий уровень обмена веществ в очаге малигнизации, а с другой – служит путем распространения раковых клеток по всему организму. Использование в этой ситуации антиангиогенных средств может быть эффективным с точки зрения ограничения роста опухоли и минимизации метастазирования [19].

Одним из компонентов системы ингибирования ангиогенеза является эндостатин, полипептид с молекулярной массой 20 кДа, представляющий собой C-терминальный фрагмент коллагена XVIII [20]. С момента открытия эндостатина в 1997 г. проведено немало исследований, посвященных изучению его антиан-

гиогенных свойств [21–23]. Наряду с этим известны случаи прямого антионкогенного эффекта полипептида на раковые клетки различного происхождения [24–28]. Однако, несмотря на значительный объем накопленных знаний о противоопухолевой активности эндостатина, до сих пор не был проведен комплексный анализ молекулярных основ и патогенетических механизмов ингибирования эндостатином ПКПР.

Способность эндостатина угнетать неоангиогенез в очаге малигнизации реализуется воздействием сразу на несколько путей внутриклеточной передачи сигналов. Доказано, что природный ингибитор ангиогенеза снижает показатели выживаемости эндотелиоцитов путем активации апоптоза. Запуск механизма запрограммированной гибели клеток происходит за счет подавления синтеза антиапоптотического белка Bcl-2 [29]. Также продемонстрировано участие эндостатина в регуляции клеточного цикла. Воздействуя опосредованно через систему инактивации Циклина D1, полипептид блокирует переход клеток из G1 в S фазу, что в конечном итоге тормозит пролиферацию эндотелиоцитов [30]. Примечательно, что помимо антипролиферативного эффекта, эндостатин также выполняет функцию ингибитора миграционной активности эндотелиальных клеток [31]. В частности, антимиграционный эффект полипептида реализуется через интегриновые рецепторы типа  $\alpha_5\beta_1$ , являющиеся непосредственными эффекторами онкогенных сигнальных путей FAK/MEK/ERK1 и FAK/MEKK/p38 [32, 33]. В связи с тем, что пролиферация и миграция эндотелиоцитов обеспечивают нормальное течение ангиогенеза, нарушение этих этапов влечет за собой деградацию сосудистой сети [34, 35]. Итогом перечисленных процессов является угнетение роста первичного опухолевого очага за счет уменьшения объема доставки необходимых питательных веществ. Кроме того, лишение новообразования должного кровоснабжения позволяет ограничить распространение раковых клеток и формирование метастазов.

Несмотря на доказанную противоопухолевую эффективность эндостатина внедрение его в клиническую практику весьма ограничено. Лишь в Китае человеческий рекомбинантный эндостатин, запатентованный под названием ENDOSTAR®, одобрен для лечения немелкоклеточного рака легких [36]. Однако, использование антионкогенного потенциала эндостатина в терапии ПКПР может быть не менее эффективным ввиду анатомических и патофизиологических особенностей данного типа опухоли. Прежде всего, это обильная васкуляризация злокачественных новообразований челюстно-лицевой области, которая

значительно усугубляет лечение онкологических пациентов, существенно повышая риск возникновения осложнений в виде кровотечений [37, 38]. Кроме того, результаты недавних исследований свидетельствуют о существенном снижении уровня белка эндостатина в сыворотке крови пациентов с ПКПР по сравнению со здоровыми людьми. Авторами статьи также продемонстрирована статистически значимая ассоциация между концентрацией эндостатина и стадией злокачественного новообразования [39]. Интересно, что подобная закономерность прослеживается и для экспрессии эндостатина непосредственно в тканях опухолевого очага. Так, при проведении иммуногистохимического анализа образцов ПКПР без метастазирования в 100% случаев была выявлена средняя степень экспрессии эндостатина, в то время как в группе метастазирующего рака только в 30% случаев наблюдалась средняя интенсивность, а в остальных 70% слабая [40].

Принимая во внимание имеющиеся данные, логично предположить, что механизм активации ангиогенного потенциала при опухолевом процессе может быть использован в лечении ПКПР. Действительно, в экспериментальном исследовании Z. Adhim и соавт. показано, что использование аденовируса E10A, несущего ген эндостатина, в клеточных культурах рака челюстно-лицевой области приводит к стабильной экспрессии данного полипептида *in vitro* [41]. Кроме того, авторами продемонстрирован значительный эффект ингибирования роста ксенографтных опухолей указанного типа при введении E10A в комбинации с цисплатином. В образцах опухолевых тканей экспериментальной группы животных выявлено значимое снижение плотности микроциркуляторного русла по отношению к группе, получавшей химиотерапевтический препарат в виде монотерапии. На основании полученных данных авторами был сделан вывод о целесообразности применения эндостатина в комбинированной терапии ПКПР.

Наряду со своей главной функцией ингибитора ангиогенеза, эндостатин способен оказывать непосредственное противоопухолевое действие, в том числе и на клетки ПКПР. В работе R.P. Wilson и соавт. продемонстрирована эффективность эндостатина как средства, подавляющего миграцию и инвазию клеточных линий ПКПР путем изменения активности транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и AP-1 [42]. Известно, что под контролем сигнальных путей NF- $\kappa$ B и AP-1 находятся множество генов, ответственных за опухолевую прогрессию [43]. Также в ходе данного исследования установлен механизм реализации противоопухолевого потенциала полипептида

за счет подавления экспрессии матриксных металлопротеиназ-9, -10 и фактора роста эндотелия сосудов. Представляют интерес данные, полученные группой финских ученых в экспериментах с плоскоклеточным раком языка [44]. С помощью *in vitro* метода желатиновой зимографии проведен анализ активности матриксных металлопротеиназ-2, -9 и -13 в опухолевых клеточных линиях, подвергшихся лечению эндостатином. В результате зафиксировано, что под действием природного ингибитора ангиогенеза блокируется преобразование протеолитических ферментов в активные формы. Данный эффект имеет весьма важную терапевтическую значимость, ведь процесс инвазивного роста новообразования непосредственно связан с активностью секретируемых раковыми клетками протеиназ [45]. В литературе имеются указания на наличие прямой корреляционной зависимости между экспрессией матриксных металлопротеиназ и метастазированием в регионарные лимфатические узлы при ПКПР [46]. Другое исследование раскрывает механизм прямого противоопухолевого действия эндостатина в условиях характерной для опухолевого очага гипоксии. Группой ученых под руководством С. Hebert открыта способность полипептида подавлять экспрессию фактора VEGF посредством контроля образования уровня оксида азота, вырабатываемого клетками ПКПР [47]. Кроме того, установлено, что при использовании ингибиторов синтеза оксида азота совместно с эндостатином, имеет место потенцирование антимиграционного и антиинвазивного эффекта в отношении опухолевых клеток. Обращает на себя внимание экспериментальная работа японских ученых, посвященная изучению механизмов влияния эндостатина на лимфогенное метастазирование ПКПР [48]. С одной стороны, в условиях *in vitro* полипептид не был способен снизить пролиферацию самих раковых клеток. Однако, терапия природным ингибитором ангиогенеза сопровождалась регрессией роста ксенографтов плоскоклеточного рака полости рта. При проведении гистологического исследования образцов опухолевых тканей обнаружено уменьшение числа кровеносных и лимфатических сосудов в группе с эндостатином по сравнению с контрольной. Анализ экспрессии фактора VEGF-C, маркера лимфатических сосудов, выявил значительное снижение синтеза данного белка в образцах, подвергшихся воздействию полипептида. Таким образом, антионкогенная активность эндостатина в условиях *in vivo* возможна благодаря ингибированию лимфангиогенеза в опухолевом очаге.

Весьма противоречивыми являются данные финских исследователей о характере воздействия эндо-

статина на ПКПР [49]. Согласно результатам иммуногистохимического анализа показателя Ki-67, индекс пролиферативной активности опухолевых клеток, трансфицированных геном эндостатина, превышает аналогичный показатель в тканях контрольной группы. Кроме того, показан механизм супрессии апоптоза эндостатином за счет снижения уровня активной каспазы-3 в раковых клетках. Это единственный пример, иллюстрирующий активирующее действие полипептида на пролиферацию опухолевых клеток. Тем не менее, в ходе дальнейших экспериментов продемонстрирована способность эндостатина ингибировать инвазию ПКПР в условиях *in vitro* и *in vivo*, а также миграцию гингивальных фибробластов из опухолевого окружения.

Проведенный нами анализ опубликованных экспериментальных исследований, посвященных изучению воздействия эндостатина на ПКПР, позволяет сделать вывод о способности природного ингибитора ангиогенеза подавлять прогрессию злокачественных новообразований челюстно-лицевой области за счет ингибирования неоангиогенеза и метастазирования. Следует отметить, что противоопухолевый эффект эндостатина — это результат комплексного воздействия на раковые клетки, эндотелиоциты и компоненты опухолевого микроокружения. Таким образом, приведенные аргументы доказательно обосновывают перспективность дальнейших исследований в указанном направлении. В данной ситуации крайне важным становится глубокое понимание патогенетических механизмов опухолевого процесса с целью оптимизации применения эндостатина и создания на его основе новых методов лечения, способных ингибировать развитие плоскоклеточного рака полости рта.

### Литература

#### (п.п. 2-49 см. References)

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. *Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность)*. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019.

### References

1. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V., eds. *Malignant neoplasms in Russia in 2018 (morbidity and mortality)*. [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2018 godu (zabolevaemost' i smertnost')]. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena — filial FGBU «NMIRTs radiologii» Minzdrava Rossii; 2019. (in Russian)
2. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics. 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019; 69(1): 7-34.
3. Chow L.Q.M. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2020; 382(1): 60-72.

4. Alsahafi E., Begg K., Amelio I., Raulf N., Lucarelli P., Sauter T. et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis.* 2019; 10(8): 540.
5. García-Martín J.M., Varela-Centelles P., González M., Seoane-Romero J.M., Seoane J., García-Pola M.J. Epidemiology of oral cancer. In: Panta P., eds. *Oral Cancer Detection*. Cham: Springer; 2019: 81-93.
6. Elkrief A., Makhoul N., Bouganim N. Novel and Emerging Chemotherapeutic Agents in Head and Neck Cancer. In: Kademani D., eds. *Improving Outcomes in Oral Cancer*. Cham: Springer; 2020: 117-28.
7. Liu Y., Yang M., Luo J., Zhou H. Radiotherapy targeting cancer stem cells “awakens” them to induce tumour relapse and metastasis in oral cancer. *Int J Oral Sci.* 2020; 12(1): 19.
8. Forghani R., Chatterjee A., Reinhold C., Pérez-Lara A., Romero-Sanchez G., Ueno Y. et al. Head and neck squamous cell carcinoma: prediction of cervical lymph node metastasis by dual-energy CT texture analysis with machine learning. *Eur Radiol.* 2019; 29(11): 6172-81.
9. Xing Y., Zhang J., Lin H., Gold K.A., Sturgis E.M., Garden A.S. et al. Relation between the level of lymph node metastasis and survival in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2016; 122(4): 534-45.
10. Chen L., Zhou Z., Sher D., Zhang Q., Shah J., Pham N.L. et al. Combining many-objective radiomics and 3D convolutional neural network through evidential reasoning to predict lymph node metastasis in head and neck cancer. *Phys Med Biol.* 2019; 64(7): 075011.
11. Saman H., Raza S.S., Uddin S., Rasul K. Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches. *Cancers (Basel).* 2020; 12(5): 1172.
12. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1985; 43: 175-203.
13. Folkman J., Kalluri R. Cancer without disease. *Nature.* 2004; 427(6977): 787.
14. Teleanu R.I., Chircov C., Grumezescu A.M., Teleanu D.M. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic strategies for cancer treatment. *J Clin Med.* 2020; 9(1): 84.
15. Kyzas P.A., Stefanou D., Batistatou A., Agnantis N.J. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005; 131(9): 624-30.
16. Seki S., Fujiwara M., Matsuura M., Fujita S., Ikeda H., Asahina I. et al. Prediction of outcome of patients with oral squamous cell carcinoma using vascular invasion and the strongly positive expression of vascular endothelial growth factors. *Oral Oncol.* 2011; 47(7): 588-93.
17. de Oliveira M.V.M., Gomes É.P.P., Pereira C.S., de Souza L.R., Barros L.O., Mendes D.C. et al. Prognostic value of microvessel density and p53 expression on the locoregional metastasis and survival of the patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2013; 21(5): 444-51.
18. Yamamoto C., Yuasa K., Okamura K., Shiraiishi T., Miwa K. Vascularity as assessed by Doppler intraoral ultrasound around the invasion front of tongue cancer is a predictor of pathological grade of malignancy and cervical lymph node metastasis. *Dentomaxillofac Radiol.* 2016; 45(3): 20150372.
19. Mukherjee A., Madamsetty V.S., Paul M.K., Mukherjee S. Recent advancements of nanomedicine towards antiangiogenic therapy in cancer. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(2): 455.
20. Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy - endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res.* 2006; 312(5): 594-607.
21. He L., Zhao C., Li Y., Du G., Liu K., Cui D. et al. Antiangiogenic effects of recombinant human endostatin in lung cancers. *Mol Med Rep.* 2018; 17(1): 79-86.
22. Li K., Shi M., Qin S. Current Status and Study Progress of Recombinant Human Endostatin in Cancer Treatment. *Oncol Ther.* 2018; 6(1): 21-43.
23. Rezaei N., Mehrnejad F., Vaezi Z., Sedghi M., Asghari S.M., Naderi-Manesh H. Encapsulation of an endostatin peptide in liposomes: Stability, release, and cytotoxicity study. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2020; 185: 110552.
24. Cui R., Ohashi R., Takahashi F., Yoshioka M., Tominaga S., Sasaki S. et al. Signal transduction mediated by endostatin directly modulates cellular function of lung cancer cells in vitro. *Cancer Sci.* 2007; 98(6): 830-7.
25. Jia Y., Liu M., Huang W., Wang Z., He Y., Wu J. et al. Recombinant human endostatin endostar inhibits tumor growth and metastasis in a mouse xenograft model of colon cancer. *Pathol Oncol Res.* 2012; 18(2): 315-23.
26. Lee J.H., Isayeva T., Larson M.R., Sawant A., Cha H.R., Chanda D. et al. Endostatin: A novel inhibitor of androgen receptor function in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015; 112(5): 1392-7.
27. Shen Y., Chen Q., Li L. Endostar regulates EMT, migration and invasion of lung cancer cells through the HGF-Met pathway. *Mol Cell Probes.* 2019; 45: 57-64.
28. Ding Y., Wang Y., Cui J., Si T. Endostar blocks the metastasis, invasion and angiogenesis of ovarian cancer cells. *Neoplasma.* 2020; 67(3): 595-603.
29. Dhanabal M., Ramchandran R., Waterman M.J., Lu H., Knebelmann B., Segal M. et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem.* 1999; 274(17): 11721-6.
30. Hanai J., Dhanabal M., Karumanchi S.A., Albanese C., Waterman M., Chan B. et al. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem.* 2002; 277(19): 16464-9.
31. Rehn M., Veikkola T., Kukk-Valdre E., Nakamura H., Ilmonen M., Lombardo C.R. et al. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(3): 1024-9.
32. Wickström S.A., Alitalo K., Keski-Oja J. Endostatin associates with integrin  $\alpha 5\beta 1$  and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells. *Cancer Res.* 2002; 62(19): 5580-9.
33. Sudhakar A., Sugimoto H., Yang C., Lively J., Zeisberg M., Kalluri R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(8): 4766-71.
34. Yu M., Han Y., Zhuo H., Zhang S. Endostar, a modified Endostatin induces vascular normalization to improve chemotherapy efficacy through suppression of Src signaling pathway. *Cancer Biother Radiopharm.* 2018; 33(4): 131-8.
35. Peng L., Wang Y., Fei S., Wei C., Tong F., Wu G. et al. The effect of combining Endostar with radiotherapy on blood vessels, tumor-associated macrophages, and T cells in brain metastases of Lewis lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2020; 9(3): 745-60.
36. Walia A., Yang J.F., Huang Y.H., Rosenblatt M.I., Chang J.H., Azar D.T. Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1850(12): 2422-38.
37. Prakash R., Mohan V., Gopinathan P.A., Nair M.S., Bai J. R. Angiogenesis in head and neck cancer: An overview. *J Int Oral Health.* 2018; 10(5): 211-5.

38. Szafarowski T., Sierdzinski J., Szczepanski M.J., Whiteside T.L., Ludwig N., Krzeski A. Microvessel density in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018; 275(7): 1845-51.
39. Mardani M., Tadbir A.A., Ranjbar M.A., Khademi B., Fattahi M.J., Rahbar A. Serum Endostatin Levels in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2018; 30(98): 125-30.
40. Nikitakis N.G., Rivera H., Lopes M.A., Siavash H., Reynolds M.A., Ord R.A. et al. Immunohistochemical expression of angiogenesis-related markers in oral squamous cell carcinomas with multiple metastatic lymph nodes. *Am J Clin Pathol.* 2003; 119(4): 574-86.
41. Adhim Z., Lin X., Huang W., Morishita N., Nakamura T., Yasui H. et al. E10A, an adenovirus-carrying endostatin gene, dramatically increased the tumor drug concentration of metronomic chemotherapy with low-dose cisplatin in a xenograft mouse model for head and neck squamous-cell carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2012; 19(2): 144-52.
42. Wilson R.F., Morse M.A., Pei P., Renner R.J., Schuller D.E., Robertson F.M. et al. Endostatin inhibits migration and invasion of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Anticancer Res.* 2003; 23(2B): 1289-95.
43. Ji Z., He L., Regev A., Struhl K. Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- $\kappa$ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019; 116(19): 9453-62.
44. Nyberg P., Heikkilä P., Sorsa T., Luostarinen J., Heljasvaara R., Stenman U.H. et al. Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloprotease-2, -9, and -13. *J Biol Chem.* 2003; 278(25): 22404-11.
45. Miguel A.F., Mello F.W., Melo G., Rivero E.R. Association between immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases and metastasis in oral squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck.* 2020; 42(3): 569-84.
46. Ren Z.H., Wu K., Yang R., Liu Z.Q., Cao W. Differential expression of matrix metalloproteinases and miRNAs in the metastasis of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health.* 2020; 20(1): 24.
47. Hebert C., Siavash H., Norris K., Nikitakis N.G., Sauk J.J. Endostatin inhibits nitric oxide and diminishes VEGF and collagen XVIII in squamous carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2005. 114(2): 195-201.
48. Fukumoto S., Morifuji M., Katakura Y., Ohishi M., Nakamura S. Endostatin inhibits lymph node metastasis by a down-regulation of the vascular endothelial growth factor C expression in tumor cells. *Clin Exp Metastasis.* 2005; 22(1): 31-8.
49. Alahuhta I., Aikio M., Väyrynen O., Nurmenniemi S., Suojanen J., Teppo S. et al. Endostatin induces proliferation of oral carcinoma cells but its effect on invasion is modified by the tumor microenvironment. *Exp Cell Res.* 2015; 336(1): 130-40.

**Сведения об авторах:**

**Тугузбаева Гульнара Маратовна**, аспирант каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, e-mail: gulnaritta@gmail.com;

**Павлов Валентин Николаевич**, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, зав. каф. урологии с курсом ИДПО, ректор ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, e-mail: pavlov@bashgmu.ru;

**Еникеев Дамир Ахметович**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, e-mail: enikeyev@mail.ru

## Методика

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.18, 616-092.4, 575.155

Сазонова М.А.<sup>1,2,4</sup>, Синёв В.В.<sup>1,2</sup>, Рыжкова А.И.<sup>1</sup>, Сазонова М.Д.<sup>1</sup>, Дорошук Н.А.<sup>2</sup>, Кириченко Т.В.<sup>5</sup>, Карагодин В.П.<sup>1,4</sup>, Орехов А.Н.<sup>1,3,5</sup>, Собенин И.А.<sup>1,2</sup>

# Создание цибридных клеточных культур, содержащих однонуклеотидную замену в гене MT-TL2, ассоциированную с атеросклерозом

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

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

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России,

121552, Москва, Россия, 3-я Черепковская ул., д. 15а;

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково,

121609, Московская обл., Сколково, Россия, ул. Новая, д. 100;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова»,

117997, Москва, Россия, Стремянный переулок, д. 36;

<sup>5</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»,

117418, Москва, Россия ул. Цюрупы, д. 3

**Введение.** Цибридные клеточные модели наиболее перспективны для изучения патогенеза различных заболеваний. Авторами статьи впервые были созданы такие модели для изучения митохондриальной дисфункции и патологических процессов, развивающихся при атеросклерозе.

**Цель работы** – создание цибридных культур с высоким уровнем гетероплазии по мутации митохондриального генома m.12315G>A. В предварительных исследованиях авторами статьи было установлено, что пороговый уровень гетероплазии мутации m.12315G>A ассоциирован с атеросклерозом.

**Методика.** Цибридные культуры создавали путем слияния безмитохондриальных клеток (rho0) и митохондрий из тромбоцитов участников исследования с высоким уровнем гетероплазии исследуемых мутаций. Для создания rho0-клеток была взята культура монохлорного происхождения ТНР-1. Безмитохондриальные клетки были получены с помощью метода М. Кинга и Г. Аттарди. Тромбоциты выделяли из цельной крови участников исследования. Для этого был применен метод центрифугирования в градиенте плотности фиколла-урографина. Для получения цибридных культур клеток была использована методика «ПЭГ-слияния». В созданных безмитохондриальных и цибридных клеточных культурах был проведен количественный анализ копий митохондриального генома. Согласно результатам данного анализа было подтверждено либо отсутствие митохондрий (rho0-клетки), либо их наличие (цибриды). Количество копий мтДНК детектировалось с помощью реал-тайм ПЦР в присутствии красителя SYBR Green I.

**Результаты.** Получены 4 цибридные клеточные линии, содержащие мутацию m.12315G>A с уровнем гетероплазии выше порогового значения.

**Заключение.** Созданы 4 цибридные культуры с высоким уровнем гетероплазии по мутации митохондриального генома m.12315G>A. Полученные цибридные клеточные линии могут служить моделями для изучения молекулярно-клеточных механизмов митохондриальной дисфункции при атеросклерозе и других сердечно-сосудистых заболеваниях. Цибридные культуры можно использовать для моделирования атерогенеза, а также для подбора патогенетически обоснованной лекарственной терапии при атеросклерозе.

**Ключевые слова:** цитоплазматические гибриды; митохондриальный геном; цибриды; мутация; ген MT-TL2; мтДНК; цибридная модель; метод создания цибридов

**Для цитирования:** Сазонова М.А., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Сазонова М.Д., Дорошук Н.А., Кириченко Т.В., Карагодин В.П., Орехов А.Н., Собенин И.А. Создание цибридных клеточных культур, содержащих однонуклеотидную замену в гене MT-TL2, ассоциированную с атеросклерозом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 140-147.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.140-147

**Для корреспонденции:** Сазонова Маргарита Александровна, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Сазонова М.А.; методология – Сазонова М.А.; сбор и обработка материала – Сазонова М.А., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Сазонова М.Д., Дорошук Н.А, Кириченко Т.В.; написание текста – Сазонова М.А.; редактирование – Карагодин В.П., Орехов А.Н., Собенин И.А.

**Финансирование.** Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант №19-015-00479).

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

Поступила 05.09.2020

Принята в печать 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Sazonova M.A.<sup>1,2,4</sup>, Sinyov V.V.<sup>1,2</sup>, Ryzhkova A.I.<sup>1</sup>, Sazonova M.D.<sup>1</sup>, Doroshchuk N.A.<sup>2</sup>, Kirichenko T.V.<sup>1,5</sup>, Karagodin V.P.<sup>1,4</sup>, Orekhov A.N.<sup>1,3,5</sup>, Sobenin I.A.<sup>1,2</sup>

## Creation of cybrid cell cultures containing a single-nucleotide substitution associated with atherosclerosis in the MT-TL2 gene

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

<sup>2</sup> National Medical Research Center of Cardiology,  
3rd Cherepkovskaya Str. 15a, Moscow 121552, Russia;

<sup>3</sup> Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre,  
Novaya Str. 100, Skolkovo, 121609, Moscow Region, Russia;

<sup>4</sup> G.V. Plekhanov Russian University of Economics,  
Stremyanny Pereulok 36, Moscow 117997, Russia;

<sup>5</sup> Institute of Human Morphology,  
Tsyurupy Str. 3, Moscow. 117418, Russia

**Introduction.** Cybrid cell models are most promising for studying pathological mechanisms in different diseases. The authors for the first time created such models for studying mitochondrial dysfunction and pathological processes underlying atherosclerosis.

**Aim.** Creation of cybrid cultures with a high heteroplasmy level for mitochondrial genome mutation m.12315G>A. A preliminary study by the authors showed that the heteroplasmy level of mutation m.12315G>A was associated with atherosclerosis.

**Methods.** Cybrid cultures were created by fusing non-mitochondrial cells (rho0) and mitochondria from platelets of study participants with a high heteroplasmy level of the mutations under study. A THP-1 culture of monocytic origin was used to create rho0 cells. Non-mitochondrial cells were obtained using the M. King and G. Attardi method. Platelets were extracted from whole blood of study participants with Ficoll-Urografin density gradient centrifugation. Cybrid cell cultures were obtained by the PEG-mediated fusion method. In the created non-mitochondrial and cybrid cell cultures, quantitative analysis of mitochondrial genome copies was performed. This analysis confirmed either the absence of mitochondria (rho0-cells) or their presence (cybrids). The mtDNA copies were quantified using real-time PCR in the presence of the SYBR Green I stain.

**Results.** Four cybrid cell lines were obtained, which contained the m.12315G>A mutation with heteroplasmy levels higher than the threshold level.

**Conclusion.** Four cybrid cultures were created with a high heteroplasmy level for the mitochondrial genome mutation m.12315G>A. The obtained cell lines can be used as models for studying molecular cellular mechanisms of mitochondrial dysfunction in atherosclerosis and cardiovascular diseases. In addition, they may be useful for modeling atherogenesis in cells and for selecting therapy for patients with atherosclerosis.

**Keywords:** cytoplasmic hybrids; mitochondrial genome; cybrids; mutation; gene MT-TL2; mtDNA; cybrid model; cybrids creation method

**For citation:** Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Doroshchuk N.A., Kirichenko T.V., Karagodin V.P., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Creation of cybrid cell cultures containing a single-nucleotide substitution associated with atherosclerosis in the MT-TL2 gene. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 140-147. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.140-147

**For correspondence:** Sazonova Margarita Alexandrovna, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com

**Contribution.** research concept and design – Sazonova M.A.; methodology – Sazonova M.A.; material collecting and processing Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Doroshchuk N.A., Kirichenko T.V.; writing text – Sazonova M.A.; text editing – Karagodin V.P., Orekhov A.N., Sobenin I.A.

**Acknowledgment.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant # 19-015-00479)

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

**Information about the authors:**

Сазонова М.А., <http://orcid.org/0000-0002-8610-4593>

Синёв В.В., <https://orcid.org/0000-0001-5105-5763>

Рыжкова А.И., <https://orcid.org/0000-0002-8838-7750>  
Сазонова М.Д., <https://orcid.org/0000-0002-9452-1282>  
Дорошук Н.А., <https://orcid.org/0000-0003-2258-6463>  
Кириченко Т.В., <https://orcid.org/0000-0002-2899-9202>  
Карагодин В.П., <https://orcid.org/0000-0003-0501-8499>  
Орехов А.Н., <https://orcid.org/0000-0002-6495-1628>  
Собенин И.А., <https://orcid.org/0000-0003-0978-6444>

Received 05.09.2020  
Accepted 16.10.2020  
Published 26.11.2020

## Введение

Актуальной задачей медицины является создание клеточных моделей, содержащих патогенные мутации, с целью изучения патогенеза и разработки лекарственной терапии различных патологий [1–5]. Например, такие гибридные модели были созданы для исследования патогенеза атрофии зрительных нервов Лебера, болезни Паркинсона, синдрома MELAS, болезни Альцгеймера, ВИЧ, синдрома Ли [1–5]. Однако до сих пор не было создано гибридных клеточных моделей для изучения патогенеза атеросклероза.

Следует отметить, что одним из самых тяжелых заболеваний 21 века является атеросклероз [6–10]. Данное заболевание является одной из важнейших причин развития сосудистых катастроф (инфаркт, ишемический инсульт), причиной смерти большого количества людей [11–15]. Одной из причин атерогенеза считается митохондриальная дисфункция [16–20]. Установлена ассоциация атеросклеротических поражений артерий с митофагией [16–18]. Выявлены сигнальные пути, с помощью которых дисфункция митохондрий связана с окислительным стрессом, а также с уменьшением длины теломер и атеросклерозом [18–21]. Обнаружено, что метаболические заболевания могут привести к повреждению мембраны митохондрий. Эти повреждения могут быть причиной митохондриальной дисфункции, которая сопровождается окислительным стрессом, приводящим к возникновению атеросклеротических поражений сосудов [22–26].

В настоящей работе была предпринята попытка создания гибридных моделей, содержащих атерогенную мутацию митохондриального генома. Созданы четыре гибридные культуры с высоким уровнем гетероплазмии по мутации  $m.12315G>A$ , которая локализована в гене *MT-TL2* кодирующего региона митохондриального генома. Результатом данной мутации может быть дисфункция транспортной РНК-Лейцин (кодон узнавания CUN). При этом снижается уровень синтеза митохондриальных белков на рибосоме.

## Методика

*Метод создания безмитохондриальных (rho0) культур.* При получении безмитохондриальных клеток использовался метод М. Кинга и Г. Аттарди [16]. Последовательность создания безмитохондриальных клеток была следующей:

1. На первом этапе проверялась возможность создания rho0-клеток (клетки, которые потеряли митохондрии в результате химического воздействия). Культуру моноцитарного происхождения ТНР-1 культивировали в ростовой среде. Было использовано 2 варианта:

1) культивирование с добавлением уридина и бромистого этидия.

2) культивирование с добавлением только бромистого этидия.

Среда для роста клеток содержала пируват и глюкозу в концентрации, указанной для полной среды DMEM. Авторами статьи были определены следующие условия для культивирования ТНР-1, с целью создания rho0-клеток:

1) определено время культивирования клеток ТНР-1.

2) определена концентрация добавок к среде для культивирования клеток ТНР-1.

2. На втором этапе проводилось непосредственно создание rho0-клеточной линии. Клетки нативной культуры ТНР-1 были помещены в ростовую среду с добавлением уридина и бромистого этидия. При этом бромистый этидий блокировал мтДНК. Возникла митохондриальная дисфункция. Затем данная линия клеток была помещена в среду только с уридином (бромистый этидий в среде отсутствовал). В процессе культивирования на такой среде клетки теряли все функционирующие митохондрии — они становились безмитохондриальными (rho0).

После этого проводилась проверка, является ли данная rho0-клеточная линия устойчивой и долгоживущей в подобранных нами условиях. Затем проводился анализ количества копий митохондриального генома в rho0-культуре. Если количество копий мтДНК в

безмитохондриальной культуре было значительно меньше, чем в нативной культуре ТНР-1, или они вообще отсутствовали, то считалось, что безмитохондриальная культура получена.

В процессе создания  $\rho$ ho0-клеток и цибридных культур были использованы для приготовления ростовой среды следующие реактивы: эмбриональная бычья сыворотка (10% от общего объема); RPMI-1640; бета-меркаптоэтанол ( $2 \times 10^{-5}$  М); 100-кратный пенициллин-стрептомицин (пенициллин – 50 ед/мл, стрептомицин – 50 мкг/мл); d-глюкоза (2500 мг/л); L-глутамин (300 мг/л); пируват натрия (110 мкг/л).

Для приготовления 10-кратного цитрата натрия использовали: физиологический раствор (0,15M NaCl); цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) тринатриевой соли, дигидрат); полиэтиленгликоль 1500 (42% от общего объема); DMEM [-Ca<sup>2+</sup>] (9,5 мл); диметилсульфоксид (ДМСО) (2 мл); ПЭГ раствор. Кроме того, использовались готовые среды и растворы: уридин (раствор 50 мг/мл); фиколл-урографин (плотность 1,077); бромистый этидий (1% раствор); физиологический раствор DMEM [-Ca<sup>2+</sup>] (0,15M NaCl); ДМСО.

Комплект реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I был использован для определения количества копий митохондриальной ДНК в нативной, цибридной и  $\rho$ ho0 культурах клеток.

*Выделение тромбоцитов из крови.* Настоящее исследование было выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией. Все участники исследования дали письменное информированное согласие на участие в данном исследовании.

С помощью слияния  $\rho$ ho0-клеток с тромбоцитами, выступающими в качестве клеток-доноров митохондрий, были получены цибридные клетки.

Тромбоциты пациентов выделялись из цельной крови. Для этого был применен метод центрифугирования в градиенте плотности фиколла-урографина. Метод выделения тромбоцитов из крови состоял из трех этапов:

1. На первом этапе была проведена подготовка образцов крови.

К образцам крови участников исследования-доноров тромбоцитов, добавляли 10-кратный раствор цитрата натрия в физиологическом растворе в соотношении 1:1. Полученную смесь центрифугировали 20 мин при 200 g при температуре 12 °С.

2. На втором этапе проводилось выделение тромбоцитов.

Отбирали три четверти супернатанта (плазмы) и центрифугировали 20 мин при 1500 g при температуре 15 °С. Отбирали супернатант. К оставшемуся осадку добавляли 11 мл физиологического раствора.

3. На третьем этапе выделенные тромбоциты подготавливались к криохранению: к 11 мл суспензии тромбоцитов в физрастворе добавляли 1,5 мл стерильного ДМСО и 3 мл FBS. Криовials помещали в штатив для контролируемого замораживания клеток (1°C/мин) на 8 часов при температуре -80 °С. Полученные образцы хранили в жидком азоте.

*Метод создания цибридных культур клеток.* Основным условием проникновения митохондрий в безмитохондриальные клетки является образование пор в цитоплазматических мембранах клеток. Поры могут образовываться при воздействии на  $\rho$ ho0-клетки определенных физических или химических факторов. Следует отметить, что в литературе отсутствуют сведения о создании цибридных клеточных культур на основе клеточной культуры моноцитарного происхождения ТНР-1. Поэтому в настоящей работе данные цибридные культуры были созданы впервые.

Нашей исследовательской группой была использована методика «ПЭГ-слияния». Данная методика позволяет создавать цибриды с помощью слияния безмитохондриальных клеток с тромбоцитами, которые используются в качестве клеток-доноров митохондрий. Следует подчеркнуть, что в тромбоцитах отсутствует ядерный геном. Они содержат только митохондриальную ДНК. Поэтому использование тромбоцитов в качестве доноров митохондрий (в том числе, митохондриального генома) значительно упрощает протокол получения цибридных линий.

*Этапы создания цибридов:* 1. На первом этапе проводилась подготовка клеток перед слиянием. В том случае, если тромбоциты были заморожены, то вначале они подвергались разморозке и удалению криопротектора. Суспензию с тромбоцитами добавляли к 14 мл подогретого до температуры 37 °С физиологического раствора. Предварительный подогрев криопробирки с тромбоцитами до данной температуры осуществлялся на водяной бане. Затем было проведено центрифугирование в течение 15 мин при 1500 g при температуре 15 °С. Из пробирки был отобран супернатант.

2. На втором этапе была проведена подготовка безмитохондриальных клеток. Для этого центрифугировали суспензию  $\rho$ ho0-клеток в течение 5 мин при 180 g при температуре 25 °С. Безмитохондриальные клетки ресуспендировали в среде DMEM [-Ca<sup>2+</sup>] в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл.

3. На третьем этапе проводилось слияние  $\rho$ ho0-клеток с тромбоцитами.

Безмитохондриальные клетки добавляли к осадку тромбоцитов. Центрифугировали в течение 10 мин при 180 g при температуре 25 °С. Был отобран супернатант.

После этого к осадку тромбоцитов с  $\rho\text{ho}0$ -клетками было добавлено 100 мкл 42% ПЭГ. Было проведено ресуспендирование. По истечении 1 мин, было проведено повторное ресуспендирование в течение 30 с, после чего было проведено культивирование полученной суспензии клеток в ростовой среде в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при температуре 37 °С.

*Количественный анализ копий митохондриального генома в безмитохондриальных клеточных культурах и цибридах.* В созданных безмитохондриальных и цибридных клеточных культурах был проведен количественный анализ копий митохондриального генома. Согласно результатам данного анализа было подтверждено либо отсутствие митохондрий ( $\rho\text{ho}0$ -клетки), либо их наличие (цибриды). Количество копий мтДНК детектировалось с помощью реал-тайм ПЦР в присутствии красителя SYBR Green I. Контролем служила нативная культура клеток моноцитарного происхождения ТНР-1.

Определение количества копий митохондриального генома проводилось с использованием контрольных синтетических матриц на основе участка митохондриальной ДНК в концентрациях  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  и  $10^6$ . Была построена калибровочная кривая на основе данных Ствеличины матриц. Ее использовали для определения количества копий мтДНК в исследуемых образцах безмитохондриальной, цибридной и нативной культур клеток. Если количество копий митохондриального генома в исследуемой культуре было малочисленным или мтДНК вообще отсутствовала, в отличие от нативной ТНР-1, то принято было считать, что митохондрии в данной культуре отсутствуют или вскоре, после нескольких пассажей, исчезнут из клеток, вследствие утраты погибшими (из-за бромистого этидия) митохондриями способности к делению. Поэтому полученная культура считалась безмитохондриальной ( $\rho\text{ho}0$ ).

Уровень гетероплазмии мутации 12315G>A в безмитохондриальных клетках оказался чрезвычайно низким. Это было связано с тем, что количество копий митохондриального генома в клетках  $\rho\text{ho}0$  было очень мало по сравнению с данным параметром в нативной культуре ТНР-1. Например, в исследуемом образце общей ДНК (30 нг/мкл) из культуры  $\rho\text{ho}0$  было приблизительно  $10^3$  копии мтДНК. В то же время образец из нативной культуры ТНР-1 содержал более  $10^6$  копий митохондриального генома. После получения цибридных культур, содержащих мутацию 12315G>A уровень гетероплазмии этой одонуклеотидной замены в цибридных клетках оказался примерно таким же, как в тромбоцитах доноров-носителей исследуемой мутации.

*Определение уровня гетероплазмии мутации мтДНК m. 12315G>A.* С помощью  $\rho\text{ho}0$ -клеточных линий были

созданы цибридные клеточные культуры, содержащие высокий уровень гетероплазмии мутации митохондриального генома. Уровень гетероплазмии мутации m.12315G>A был определен с помощью оригинального метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, разработанного авторами статьи на основе технологии пиросеквенирования [11-15].

Амплификаты ДНК доноров тромбоцитов, содержащие область исследованных мутаций, были пиросеквенированы. Затем в них был определен уровень гетероплазмии мутации m.12315G>A на основании формулы, разработанной авторами статьи [11-15].

Были использованы следующие праймеры для ПЦР [11-15]:

R: TТАСТТТТАТТТGGAGTTGCAC(12337-12317);

F: bio-СТСАТGСССССАТGТСТАА(12230-12249).

Для проведения ПЦР использовался стандартный буфер с сульфатом аммония. Концентрация хлорида магния в буфере была 2,5 mM. Размер амплификата для мутации m.12315G>A составлял 108 bp [11-15].

В качестве праймера для пиросеквенирования был использован [11-15]: TTTGGAGTTGCAC (12328-12316).

## Результаты и обсуждение

Нашей исследовательской группе не удалось обнаружить в литературе методов создания  $\rho\text{ho}0$ -клеток на основе культуры моноцитарного происхождения ТНР-1, поэтому такой метод был создан нами впервые.

Метод создания безмитохондриальной культуры на основе ТНР-1 описан в разделе «Методика». Отметим, что для создания устойчивых к многократному пересеванию и морфологически однородных цибридных линий, исследователи разных стран, в основном, использовали постоянные клеточные линии, т.е. клетки, уже прошедшие этап дедифференцировки. В своих экспериментах мы выбрали размер полного периода получения безмитохондриальной культуры ТНР-1. Он составил 18 нед. Результаты анализа количества копий митохондриального генома подтвердили отсутствие митохондрий в безмитохондриальной культуре. Контролем служила нативная культура клеток ТНР-1. Если количество копий митохондриального генома в исследуемой культуре было незначительным или мтДНК вообще отсутствовала, в отличие от нативной ТНР-1, то принято было считать, что  $\rho\text{ho}0$ -культура ТНР-1 создана.

Посредством ПЭГ-слияния безмитохондриальных клеток и митохондрий из тромбоцитов пациентов были получены цибридные культуры. Пороговый уровень гетероплазмии мутации мтДНК m.12315G>A использовался в качестве критерия для отбора доноров тром-

боцитов [14]. Согласно результатам предварительных исследований авторов статьи, мутация митохондриального генома m.12315G>A ассоциирована с атеросклеротическими поражениями интимы артерий человека [11–15].

Было проведено сравнение количества копий митохондриального генома в полученных гибридных культурах и rho0-культуре ТНР-1. Количество копий мтДНК в гибридных культурах клеток оказалось значительно большим, чем в безмитохондриальной культуре (10<sup>6</sup> копий митохондриального генома, по сравнению с 10<sup>3</sup> копиями мтДНК, соответственно). На основе проведенного анализа был сделан вывод о том, что гибридные культуры созданы.

Таким образом, в настоящей работе были получены 4 гибридные клеточные культуры, в которых уровень гетероплазии мутации митохондриального генома m.12315G>A превышал пороговое значение в атеросклеротических бляшках (7,5%) и утолщенном интимо-медиальном слое сонных артерий (10,5%) [14]. В первой гибридной линии уровень гетероплазии мутации m.12315G>A составил 44%, во второй – 25%, в третьей – 38%, а в четвертой – 29%.

Следует отметить, что одна из гибридных клеточных линий, несущая мутацию митохондриального генома m.12315G>A, была создана с помощью тромбоцитов, полученных от пациента с утолщенным интимо-медиальным слоем сонных артерий, а другая – от участника исследования с нормальной интимой-медицей. При этом, третья гибридная культура была создана с помощью тромбоцитов, полученных от пациента с атеросклеротической бляшкой в сонных артериях, а четвертая – от участника исследования, не имевшего атеросклеротических бляшек в сонных артериях.

Созданные гибридные культуры несут мутацию, локализованную в кодирующем регионе митохондриального генома [11, 27–30]. Мутация m.12315G>A локализована в гене MT-TL2. В результате данной мутации может произойти дисфункция транспортной РНК-Лейцин (кодон узнавания CUN), с последующим снижением уровня синтеза митохондриальных белков на рибосоме [11–15]. Парное сравнение гибридных клеточных линий, имеющих высокий уровень гетероплазии по одной и той же мутации, может помочь исследовать молекулярно-клеточные механизмы митохондриальной дисфункции при атеросклерозе и сердечно-сосудистых заболеваниях.

### Заключение

В настоящей работе были созданы четыре гибридные культуры с высоким уровнем гетероплазии по

мутации митохондриального генома m.12315G>A. Полученные гибридные клеточные линии могут служить моделями для изучения молекулярно-клеточных механизмов митохондриальной дисфункции при атеросклерозе и сердечно-сосудистых заболеваниях. Кроме того, их можно использовать для моделирования атерогенеза, а также подбора лекарственной терапии для пациентов с атеросклерозом.

### Литература

(п.п. 1-14; 16; 18-28 см. References)

15. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. *Пат. физиол. и эксп. тер.* 2011;4:81-4. PMID: 22359940
17. Сазонова М.А., Синёв В.В., Карагодин В.П., Рыжкова А.И., Галицына Е.В., Баринаева В.А. и др. Влияние аутофагии на возникновение и развитие атеросклероза и его факторов риска. *Ангиология и сосудистая хирургия.* 2017; 23(4): 20-2. PMID: 29240051.
29. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Ассоциация мутаций митохондриального генома человека с хроническими заболеваниями невоспалительного генеза: сахарным диабетом 2 типа, артериальной гипертензией и различными видами кардиомиопатии. *Пат. физиол. и экпер. тер.* 2012; 3: 124-9. PMID: 23072124.
30. Иванова М.М., Бородачев Е.Н., Сазонова М.А. Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома. *Пат. физиол. и экпер. тер.* 2012; 3: 115-22. PMID: 23072123.

### References

1. Arduíno D.M., Esteves A.R., Swerdlow R.H., Cardoso S.M. A cybrid cell model for the assessment of the link between mitochondrial deficits and sporadic Parkinson's disease. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1265: 415-24. doi: 10.1007/978-1-4939-2288-8\_31
2. Garrido-Maraver J., Cordero M.D., Moñino I.D., Pereira-Arenas S., Lechuga-Vieco A.V., Cotán D. et al. Screening of effective pharmacological treatments for MELAS syndrome using yeasts, fibroblasts and cybrid models of the disease. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 167(6): 1311-28. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02086.x
3. Jiang P., Liang M., Zhang C., Zhao X., He Q., Cui L., et al. Biochemical evidence for a mitochondrial genetic modifier in the phenotypic manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy-associated mitochondrial DNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* 2016; 25(16): 3613-25. doi: 10.1093/hmg/ddw199
4. Jeong J.H., Yum K.S., Chang J.Y., Kim M., Ahn J.Y., Kim S., et al. Dose-specific effect of simvastatin on hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  and BACE expression in Alzheimer's disease cybrid cells. *BMC Neurol.* 2015; Jul. 31; 15: 127. doi: 10.1186/s12883-015-0390-5
5. Wilkins H.M., Carl S.M., Swerdlow R.H. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrial pathologies. *Redox. Biol.* 2014; 2: 619-31. doi: 10.1016/j.redox.2014.03.006. Review.
6. van Capelleveen J.C., Bochem A.E., Boekholdt S.M., Mora S., Hoogeveen R.C., Ballantyne C.M., et al. Association of High-Density Lipoprotein-Cholesterol Versus Apolipoprotein A-I With Risk of Coronary Heart Disease: The European Prospective Investigation Into Cancer-Norfolk Prospective Population Study, the

- Atherosclerosis Risk in Communities Study, and the Women's Health Study. *J. Am. Heart Assoc.* 2017; Aug. 3; 6(8): e006636. doi: 10.1161/JAHA.117.006636
7. Colantonio L.D., Gamboa C.M., Richman J.S., Levitan E.B., Soliman E.Z., Howard G. et al. Black-White Differences in Incident Fatal, Nonfatal, and Total Coronary Heart Disease. *Circulation.* 2017; Jul. 11; 136(2): 152-66. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025848
  8. Halcox J.P., Banegas J.R., Roy C., Dallongeville J., De Backer G., Guallar E. et al. Prevalence and treatment of atherogenic dyslipidemia in the primary prevention of cardiovascular disease in Europe: EURIKA, a cross-sectional observational study. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2017; Jun. 17; 17(1): 160. doi: 10.1186/s12872-017-0591-5
  9. Kubota Y., Heiss G., MacLehose R.F., Roetker N.S., Folsom A.R. Association of Educational Attainment With Lifetime Risk of Cardiovascular Disease: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *JAMA Intern. Med.* 2017; Aug. 1; 177(8): 1165-72. doi: 10.1001/jamainternmed.2017.1877
  10. Kalbaugh C.A., Kucharska-Newton A., Wruck L., Lund J.L., Selvin E., Matsushita K. et al. Peripheral Artery Disease Prevalence and Incidence Estimated From Both Outpatient and Inpatient Settings Among Medicare Fee-for-Service Beneficiaries in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J. Am. Heart Assoc.* 2017; May 3; 6(5):e003796. doi: 10.1161/JAHA.116.003796
  11. Sazonova M., Budnikov E., Khasanova Z., Sobenin I., Postnov A., Orekhov A. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. *Atherosclerosis.* 2009; 204(1):184-90. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.001
  12. Sazonova M., Andrianova I., Khasanova Z., Sobenin I., Postnov A. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta. 77th Congress of European Atherosclerosis Society, Istanbul, Turkey, April 26-29, 2008. *Atherosclerosis Suppl.* 2008; 9(1): 113.
  13. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Khasanova, Z.B., Postnov A.Yu., et al. Role of Mitochondrial Genome Mutations in Pathogenesis of Carotid Atherosclerosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017; 2017:6934394, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/6934394>
  14. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Galitsyna, E.V., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., et al. New markers of atherosclerosis: a threshold level of heteroplasmy in mtDNA mutations. *Vessel Plus.* 2017; 2017 (1): 182-91. doi: 10.20517/2574-1209.2017.16
  15. Sazonova M.A., Postnov A.Iu., Orekhov A.N., Sobenin I.A. A new method of quantitative estimation of mutant allele in mitochondrial genome. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2011; Oct.-Dec.; 4: 81-4. (in Russian). PMID: 22359940
  16. King M.P., Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.* 1996; 264: 304-13. doi:10.1016/S0076-6879(96)64029-4
  17. Sazonova M.A., Chicheva M.M., Zhelankin A.V., Sobenin I.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Association of mutations in the mitochondrial genome with the subclinical carotid atherosclerosis in women. *Exp. Mol. Pathol.* 2015; Apr., 21; 99(1): 25-32. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.04.003
  18. Zhang Y., Wang C., Jin Y., Yang Q., Meng Q., Liu Q. et al. Activating the PGC-1 $\alpha$ /TERT Pathway by Catalpol Ameliorates Atherosclerosis via Modulating ROS Production, DNA Damage, and Telomere Function: Implications on Mitochondria and Telomere Link. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018; Jun. 25; 2018: 2876350. doi: 10.1155/2018/2876350
  19. Salazar G. NADPH Oxidases and Mitochondria in Vascular Senescence. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; Apr. 29; 19(5):E1327. doi: 10.3390/ijms19051327. Review.
  20. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; Oct. 1; 51(7): 1289-301. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033. Epub 2011 Jul 6. Review.
  21. McCully K.S. Communication: Melatonin, Hyperhomocysteinemia, Thioretinaco Ozonide, Adenosylmethionine and Mitochondrial Dysfunction in Aging and Dementia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2018; Jan.; 48(1): 126-31. PMID: 29531009
  22. Docherty C.K., Carswell A., Friel E., Mercer J.R. Impaired mitochondrial respiration in human carotid plaque atherosclerosis: A potential role for Pink1 in vascular smooth muscle cell energetics. *Atherosclerosis.* 2018; Jan.; 268:1-11. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.11.009
  23. Yu E.P.K., Reinhold J., Yu H., Starks L., Uryga A.K., Foote K. et al. Mitochondrial Respiration Is Reduced in Atherosclerosis, Promoting Necrotic Core Formation and Reducing Relative Fibrous Cap Thickness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017; Dec.; 37(12): 2322-32. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310042]
  24. Ryzhkova A.I., Sazonova M.A., Sinyov V.V., Galitsyna E.V., Chicheva M.M., Melnichenko A.A. et al. Mitochondrial diseases caused by mtDNA mutations: a mini-review. *Therapeutics and Clinical Risk Management.* 2018; Oct. 9; 14: 1933-42. doi: 10.2147/TCRM.S154863
  25. Sazonova M.A., Shkurat T.P., Demakova N.A., Zhelankin A.V., Barinova V.A., Sobenin I.A. et al. Mitochondrial genome sequencing in atherosclerosis: what's next? *Curr. Pharm. Des.* 2016; 22(3): 390-6. doi: 10.2174/1381612822666151112152335
  26. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Sazonova M.D., Nikitina N.A., Shkurat T.P. et al. Mitochondrial mutations associated with cardiac angina. *Vessel Plus.* 2019; 3: 8. doi: 10.20517/2574-1209.2019.01
  27. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Galitsyna E.V., Melnichenko A.A., Demakova N.A. et al. Mitochondrial Genome Mutations Associated with Myocardial Infarction. *Dis. Markers.* 2018; Feb. 18; 2018: 9749457. doi: 10.1155/2018/9749457. eCollection 2018
  28. Zhelankin A.V., Sazonova M.A. Association of the mutations in the human mitochondrial genome with chronic non-inflammatory diseases: type 2 diabetes, hypertension and different types of cardiomyopathy. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2012; 3: 123-8. (in Russian). PMID: 23072124
  29. Ivanova M.M., Borodachev E.N., Sazonova M.A. Human pathologies associated with mutations of mitochondrial genome. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2012; 3: 115-22. (in Russian). PMID: 23072123.

**Сведения об авторах:**

**Сазонова Маргарита Александровна**, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП; ст. науч. сотр. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, канд. биол. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Синёв Василий Владимирович**, мл. науч. сотр. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; ст. лаборант с в/о лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Рыжкова Анастасия Игоревна**, мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Сазонова Марина Дмитриевна**, ст. лаборант с в/о лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Дорожук Наталья Александровна**, науч. сотр. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, канд. мед. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Кириченко Татьяна Валерьевна**, ст. науч. сотр. лаб. клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы сотр. ФГБНУ «НИИ морфологии человека», канд. биол. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Карагодин Василий Петрович**, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП; ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», доктор биол. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Орехов Александр Николаевич**, зав. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП; вед. науч. сотр. лаб. клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы ФГБНУ «НИИ морфологии человека», директор «НИИ атеросклероза» Инновационного центра Сколково, доктор биол. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Собенин Игорь Александрович**, зав. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России и вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, доктор мед. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com

© Коллектив авторов, 2020

УДК 57.085.23

Лунёва К.А.<sup>1,2</sup>, Клементьева О.Е.<sup>1</sup>, Терновская К.Э.<sup>1</sup>, Дубова Е.А.<sup>1</sup>, Лунёв А.С.<sup>1</sup>

## Опыт ксенотрансплантационного гетеротопического моделирования колоректального рака различных клеточных типов у бестимусных мышей линии BALB/c nude

<sup>1</sup>ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России,

123182, Москва, Россия, ул. Живописная, д. 46;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина», 109472, Москва, Россия, ул. Академика Скрябина, д. 23

**Введение.** Высокий уровень заболеваемости колоректальным раком стимулирует поиск методов его своевременной диагностики и эффективной терапии, что, в свою очередь, предполагает использование адекватных животных моделей на стадиях разработки и доклинических исследований.

**Методика.** Для моделирования гетеротопических ксенографтов были использованы клеточные культуры колоректального рака человека линий DLD-1, HCT 116 и HT-29. В качестве носителей опухолевых моделей были взяты мыши линии BALB/c nude. Суспензию клеток вводили подкожно в область лопатки с помощью шприца.

**Результаты.** Полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC) клетки культивировали до достижения необходимого количества для моделирования ксенографтов (20 сут). Клетки линии HCT-116 культивировались активнее и образовывали монослой в 3 раза быстрее, чем клетки линии DLD-1 и HT-29. Выживаемость мышей после проведения процедуры подкожной ксенотрансплантации составляла 100%. Образование ксенографтов объемом около 1 см<sup>3</sup> наблюдали на 17-е – 26-е сут после прививания клеток. Приживаемость введённых клеток составила 100% для линии HCT-116. Для клеток колоректального рака человека линий DLD-1 и HT-29 приживаемость составила 75% и 60%, соответственно.

**Заключение.** При экспериментальном моделировании подкожных гетеротопических ксенографтов колоректального рака человека на мышах линии BALB/c nude была получена высокая степень воспроизводимости при 100%-ной выживаемости животных-носителей.

**Ключевые слова:** гетеротопическое моделирование; колоректальный рак; модели опухолей; ксенотрансплантация; ксенографт

**Для цитирования:** Лунёва К.А., Клементьева О.Е., Терновская К.Э., Дубова Е.А., Лунёв А.С. Опыт ксенотрансплантационного гетеротопического моделирования колоректального рака различных клеточных типов у бестимусных мышей линии BALB/c nude. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 148-152.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.148-152

**Для корреспонденции:** Лунёва Кристина Андреевна, e-mail: christfmbc@gmail.com

**Участие авторов:** Лунёва К.А., Терновская К.Э. – культивирование культур клеток, подготовка к перевивке, моделирование опухолевых очагов; Клементьева О.Е. – планирование и руководство выполненными исследованиями, Дубова Е.А. – проведение гистологического исследования образцов опухолевой ткани; Лунёв А.С. – моделирование опухолевых очагов, обработка полученных результатов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках бюджетной тематики ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

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

Поступила 19.05.2020

Принята к печати 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Lunyova K.A.<sup>1,2</sup>, Klementyeva O.E.<sup>1</sup>, Ternovskaya K.E.<sup>1</sup>, Dubova E.A.<sup>1</sup>, Lunev A.S.<sup>1</sup>

## Xenograft heterotopic modeling of colorectal cancer of various cell types in athymic BALB/c nude mice

<sup>1</sup>State Research Center, A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Zhivopisnaya Str. 46, Moscow 123098, Russian Federation;

<sup>2</sup>K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Akademika Skryabina Str. 23, Moscow 109472, Russian Federation

**Introduction.** The high prevalence of colorectal cancer (CC) stimulates scientists and physicians to search methods for CC diagnosis and effective therapy, which requires appropriate animal models at the stage of development and preclinical studies.

**Methods.** CC cell cultures (DLD-1, HCT 116, and HT-29) were used for heterotopic xenograft modeling in BALB/c nude mice. The cell suspension was injected subcutaneously with a syringe.

**Results.** CC cells from ATCC (American Type Culture Collection) were cultivated until obtaining the required number of cells for xenograft modeling (20 days). The HCT-116 cell culture developed more actively and formed a monolayer three times faster than DLD-1 and HT-29 cells. Survival of the mice after subcutaneous transplantation was 100%. Xenografts of approximately 1 cm<sup>3</sup> volume formed at 17-26 days after grafting. Transplantability of the injected cells was 100% for HCT-116, 75% for DLD-1, and 60% for HT-29.

**Conclusion.** The experimental modeling of subcutaneous heterotopic CC xenografts in BALB/c nude mice showed a high level of reproducibility with absolute 100% – survival of recipient mice.

**Keywords:** heterotopic modeling; colorectal cancer; tumor models; xenotransplantation; xenograft

**For citation:** Lunyova K.A., Klementyeva O.E., Ternovskaya K.E., Dubova E.A., Lunev A.S. Xenograft heterotopic modeling of colorectal cancer of various cell types in athymic BALB/c nude mice. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 148-152. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.148-152

**For correspondence:** *Kristina A. Lunyova*, Scientific Researcher, State Researcher Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency; 46 Zhivopisnaya Str., Moscow 123098, Russian Federation, e-mail: christfmbc@gmail.com

**Contribution:** Lunyova K.A., Ternovskaya K.E. – cell culture cultivation, preparation for transplantation, modeling of tumor foci; Klementyeva O.E. – planning and management of performed studies, Dubova E.A. – histological study of tumor tissue samples; Lunev A.S. – modeling of tumor foci, results obtained. All the authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

**Acknowledgment.** Budget theme of the SRC – FMBC.

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

#### Information about the authors:

Lunyova K.A., <https://orcid.org/0000-0002-1256-9873>

Klementyeva O.E., <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>

Ternovskaya K.E., <https://orcid.org/0000-0001-9527-0596>

Dubova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-7115-538X>

Lunev A.S., <https://orcid.org/0000-0002-8392-8343>

Received 19.05.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

Ключевым направлением при разработке современных препаратов для диагностики и терапии онкологических заболеваний, наряду с разработкой самой действующей субстанции или препарата, является экспериментальное моделирование опухолевого процесса на лабораторных животных. В настоящее время рак ободочной и прямой кишки трактуется совместно как рак толстого кишечника, но всё чаще к этим злокачественным новообразованиям применяют термин «колоректальный рак» (КРР). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире ежегодно регистрируется более 500 тыс случаев колоректального рака [1, 2]. При всех достижениях современной медицины КРР занимает лидирующие позиции в распространенности, являясь во всем мире третьим среди онкологических заболеваний по частоте у мужчин и вторым по частоте у женщин [3]. Уровень смертности от этой патологии продолжает оставаться неутешительно высоким [4, 5].

Согласно Методическим указаниям по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ [6], обязательными моделями солидных новообразований для исследования противоопухолевых

препаратов, ориентированных на применение в клинике являются культуры клеток опухолей человека, адаптированных к росту *in vivo* и дающие подкожные ксенографты у иммунодефицитных мышей.

Моделирование КРР человека возможно при использовании стандартизированных коллекционных культур клеток. Основной принцип такого моделирования приведен в обзоре М. Perez с соавторами [7], причем инъекция суспензии опухолевых клеток может быть осуществлена как подкожно (гетеротопически), так и в слизистую толстой или слепой кишки мыши (ортотопически). Подкожное расположение ксенографта позволяет неинвазивно и максимально точно контролировать рост опухоли [8]. Также в ортотопической модели оценка терапевтической эффективности более сложна по сравнению с опухолевой моделью подкожного введения клеток [9].

В данной статье материал относится к гетеротопическому подходу создания ксенографтов КРР с использованием культур клеток, полученных из Американской коллекции типовых культур (АТСС).

Цель исследования – освоение методик культивирования различных линий колоректального рака человека с последующим подкожным ксенотрансплан-

тированием полученных клеточных культур и оценка возможности создания модельных гетеротопических ксеногraftов КРР человека на мышах линии BALB/c nude.

### Методика

Все процедуры исследования соответствовали принципам надлежащей лабораторной практики [10]. Протокол исследования утвержден этической комиссией медицинского биофизического Центра им. А.И. Бурназяна. Для культивирования и последующей подкожной инъекции были взяты 3 линии клеток человеческого КРР, полученные из АТСС: DLD-1, НСТ 116 и НТ-29. После размораживания клетки переносили в промаркированные пробирки типа Эппендорф и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин (MiniSpin plus, Eppendorf, Германия). Надосадок удаляли, клетки ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640 с глутамином gibco® (Thermo Fisher Scientific, США). В подготовленные, заранее промаркированные культуральные флаконы объемом 25 см<sup>3</sup> (Corning, США) добавляли по 7 мл приготовленной питательной среды (RPMI-1640 с глутамином, 20% (в финальной концентрации) фетальной телячьей сыворотки gibco® (Thermo Fisher Scientific, США) и 100-кратный раствор антибиотика пенициллин-стрептомицин (ООО «НПП «ПанЭко»). В культуральные флаконы с питательной средой вносили по 200 мкл суспензии клеток (около  $2 \cdot 10^5$  клеток) и ставили все флаконы в CO<sub>2</sub>-инкубатор MCO-20AIC (Sanyo, Япония), поддерживающий заданную температуру 37 °С и концентрацию углекислого газа 5%.

В качестве носителей гетеротопических моделей колоректального рака были использованы мыши самки линии BALB/c nude в возрасте 6-8 нед, массой тела  $19 \pm 1,8$  г, полученные из питомника лабораторных животных «Пушино» ФИБХ РАН. Мыши были включены в эксперимент после 3-дневной адаптации с последующей оценкой состояния здоровья по внешним и клиническим признакам. Иммунодефицитных мышей содержали в пластмассовых клетках, установленных в системе индивидуально вентилируемых клеток (ИВК) GA30CAGES 6LAYERS×5 (3W, КНР), укомплектованной вентиляционным блоком с НЕРА-фильтром. Для кормления использован стерильный гранулированный корм марки «Чара», имеющий сертификат соответствия – единственная в России диета, способная выдерживать стерилизацию паром в автоклаве, что делает ее незаменимой при содержании мелких лабораторных грызунов SPF-категории [11], и питьевая вода [12], стерилизованная УФ. Доступ к воде

и корму свободный. Температура и влажность воздуха поддерживается автоматически изолирующей системой (22-26 °С и 30-60%, соответственно). Перемещение животных вне системы ИВК осуществляли в изолирующих клетках. Работу с животными проводили в ламинарном боксе системы vis-a-vis, (Бокс микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 (241.120), ЗАО «Ламинарные системы», Россия) обеспечивающем защиту продукта от оператора. Все манипуляции с животными, в том числе, связанные с их эвтаназией, выполняли согласно Европейской Конвенции по их защите, изложенной в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС) [13].

*Оценка роста клеточных культур in vitro и их подготовка к моделированию колоректального рака на мышах.* Клетки культивировали до достижения необходимого количества для создания моделей КРР на мышах (20 сут). Активный рост был отмечен в флаконах с клетками линии НСТ-116, в которых уже на 4-е сут сформировался монослой. В флаконах с линиями клеток DLD-1 и НТ-29 монослой формировался на 11-е сут.

Для подготовки суспензии клеток для подкожной ксенотрансплантации сливали из культуральных флаконов питательную среду, промывали раствором Версена (ООО «НПП «ПанЭко») и добавляли по 3 мл 0,25%-ного раствора Трипсина-ЭДТА (ООО «НПП «ПанЭко») для снятия прикрепленных клеток с поверхности флаконов. Оставляли на 5 мин. Открепившиеся клетки переносили в промаркированные пробирки типа Эппендорф и центрифугировали при 150g в течение 5 мин. Надосадок удаляли. Клетки ресуспендировали в питательной среде. К суспензии клеток каждой линии добавляли Matrigel® (Corning, США) в соотношении 1:1. Для каждой подкожной инъекции было взято около  $3 \cdot 10^6$  клеток в 0,2 мл объема.

*Гетеротопическая ксенотрансплантация клеток колоректального рака мышам линии BALB/c nude.* Перед инъекцией клетки с мышами извлекали из системы ИВК и переносили в ламинарный бокс системы vis-a-vis, в котором проводили все последующие манипуляции с мышами. Интактным мышам подкожно в область правой лопатки вводили суспензию клеток из заранее подготовленных шприцов. Животных рассаживали в промаркированные клетки, с обязательным указанием даты введения и наименования линии клеток, пола и количества животных. Развитие моделируемых опухолевых очагов контролировали каждые 2 дня.

Результаты наблюдения за мышами после подкожного введения суспензии опухолевых клеток показали, что операция ксенотрансплантации хорошо пере-



**Рис. 1.** Фотография мыши линии BALB/c nude с привитым подкожным ксенографтом колоректального рака человека линии НСТ 116.

носятся животными, выживаемость – 100%. Приживаемость подкожных ксенографтов КРР человека у мышей BALB/c nude в первой генерации составила 100% для линии клеток НСТ 116, 75% для линии клеток DLD-1 и 60% для линии клеток НТ-29. Формирование ксенографтов объемом  $\geq 1 \text{ см}^3$  регистрировали у опытных мышей, начиная с 17 суток после процедуры трансплантации для НСТ 116 и с 26 суток для линий клеток DLD-1 и НТ-29.

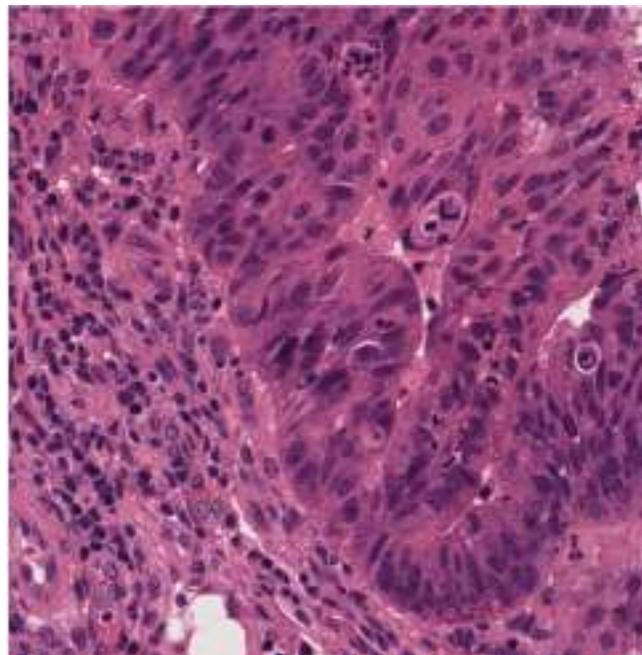
Фотография мыши с подкожным ксенографтом КРР линии НСТ 116 представлена на **рис. 1**.

По достижении ксенографтов размером  $\geq 1 \text{ см}^3$ , мышей подвергали эвтаназии, опухоли удаляли и помещали в промаркированные пробирки с 10% раствором формалина. Образцы ксенографтов мышей были переданы в патологоанатомическое отделение ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России на гистологическое исследование. Образцы опухолевых тканей мышей с ксенографтами DLD-1 и НСТ 116 гистологически соответствовали «низкодифференцированным аденокарциномам».

Образец опухолевой ткани мыши с ксенографтом НТ-29 соответствовал «умереннодифференцированной аденокарциноме» (**рис. 2**).

### Заключение

Была получена высокая степень воспроизводимости подкожных гетеротопических опухолей – моделей колоректального рака человека клеточных линий НСТ 116, DLD-1 и НТ-29 на мышах линии BALB/c nude. Выживаемость опытных животных после ксенотрансплантации была 100%-ной.



**Рис.2.** Гистосрез ксенографта колоректального рака линии НТ-29, привитого мыши линии BALB/c nude. Окраска гематоксилин-эозином, ув. 400.

### Литература

- Осипов В.А., Абдулаев М.А., Авдеев А.М., Косачев И.Д., Напалков А.Н., Варзин С.А. и др. Результаты хирургического лечения больных колоректальным раком, осложненным кишечной непроходимостью и кровотечением. *Вестник СПбГУ. Серия 11. Медицина*. 2014; 3: 104-17.
- Денисенко В.Л., Гаин Ю.М. Осложнения колоректального рака: проблемы и перспективы. *Новости хирургии*. 2011; 1: 103-11.
- Алиев Ф.Ш., Десятов Е.Н., Крутских А.Г., Алиев В.Ф., Лейманченко П.И. Эпидемиология колоректального рака: мировые и региональные тенденции. *Медицинская наука и образование Урала*. 2016; 4: 125-8.
- International Expert Summit: Improving Outcomes in the Treatment and Management of Metastatic Colorectal Cancer. A Report Based on an International Expert Summit Convened in Berlin, July 2013*. Berlin, July 22-23, 2013. Cambridge: The Angiogenesis Foundation, 2013.
- Федоров В.Э., Поделякин К.А. Эпидемиологические аспекты колоректального рака (Обзор). *Медицинский альманах*. 2017; 4(49): 145-8.
- Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: Хабриев Р.У., ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. 2 изд. М.: ОАО изд. Медицина; 2005. С. 637–51.
- Perez M., Navas L., Carnero A. Patient-derived xenografts as models for personalized medicine research in cancer. *Cancer Transl. Med.* 2016; 2(6): 197-202.
- Hackl C., Man S., Francia G., Milsom C., Xu P., Kerbel R.S. Metronomic oral topotecan prolongs survival and reduces liver metastasis.

- sis in improved preclinical orthotopic and adjuvant therapy colon cancer models. *Gut*. 2013; 62: 259-71.
9. Bibby M.C. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur. J. Cancer*. 2004; 40: 852-7.
  10. *Государственный стандарт РФ ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики*. М.: Стандартинформ; 2019.
  11. *Питомник лабораторных животных «Пуцино»*. Поставщики кормов. Доступно по: <http://www.spf-animals.ru/about/providers/feed/>
  12. *Государственный стандарт РФ ГОСТ Р 51232-98. Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества*. М.: Стандартинформ; 2010.
  13. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. ЕЭС, Страсбург, 1986. *Ланималогия*. 1993; 1: 1-29

### References

1. Osipov V.A., Abdulaev M.A., Avdeev A.M., Kosachev I.D., Napalkov A.N., Varzin S.A. et al. Results of surgical treatment of patients with colorectal cancer complicated by intestinal obstruction and bleeding. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Series 11. Meditsina*. 2014; 3: 104-17. (in Russian)
2. Denisenko V.L., Gain Ju.M. Complications of colorectal cancer: problems and prospects. *Novosti khirurgii*. 2011; 1: 103-11. (in Russian)
3. Aliev F.Sh., Desjatov E.N., Krutskikh A.G., Aliev V.F., Lejmanchenko P.I. Epidemiology of colorectal cancer: global and regional trends. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2016; 4: 125-8. (in Russian)
4. *International Expert Summit: Improving Outcomes in the Treatment and Management of Metastatic Colorectal Cancer. A Report Based on an International Expert Summit Convened in Berlin, July 2013*. Berlin, July 22-23, 2013. Cambridge: The Angiogenesis Foundation, 2013.
5. Fedorov V.E., Podelyakin K.A. Epidemiological aspects of colorectal cancer (Review). *Meditsinskiy almanakh*. 2017; 4(49): 145-8. (in Russian)
6. Treshhalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.V., Garin A.M. Methodological guidelines for the study of antitumor activity of pharmacological substances. In the book: Habriev R.U., ed. *Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*. 2 ed. Moscow: OAO izd. Meditsina; 2005: 637-51. (in Russian)
7. Perez M., Navas L., Carnero A. Patient-derived xenografts as models for personalized medicine research in cancer. *Cancer Transl. Med*. 2016; 2(6): 197-202.
8. Hackl C., Man S., Francia G., Milsom C., Xu P., Kerbel R.S. Metronomic oral toptotecan prolongs survival and reduces liver metastasis in improved preclinical orthotopic and adjuvant therapy colon cancer models. *Gut*. 2013; 62: 259-71.
9. Bibby M.C. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur. J. Cancer*. 2004; 40: 852-7.
10. *10.State Standart 33044-2014. Principles of good laboratory practice. [Printsiy nadelzhashchey laboratornoy praktiki]*. Moscow: Standartinform Publ.; 2019. (in Russian)
11. *11.Nursery of laboratory animals "Pushchino"*. Feed suppliers. Available at: <http://www.spf-animals.ru/about/providers/feed/>
12. *12.State Standart 33044-2014. Drinking water. General requirements for the organization and methods of quality control. [Voda pit'evaya. Obshchie trebovaniya k organizatsii i metodam kontrolya kachestva]*. Moscow: Standartinform Publ.; 2010. (in Russian)
13. European Convention for the Protection Vertebrate Animals Use for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg, 1986. *Lanimalogiya*. 1993; 1: 1-29. (in Russian)

### Сведения об авторах:

**Лунёва Кристина Андреевна**, науч. сотр. лаб. доклинических и клинических исследований радиофармпрепаратов отделения радиационных технологий медицинского назначения ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России; аспирант каф. химии им. проф. С.И. Афонского и проф. А.Г. Малахова ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина, e-mail: christfmbc@gmail.com;

**Клементьева Ольга Евгеньевна**, канд. биол. наук, зав. лаб. доклинических и клинических исследований радиофармпрепаратов ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: klementyeva.olga@gmail.com;

**Терниовская Кристина Эдуардовна**, инженер лаб. доклинических и клинических исследований радиофармпрепаратов ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: violet\_mak@mail.ru;

**Дубова Елена Алексеевна**, доктор мед. наук, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: dubovaea@gmail.com;

**Лунёв Александр Сергеевич**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. доклинических и клинических исследований радиофармпрепаратов ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: mr.alekslunev@gmail.com.