

ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:

125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«ФГБНУ общей патологии и патофизиологии»

Редакция журнала
«Патологическая физиология
и экспериментальная терапия».
Home page:
<http://niiopp.ru/pathophysiologyeng/>
E-mail: path.physiol@yandex.ru

Зав. редакцией
Н.Р.Соболь
+7 906 793 5467
Техническая редакция
А.С.Акопов

ЛР №010215 от 29.04.97.

Издатель: Иришкин Дмитрий
E-mail: genius-media@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.

5-летний ИФ РИНЦ 2015 0,690

Журнал «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» индексируется в следующих иностранных изданиях: *PubMed; medline; Excerpta Medica; Apicultural Abstracts; Biological Abstracts; Biotechnology Research Abstracts; Chemical Abstracts; Index to Dental Literature; International Aerospace Abstracts; Nutrition Abstracts and Reviews; Ulrich's International Periodicals Directory*

Журнал включен в базу данных Scopus
Подписной индекс по каталогу агентства «Роспечать»: **71456**

Сдано в набор 17.02.2016 г.
Подписано в печать 20.02.2017 г.

ISSN 0031-2991
Пат. физиол. и экспер. тер.
2017. Том 61. № 2. 1–112

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, 2017.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НИИ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»**

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

Том 61, № 2, 2017

апрель—июнь

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

Ю.В. Архипенко, Е.И. Асташкин, С.В. Грачев,
Н.С. Гурко (ответственный секретарь), Т.А. Гуськова,
И.С. Гушин (зам. главного редактора), А.В. Ефремов,
В.Б. Кошелев, Н.А. Крупина, А.А. Кубатиев,
П.Ф. Литвицкий, В.В. Новицкий,
Ю.А. Петрович, Г.В. Порядин,
В.К. Решетняк (зам. главного редактора)

Редакционный совет

Ю.В. Балякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),
Ф. Дауни (США), В.Т. Долгих (Омск), А.М. Дыгай (Томск),
Д.А. Еникеев (Уфа), В.П. Куликов (Барнаул),
В.П. Михайлов (Ярославль), В.Г. Овсянников (Ростов-на-Дону),
С.Н. Орлов (Москва), Н.Н. Петрищев (Санкт-Петербург),
Л.А. Северьянова (Курск), В. Шварц (Германия),
А.П. Ястребов (Екатеринбург)

125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

Home page:

<http://niiopp.ru/pathophysiologyeng/>

E-mail: path.physiol@yandex.ru

Pathological
physiology
and experimental
therapy

2017. Vol. 61. № 2. 1–112

ISSN 0031-2991

Publisher: Irishkin Dmitry

e-mail: genius-media@mail.ru

THE 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. 61, № 2, 2017

April—June

Editor in chief B.B. Moroz

Assistant editors in chief:

I.S. Gushchin, V.K. Reshetnyak

Executive editor, scientific editor: N.S. Gourko

Members of editorial board:

Yu.V. Archipenko, E.I. Astashkin, S.V. Grachev,
T.A. Guskova, A.V. Efremov, V.B. Koshelev,
N.A. Krupina, A.A. Kubatiev, P.F. Litvitskiy,
V.V. Novitskiy, Yu.A. Petrovich,
G.V. Poryadin

Staff

Yu.V. Balyakin (Moskva), Yu.Yu. Byalovskiy (Ryazan),
F. Downey (USA), V.T. Dolgikh (Omsk), A.M. Dygay (Tomsk),
D.A. Enikeev (Ufa), V.P. Kulikov (Barnaul),
V.P. Mikhailov (Yaroslavl),
V.G. Ovsyannikov (Rostov-na-Donu), S.N. Orlov (Moskva),
N.N. Petrishchev (Sankt-Peterburg),
L.A. Severyanova (Kursk), V. Shvarz (Germany),
A.P. Yastrebov (Ekaterinburg)

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Калиш С.В., Лямина С.В., Раецкая А.А., Малышев И.Ю.**
Репрограммированные M1 макрофаги с ингибированными STAT3, STAT6 и SMAD3 увеличивают продолжительность жизни мышей с экспериментальной карциномой 4
- Повещенко А.Ф., Соловьева А.О., Зубарева К.Э., Струнkin Д.Н., Грицык О.Б., Повещенко О.В., Шурлыгина А.В., Коненков В.И.**
Изучение миграции и распределения клеток костного мозга трансплантированных животным с меланомой B16 10
- Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П.** Активация регенерации красной и белой пульпы селезенки после проведения сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в условиях воздействия ионизирующего излучения 22
- Темнов А.А., Волкова А.Г., Мелерзанов А.В., Новоселов В.И.** Эффект кондиционированной среды, полученной из культивированных мезенхимальных стволовых клеток, на регенерацию эндотелия при HCl-индуцированном повреждении трахеи у крыс. 28
- Шкорик Е.В., Маркелова Е.В., Силаев А.А., Гельцер Б.И., Семенikhин А.А., Федянина Л.Н.** Матриксные металлопротеиназы-1, -8, -9 и риск развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с ИБС до и после ревааскуляризации миокарда 37
- Петрищев Н.Н., Семенов Д.Ю., Цибин А.Ю., Юкина Г.Ю., Беркович А.Е., Бурсиан А.А., Белянкин А.Б., Сенчик К.Ю.** Влияние выключения кровотока на характер повреждения вен при воздействии HIFU. 46
- Баринoв Э.Ф., Мамедалиева С.А., Твердохлеб Т.А., Балькина А.О.** Взаимодействие адреналина и АДФ в регуляции функциональной активности тромбоцитов при хронической ишемии мозга 51
- Оразов М.Р., Радзинский В.Е., Хамошина М.Б., Носенко Е.Н., Токаева Э.С., Барсегян Л.К., Закирова Я.Р.** Нарушение обмена гистамина в патогенезе хронической тазовой боли у пациентов с наружным генитальным эндометриозом 56
- Савилов П.Н.** Влияние частичной гепатэктомии на аммиакдетоксикационную функцию печени при хроническом тетрахлорметановом гепатите. 61
- Копылова С.В., Власова К.М., Анашкина А.А.** Воздействие токсической дозы адреналина на морфофункциональное состояние печени 67
- Масляков В.В., Суханова О.А., Барсуков В.Г., Куркин К.Г., Суханов С.А.** Возможности коррекции реологических свойств крови при колото-резаных ранениях груди 72

ОБЗОРЫ

- Гузoвская Е.В., Серебренникова С.Н.** Патогенетические особенности синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови различной этиологии 76
- Бывальцев В.А., Степанов И.А., Бельх Е.Г., Яруллина А.И.** Молекулярная биология менингиом головного мозга 82
- Синёв В.В., Сазонова М.А., Карагодин В.П., Рыжкова А.И., Галицына Е.В., Мельниченко А.А., Демакова Н.А., Шкурат Т.П., Собенин И.А., Орехов А.Н.** Изучение митохондриальной дисфункции с помощью цитоплазматических гибридов 92
- Самоделькин Е.И., Меркучева Н.Г., Косарева П.В., Нестерова Л.Ю.** Роль простагландинов и циклооксигеназы в патогенезе хронического эндометрита. 98

МЕТОДИКА

- Иванов Ю.Д., Козлов А.Ф., Галиуллин Р.А., Татур В.Ю., Веснин С.Г., Зиборов В.С., Иванова Н.Д., Плешакова Т.О.** Мониторинг флукуаций яркостной температуры воды в СВЧ-диапазоне 101

ИНФОРМАЦИЯ

- Требования к рукописям, направляемым в журнал «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» 108

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Kalish S.V., Lyamina S.V., Raetskaya A.A., Malyshev I.Yu.**
Reprogrammed M1 macrophages with inhibited STAT3, STAT6 and/or SMAD3 extends lifespan of mice with experimental carcinoma
- Poveshchenko A.F., Solovieva A.O., Zubareva K.E., Strunkin D.N., Gricyk O.B., Poveshchenko O.V., Shurlygina A.V., Konenkov V.I.**
Study of migration and distribution of bone marrow cells transplanted animals with B16 melanoma
- Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Yastrebov A.P.** Activation of regeneration of red and white pulp of the spleen after the combined transplantation of HSC and MSCS in terms of exposure to ionizing radiation
- Temnov A.A., Volkova A.G., Melerzanov A.V., Novoselov V.I.** Effect of conditioned medium from mesenchymal stem cells on regeneration of endothelium at HCl-induced damage trachea in rats
- Shkorik E.V., Markelova E.V., Geltser B.I., Silaev A.A., Semenikhin A.A., Fedjanina L.N.** Matrix metalloproteinase-1, -8, -9 and the risk of cardiovascular complications in patients with CHD before and after myocardial revascularization
- Petrishchev N.N., Semenov D.U., Tsibin A.U., Yukina G.U., Berkovich A.E., Bursian A.A., Belyankin A.B., Senchik K.U.** Effekt of blood flow shutdown on the vein damage when exposed to HIFU
- Barinov E.F., Mamedaliyeva S.A., Tverdokhlebov T.A., Balykina A.O.** Interaction of epinephrine and ADP in regulation of platelet function in chronic cerebral ischemia
- Orazov M.R., Radzinskiy V.Y., Khamoshina M.B., Nosenko E.N., Tokaeva E.S., Barsegyan L.K., Zakirova Y.R.** Histamine metabolism disorder in pathogenesis of chronic pelvic pain in patients with external genital endometriosis
- Savilov P.N.** Influence of partial hepatectomie on ammoniumdetoxications function of liver at chronic tetrachlorocarbon hepatitis
- Kopylova S.V., Vlasova K.M., Anashkina A.A.** Exposure to toxic dose of adrenaline on the functional state of the liver
- Masljakov V.V., Suhanova O.A., Barsukov V.G., Kurkin K.G., Suhanov S.A.** Possibilities of correction rheological blood ... at chipped and cut wounds of the breast

REVIEWS

- Guzovskaya E.V., Serebrennikova S.N.** Pathogenic peculiarities of disseminated intravascular coagulation of various etiology
- Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Belykh E.G., Yarullina A.I.** Molecular biology of brain meningiomas
- Sinyov V.V., Sazonova M.A., Karagodin V.P., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Melnichenko A.A., Demakova N.A., Shkurat T.P., Sobenin I.A., Orekhov A.N.** Study of mitochondrial dysfunction using cytoplasmic hybrid

- Samodelkin E.I., Mercucueva N.G., Kosareva P.V., Nesterova L.Y.** The role of prostaglandins and cyclooxygenase in the pathogenesis of chronic endometritis

METHODS

- Ivanov Yu.D., Kozlov A.F., Tatur V.Yu., Galiullin R.A., Vesnin S.G., Ziborov V.S., Pleshakova T.O.** Monitoring of fluctuation of brightness temperature of water in SHF range

INFORMATION

- Guidelines for authors

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Калиш С.В.¹, Лямина С.В.¹, Раецкая А.А.¹, Малышев И.Ю.^{1,2}

Репрограммированные M1 макрофаги с ингибированными STAT3, STAT6 и SMAD3 увеличивают продолжительность жизни мышей с экспериментальной карциномой

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

² ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАН; 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Цель исследования. Репрограммирование M1 фенотипа макрофагов с ингибированными факторами транскрипции M2 фенотипа STAT3, STAT6 и SMAD и оценка их влияния на развитие карциномы Эрлиха (КЭ) *in vitro* и *in vivo*. **Методика.** Рост опухоли инициировали *in vitro* путем добавления клеток КЭ в среду культивирования RPMI-1640 и *in vivo* путем внутривентриальной инъекции клеток КЭ мышам. **Результаты.** Установлено, что M1-STAT3/6-SMAD3 макрофаги и *in vitro*, и *in vivo* оказывают выраженный противоопухолевый эффект, который превосходит антиопухолевые эффекты M1, M1-STAT3/6, M1-SMAD3 макрофагов и цисплатина. **Заключение.** M1 макрофаги с ингибированными STAT3, STAT6 и/или SMAD3 эффективно ограничивают рост опухоли. Полученные данные обосновывают разработку новой технологии противоопухолевой клеточной терапии.

Ключевые слова: макрофаги; карцинома Эрлиха; опухолевое микроокружение; репрограммирование; цитокины.

Для цитирования: Калиш С.В., Лямина С.В., Раецкая А.А., Малышев И.Ю. Репрограммированные M1 макрофаги с ингибированными STAT3, STAT6 и SMAD3 увеличивают продолжительность жизни мышей с экспериментальной карциномой. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(2): 4–9.
DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.4-9

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

Финансирование. Статья написана при финансовой поддержке ведущих научных школ, Соглашение № 14.W02.16.9835-НИИ об условиях использования гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ НИИ-9835.2016.7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.12.2016

Kalish S.V.¹, Lyamina S.V.¹, Raetskaya A.A.¹, Malyshev I.Iy.^{1,2}

Reprogrammed M1 macrophages with inhibited STAT3, STAT6 and/or SMAD3 extends lifespan of mice with experimental carcinoma

¹ Moscow State University of Medicine and Dentistry n.a. A.I. Evdokimov; ul. Delegatskaya, d. 20, str. 1, Moscow, 127473, Russia

² Institute of General Pathology and Pathophysiology; Moscow, ul. Baltiyskaya, d. 8, 125315, Russia.

Objective. Reprogramming of M1 macrophage phenotype with inhibited M2 phenotype transcription factors, such as STAT3, STAT6 and SMAD and assess their impact on the development of Ehrlich carcinoma (EC) *in vitro* and *in vivo*. **Methods.** Tumor growth *in vitro* was initiated by addition of EC cells in RPMI-1640 culture medium and *in vivo* by intraperitoneal of EC cell injection into mice. **Results.** It was found that M1-STAT3/6-SMAD3 macrophages have a pronounced anti-tumor effect *in vitro*, and *in vivo*, which was greater than anti-tumor effects of M1, M1-STAT3/6, M1-SMAD3 macrophages and cisplatin. **Conclusion.** M1 macrophages with inhibited STAT3, STAT6 and/or SMAD3 effectively restrict tumor growth. The findings justify the development of new anti-tumor cell therapy technology.

Keywords: macrophages; Ehrlich carcinoma; tumor microenvironment; reprogramming; cytokines.

For citation: Kalish S.V., Lyamina S.V., Raetskaya A.A., Malyshev I.Yu. Reprogrammed M1 macrophages with inhibited STAT3, STAT6 and/or SMAD3 extends lifespan of mice with experimental carcinoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(2): 4–9. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.4-9

Received 05.12.2016

Введение

Ключевую роль в нарушении иммунного ответа при канцерогенезе играют макрофаги [1, 2]. Концепция, выдвинутая Миллсом с коллегами [3, 4], поддерживаемая также другими учеными [5—7], постулирует, что в зависимости от микроокружения, макрофаги могут приобретать провоспалительный M1 или альтернативно противовоспалительный M2 фенотип. Макрофаги M1 способны содействовать уничтожению опухолевых клеток благодаря продукции оксида азота (NO) [8], провоспалительных цитокинов [9, 10], активации натуральных киллеров [11] и презентации опухолевых антигенов лимфоцитам [12]. Провоспалительные цитокины, действуя на M1 макрофаги, еще больше стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов и еще больше сдвигают фенотип макрофагов в сторону M1 фенотипа. Однако многие опухоли продуцируют в большом количестве противовоспалительные цитокины, такие, как TGF- β , IL-10 и IL-13 [13, 14], которые через факторы транскрипции M2 фенотипа STAT3, STAT6 и SMAD3 перепрограммируют противоопухолевый M1 фенотип в проопухолевый M2 [15, 16]. M2 фенотип макрофагов продуцирует незначительное количество противовоспалительных цитокинов, имеет низкую способность к представлению опухолевых антигенов [15—19], но продуцирует в большом количестве противовоспалительные цитокины, способствует подавлению нормального иммунного ответа и промотирует рост опухоли [1, 2].

Мы предположили, что блокирование факторов транскрипции STAT3, STAT6 и/или SMAD3 может предупредить проопухолевое репрограммирование M1 макрофагов и сохранить их антиопухолевые свойства. Цель исследования состояла в проверке этой гипотезы.

Методика

Экспериментальные животные. Все экспериментальные работы проводились на мышах линии C57BL/6J и BALB/c в соответствии с руководством ВОЗ (www.cioms.ch/publications/guidelines). Мыши были получены в питомнике «Андреевка» (<http://andreevka.msk.ru>). Протокол экспериментов был одобрен университетским Комитетом по этике.

Реактивы. Stat3 ингибитор (S3I204) (Axon Medchem, USA, cat# 2312), Stat6 ингибитор (As1517499) (Axon Medchem, USA, cat# 1992), IFN- γ (Invitogen, USA, cat# PMC4034), LPS (Sigma-Aldrich, USA, cat# L3755), SMAD3 inhibitor (SIS3) (Calbiochem, USA, cat# 566405), FBS (Thermo Hyclone, UK, cat# SV30160.03), cisplatin (TEVA, Israel).

Опухолевый рост инициировали с помощью внутривенного введения клеток карциномы Эрлиха (КЭ). Клетки опухоли были получены в «Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина». Мышам вводили 250 тысяч опухолевых клеток, разведенных в 0,2 мл физиологического раствора. В кривой роста опухоли различают 3 периода: лаг-фаза (1-е — 5-е сут. после введения опухолевых клеток); лог-фаза (6-е — 10-е сут.); и терминальный период, (11-е — 15-е сут.), за которым следует гибель организма. Выбор модели КЭ определяется тем, что: 1 — КЭ воспроизводит многие аспекты канцерогенеза опухоли поджелудочной железы, рака яичников, раков толстой и прямой кишки и рака простатической железы [20—23], 2 — мышиную модель КЭ, обычно, используют для оценки противоопухолевых эффектов [24, 25] и 3 — КЭ легко воспроизводится экспериментально.

Выделение макрофагов. Нативные макрофаги (M0 фенотип) были выделены путем перитонеального смыва у мышей [26]. После выделения из перитонеальной жидкости макрофаги культивировали в питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (FBS), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C в 5% CO₂.

In vitro репрограммирование макрофагов в M1; M1_{STAT3/6}; M1_{SMAD3} и M1_{STAT3/6}·SMAD3 фенотипы. Макрофаги репрограммировали в M1 фенотип с помощью удаления сыворотки из среды (0% FBS) [4] и добавления IFN- γ (20 нг/мл) [27]. Для репрограммирования M1_{STAT3/6}; M1_{SMAD3} и M1_{STAT3/6}·SMAD3 фенотипов, репрограммирующая смесь на M1 фенотип (0% FBS+IFN- γ 20 нг/мл) была дополнена: 1) ингибиторами STAT3 и STAT6 для получения M1_{STAT3/6} фенотипа, 2) ингибитором SMAD3 для получения M1_{SMAD3} фенотипа или 3) ингибиторами STAT3, STAT6 и SMAD3 для получения M1_{STAT3/6+SMAD3} фенотипа.

В итоге были сформированы 10 групп макрофагов:

- Группа 1 (нестимулированный M0 фенотип): макрофаги, культивируемые в стандартных условиях в течение 36 ч в присутствии 10% FBS;
- Группа 2 (стимулированный M0 фенотип): макрофаги культивировали в течение 12 ч с 10% FBS, а затем стимулировали липополисахаридом (ЛПС) (500 нг/мл) в течение 24 ч;
- Группа 3 (нестимулированный M1 фенотип): макрофаги культивировали в течение 36 ч без FBS с добавлением IFN- γ ;
- Группа 4 (стимулированный M1 фенотип): макрофаги культивировали в течение 12 ч без FBS с добавлением IFN- γ , а затем стимулировали ЛПС (500 нг/мл) в течение 24 ч;

• Группа 5 (нестимулированный M1_{STAT3/6} фенотип): макрофаги культивировали в течение 36 ч без FBS с добавлением IFN- γ (20 нг/мл), ингибитора STAT3 (5 мкг/мл) и ингибитора STAT6 (10 мкг/мл);

• Группа 6 (стимулированный M1_{STAT3/6} фенотип): макрофаги культивировали в течение 12 ч без FBS с добавлением IFN- γ (20 нг/мл), ингибитора STAT3 (5 мкг/мл) и ингибитора STAT6 (10 мкг/мл), а затем стимулировали ЛПС (500 нг/мл) в течение 24 ч;

• Группа 7 (нестимулированный M1_{SMAD3} фенотип): макрофаги культивировали в течение 36 ч без FBS с добавлением IFN- γ (20 нг/мл) и ингибитора SMAD3 (2 нмоль/мл);

• Группа 8 (стимулированный M1_{SMAD3} фенотип): макрофаги культивировали в течение 12 ч без FBS с добавлением IFN- γ (20 нг/мл) и ингибитора SMAD3 (2 нмоль/мл), а затем стимулировали ЛПС (500 нг/мл) в течение 24 ч;

• Группа 9 (нестимулированный M1_{STAT3/6-SMAD3} фенотип): макрофаги культивировали в течение 36 ч без FBS с добавлением IFN- γ (20 нг/мл), ингибитора STAT3 (5 мкг/мл), ингибитора STAT6 (10 мкг/мл) и ингибитора SMAD3 (2 нмоль/мл);

• Группа 10 (стимулированный M1_{STAT3/6-SMAD3} фенотип): макрофаги культивировали в течение 36 ч без FBS с добавлением IFN- γ (20 нг/мл), ингибитора STAT3 (5 мкг/мл), ингибитора STAT6 (10 мкг/мл) и ингибитора SMAD3 (2 нмоль/мл), а затем стимулировали ЛПС в концентрации 500 нг/мл в течение 24 ч.

Кокультивирование макрофагов с клетками КЭ. После репрограммирования макрофагов к активированным M0 (Группы 2), M1 (Группа 4), M1_{STAT3/6} (Группа 6), M1_{SMAD3} (Группа 8), and M1_{STAT3/6-SMAD3} (Группа 10) добавляли 25 000 клеток КЭ, в соотношении числа макрофагов к числу опухолевых клеток КЭ: 5:1, 10:1, 20:1, 40:1 и 80:1. Противоопухолевый препарат цисплатин [28, 29] использовали в концентрации 10, 20 и 40 мкг/мл в качестве препарата сравнения.

После совместного кокультивирования макрофаги и опухолевые клетки были разделены по методу, описанному ранее [19]. После совместного кокультивирования в течение 24 ч опухолевые клетки подсчитывали и сравнивали с количеством опухолевых клеток, которые культивировали без макрофагов.

Живые и мертвые макрофаги и клетки КЭ были подсчитаны с помощью трипанового синего (http://www.hyclone.com/pdf/procedure_assay.pdf).

Инъекция макрофагов в брюшную полость. Макрофаги групп 2, 4 и 6 были удалены с дна лунки культурального планшета путем инкубирования при

37°C в присутствии PBS, содержащий 5 мМ ЭДТА [5]. Концентрация макрофагов была доведена до 8×10^6 клеток в 0,2 мл PBS. Далее мышам внутрибрюшинно вводили макрофаги на 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сут. после инъекции клеток КЭ. В итоге было сформировано 6 групп животных:

• Группа 1: «Опухоль» — мыши, которым ввели клетки КЭ (n = 16);

• Группа 2: «Опухоль + PBS» — мыши, которым вводили клетки КЭ и PBS (n = 16);

• Группа 3: «Опухоль + M0-Мак» — мыши, которым вводили клетки КЭ и стимулированные нерепрограммированные макрофаги (n = 16);

• Группа 4: «Опухоль + M1-Мак» — мыши, которым вводили клетки КЭ и стимулированные M1 макрофаги (n = 16);

• Группа 5: «Опухоль + M1_{STAT3/6-SMAD3}-Мак» — мыши, которым вводили клетки КЭ и стимулированные ЛПС M1_{STAT3/6-SMAD3} макрофаги (n = 16);

• Группа 6: «Опухоль + цисплатин» — мыши, которым вводили клетки КЭ и 0,05 мл цисплатина (0,5 мг/мл) в качестве противоопухолевого препарата [28—30], (n = 14).

Эффект введения макрофагов и цисплатина оценивали по изменению продолжительности жизни мышей по сравнению с группой «Опухоль».

Статистический анализ проводили с использованием критериев Стъдента—Ньюмана—Келса. Данные представлены в виде среднего значения (M), учитывающего стандартную ошибку среднего значения (\pm SEM). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

1. M1_{STAT3/6-SMAD3} макрофаги оказывают более выраженный антиопухолевый эффект *in vitro*, по сравнению с M1_{STAT3/6} и M1_{SMAD3} макрофагами

На рис. 1 видно, что в процессе 24-часового культивирования в среде, содержащей 10% FBS, количество опухолевых клеток увеличилось в 7 раз: с 25 000 до $174\,000 \pm 7\,000$ клеток. Культивирование опухолевых клеток в репрограммирующих средах, без макрофагов, не влияло на рост опухолевых клеток.

Добавление нерепрограммированных макрофагов (M0) к клеткам КЭ при всех соотношениях практически не влияло на деление опухолевых клеток. Сильное дозозависимое антиопухолевое действие оказало добавление M1_{STAT3/6}, M1_{SMAD3} или M1_{STAT3/6-SMAD3} макрофагов. При этом M1_{STAT3/6-SMAD3} фенотип макрофагов оказал наиболее выраженное противоопухолевое действие.

2. *M1-STAT3/6-SMAD3* макрофаги *in vivo* оказали более выраженный антиопухолевый эффект по сравнению с эффектом цисплатина и *M1* макрофагами.

Для того, чтобы оценить, воспроизводится ли противоопухолевый эффект репрограммированных макрофагов *in vitro*, в условиях *in vivo*, было оценено действие репрограммированных *M1*- и *M1-STAT3/6-SMAD3* макрофагов на продолжительность жизни мышей с введенными клетками КЭ. *M1-STAT3/6-SMAD3* фенотип был выбран, как фено-

тип с наиболее выраженным противоопухолевым эффектом, по сравнению с другими фенотипами (рис. 1).

На рис. 2 показано влияние макрофагов и цисплатина на продолжительность жизни мышей с КЭ. Продолжительность жизни мышей группы «Опухоль», которым вводили клетки КЭ, составила $13,4 \pm 0,4$ сут.; продолжительность жизни мышей группы «Опухоль + *M1-Мак*» составила $22,8 \pm 0,8$ сут. ($p < 0.01$), что на 70% больше, чем в группе «Опухоль». Продолжительность жизни мы-

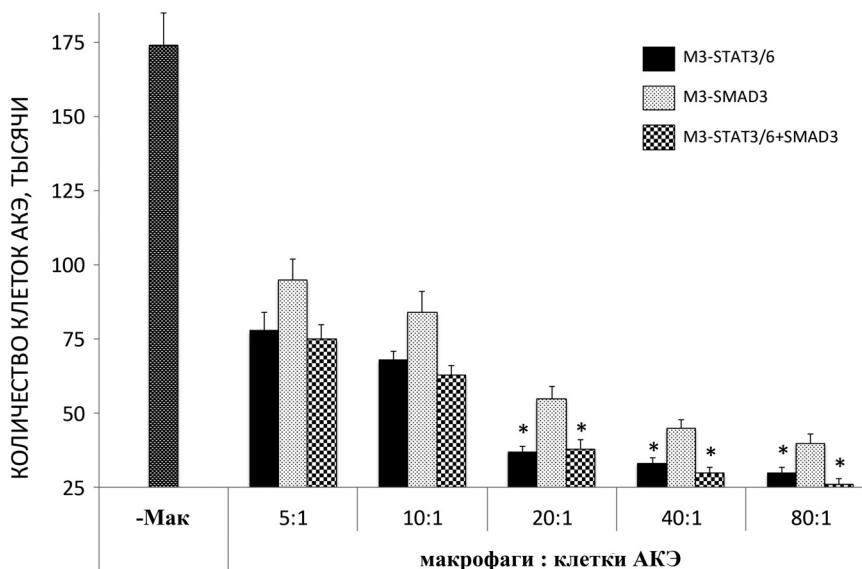


Рис. 1. Эффект *M1-SMAD3*, *M1-STAT3/6-SMAD3* и *M1-STAT3/6* фенотипов макрофагов на рост опухолевых клеток КЭ. Представлены данные 5 повторов. -Мак – без макрофагов. Значимые отличия по сравнению с *M1-SMAD3* макрофагами: * $p < 0,05$.

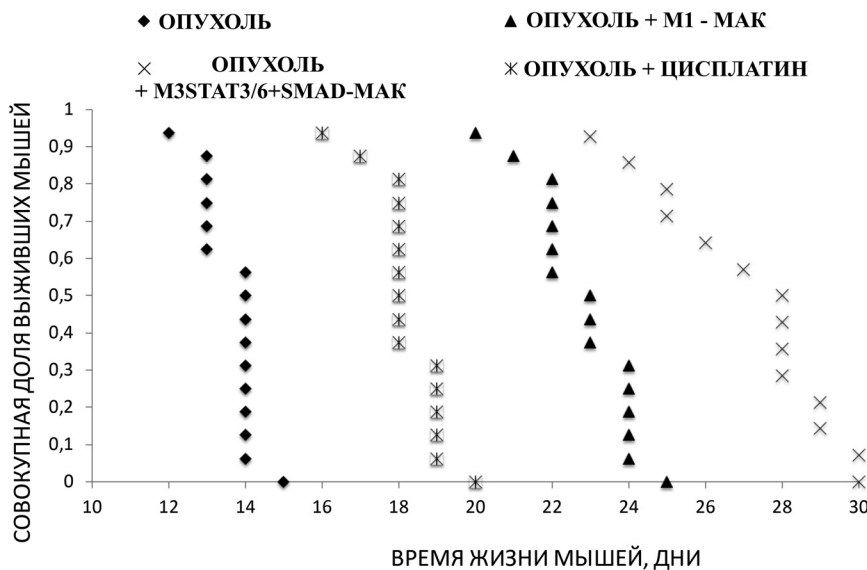


Рис. 2. Эффект введения *M1* и *M1-STAT3/6-SMAD3* макрофагов и цисплатина на продолжительность жизни мышей с КЭ (по анализу выживаемости по Каплану–Мейеру).

шей группы «Опухоль + M1_{STAT3/6-SMAD}-Мак» составила $27,1 \pm 0,5$ сут. ($p < 0,01$), что на 102% больше, чем в группе «Опухоль». Противоопухолевый эффект M1_{STAT3/6-SMAD} фенотипа макрофагов оказался значительно более выраженным, по сравнению с эффектами дисплатина.

Добавление PBS в группе «Опухоль + PBS» или M0 фенотипа макрофагов в группе «Опухоль + M0-Мак» не оказало существенного влияния на продолжительность жизни мышей.

Таким образом, инъекции M1_{STAT3/6-SMAD3} макрофагов значительно повысило устойчивость мышей к развитию КЭ.

Результаты проведенного исследования подтвердили нашу гипотезу о том, что опухолевый рост может быть эффективно ограничен с помощью M1 макрофагов с ингибированными факторами транскрипции: STAT3, STAT6 и/или SMAD3. Важной особенностью M1 макрофагов является то, что воспалительные цитокины, продуцируемые этим фенотипом, еще больше усиливают продукцию воспалительных цитокинов и еще больше сдвигают фенотип макрофагов в сторону M1 фенотипа. В результате образуется положительная обратная связь, необходимая для быстрого программирования противомикробного и противоопухолевого действия M1 макрофагов. Точно так же противовоспалительные цитокины IL-10 или TGF- β , продуцируемые M2 фенотипом, еще больше усиливают продукцию противовоспалительных цитокинов и еще больше сдвигают фенотип макрофагов в сторону M2 фенотипа. В результате образуется положительная обратная связь, необходимая для быстрого программирования антипаразитарных, противовоспалительных и ремоделирующих свойств этого фенотипа [31, 32].

В проопухолевой среде M1 фенотип репрограммируется в M2 фенотип [15], который усиливает экспрессию противовоспалительных цитокинов. В отличие от M1 макрофагов, M1 макрофаги с ингибированными факторами транскрипции M2 фенотипа STAT3, STAT6 и/или SMAD3, вероятно, не снижают продукцию провоспалительных цитокинов и не увеличивают продукцию противовоспалительных цитокинов, и, таким образом, сохраняют антиопухолевые свойства в проопухолевой среде. Это предположение требует экспериментальной проверки.

Макрофаги уже давно привлекают внимание в качестве возможных мишеней для антиопухолевой терапии. Так, например, антиопухолевую активность макрофагов пытались усилить путем стимуляции Toll-like рецепторов и ингибирования рецепторов к TGF- β [33]; культивирования в среде без сыворотки [5]; усиления активности генов, отвечающих за экспрессию IFN- γ и IL-12 [34]; связывания проопухолевых

факторов или их рецепторов на макрофагах [35, 36] и т.д. По существу, все описанные подходы направлены на формирование противоопухолевого M1 фенотипа, но опухоль перепрограммирует M1 фенотип в M2 [15], и это снижает эффективность M1 макрофагов.

По сравнению с M1 макрофагами, M1 макрофаги с ингибированными факторами транскрипции STAT3, STAT6 и/или SMAD3 оказывали более выраженное антиопухолевое действие *in vitro* и способствовали увеличению продолжительности жизни экспериментальных мышей с КЭ. Более выраженный противоопухолевый эффект этих макрофагов по сравнению с M1 может быть связан с большей провоспалительной активностью M1 макрофагов с ингибированными STAT3, STAT6 и/или SMAD3 и способностью сохранять анитиопухолевые свойства в проопухолевой среде.

Выявленные в работе факты, что M1 макрофаги с ингибированными факторами транскрипции STAT3, STAT6 и/или SMAD3 существенно подавляют рост опухоли, делают перспективной разработку клинической версии биотехнологии ограничения роста опухоли путем репрограммирования макрофагов с помощью блокирования факторов транскрипции M2 фенотипа.

References

1. Condeelis J., Pollard J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006; 124: 263-266.
2. Sica A., Schioppa T., Mantovani A., Allavena P. Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarized population promoting tumor progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer*. 2006; 42: 717-27.
3. Mills C.D., Thomas A.C., Lenz L.L., Munder M. Macrophage: SHIP of Immunity. *Frontiers in Immunology* 2014; 5: 620.
4. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology*. 2000; 164(12): 6166-73.
5. Rey-Giraud F., Hafner M., Ries C.H. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One*. 2012; 7(8): e42656.
6. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*. 2000; 55: 953-64.
7. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*. 2002; 23: 549-55.
8. Zeini M., Traves P.G., Lopez-Fontal R., Pantoja C., Matheu A., Serrano M. et al. Specific contribution of p19 (ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. *The Journal of Immunology*. 2006; 177: 3327-36.
9. Tsung K., Dolan J.P., Tsung Y.L., Norton J.A. Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Research*. 2002; 62: 5069-75.

10. Ibe S, Qin Z, Schuler T, Preiss S., Blankenstein T. Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001; 194: 1549-59.
11. Sharma M. Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2009; 30: 1-22.
12. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting. *Immunity*. 2004; 21: 137-48.
13. Khong H.T., Restifo N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of «tumor escape» phenotypes. *Nature Immunology*. 2002; 3: 999-1005.
14. Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6: 295-307.
15. Stout R.D., Watkins S.K., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009; 86(5): 1105-9.
16. Malyshev I., Malyshev Yu. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage «switch» phenotype. *BioMed Research International*. 2015; 2015: 341308.
17. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4: 941-52.
18. Kono Y., Kawakami S., Higuchi Y., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. Antitumor effect of nuclear factor- κ B decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. *Cancer Science*. 2014; 105(8): 1049-55.
19. Kalish S.V., Lyamina S.V., Usanova E.A., Manukhina E.B., Larionov N.P., Malyshev I.Yu. Macrophages reprogrammed in vitro towards the M1 phenotype and activated with LPS extend lifespan of mice with ehrlich ascites carcinoma. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2015; 21: 226-34.
20. Cavazzoni E., Bugiantella W., Graziosi L., Franceschini M.S., Donini A. Malignant ascites: pathophysiology and treatment. *International Journal of Clinical Oncology*. 2013; 18: 1-9.
21. Becker G., Galandi D., Blum H.E. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment. *European Journal of Cancer*. 2006; 42: 589-97.
22. Ahmed N., Stenvers K.L. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Frontiers in Oncology*. 2013; 3: 256.
22. Saif M.W., Siddiqui I.A., Sohail M.A. Management of ascites due to gastrointestinal malignancy. *Annals of Saudi Medicine*. 2009; 29: 369-77.
24. Kono Y., Kawakami S., Higuchi Y., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. Antitumor effect of nuclear factor- κ B decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. *Cancer Science*. 2014; 105(8): 1049-55.
25. Ray T., Chakrabarti M.K., Pal A. Hemagglutinin protease secreted by *V. cholerae* induced apoptosis in breast cancer cells by ROS mediated intrinsic pathway and regresses tumor growth in mice model. *Apoptosis*. 2016; 21(2): 143-54.
26. Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Current Protocols in Immunology*. 2008; Chapter 14: Unit 14.1.
27. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 1(13): 453-61.
28. Roco A., Сауьн J., Contreras S., Stojanova J., Quinones L. Can pharmacogenetics explain efficacy and safety of cisplatin pharmacotherapy? *Frontiers in Genetics*. 2014; 5: 391.
29. Chen T.C., Cho H.Y., Wang W., Wetzel S.J., Singh A., Nguyen J. et al. Chemotherapeutic effect of a novel temozolomide analog on nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Science*. 2015; 22(1): 71.
30. Noël W., Raes G., Hassanzadeh Ghassabeh G., De Baetselier P., Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in Parasitology*. 2004; 20(3): 126-33.
31. Mantovani A., Sica A., Locati A. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Europ. The Journal of Immunology*. 2006; 37(1): 14-6.
32. Ramanathan S., Jagannathan N. Tumor associated macrophage: the phenotypes, traits and functions. *Iranian Journal of Cancer Prevention*. 2014; 7(1): 1-8.
33. Peng J., Tsang J.Y., Li D., Niu N., Ho D.H., Lau K.F. et al. Inhibition of TGF- β signaling in combination with TLR7 ligation re-programs a tumoricidal phenotype in tumor-associated macrophages. *Cancer Letters*. 2013; 331(2): 239-49.
34. Satoh T., Saika T., Ebara S., Kusaka N., Timme T.L., Yang G. et al. Macrophages transduced with an adenoviral vector expressing IL-12 suppress tumor growth and metastasis in a preclinical metastatic prostate cancer model. *Cancer Research*. 2003; 63(22): 7853-60.
35. Baay M., Brouwer A., Pauwels P., Peeters M. and Lardon F. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011: 565187.
36. Aharinejad S., Abraham D., Paulus P., Abri H., Hofmann M., Grossschmidt K. Colony-stimulating factor-1 antisense treatment suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *Cancer Research*. 2002; 62: 5317-24.

Сведения об авторах:

Калиш Сергей Валерьевич, ст. лаборант каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, e-mail: anahoretas@mail.ru

Лямина Светлана Владимировна, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, e-mail: svlvs@mail.ru

Раецкая Анастасия Александровна, лаборант каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, e-mail: mohnush@mail.ru

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

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-006.+612.1

Повещенко А.Ф.^{1,3}, Соловьева А.О.¹, Зубарева К.Э.¹, Стрункин Д.Н.⁴,
Грицык О.Б.², Повещенко О.В.^{1,3}, Шурлыгина А.В.², Коненков В.И.¹

Изучение миграции и распределения клеток костного мозга трансплантированных животным с меланомой B16

¹ ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии», 630060, Новосибирск, Новосибирск, Россия, ул. Тимакова, д. 2

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» 630117, г. Новосибирск, Россия, ул. Тимакова, д. 4

³ ФГБОУ ВПО НГПУ, 630126, г. Новосибирск, Россия, ул. Вилюйская, д. 28

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», 630099, Новосибирск, Россия, ул. Ядринцовская, д. 14

Цель — выявление особенностей миграции и распределения сингенных клеток костного мозга (ККМ) и его субпопуляции (МСК) после их трансплантации в органы реципиента-носителя меланомы B16. **Методика.** В работе использовались мыши самцы и самки линии C57Bl/6. **Индукция опухолевого роста:** имплантировали клетки меланомы B16 подкожно в заднюю правую лапу самок мышей C57Bl/6 в дозе $2,5 \times 10^5$ клеток/мышь. Изучение миграции и распределения *in vivo* ККМ и МСК осуществляли при помощи генетического маркера — специфической последовательности Y-хромосомы самцов линии C57Bl/6 при сингенной внутривенной трансплантации самкам с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на Authorized Termal Cycler — Light Cycler 480 II/96 (Roche). Введение суспензии неразделенных клеток костного мозга, мезенхимальных стволовых клеток от самцов-доноров мышам-реципиентам (сингенным реципиентам самкам C57Bl/6) с последующим выделением органов реципиентов проводилось через определенные временные интервалы, затем из органов реципиентов выделяли ДНК. **Результаты.** Показано, что клетки костного мозга, позитивные по Y-хромосоме, мигрируют как в лимфоидные (лимфатические узлы, селезенку, костный мозг), так и в нелимфоидные органы (печень, сердце, головной мозг, кожу) сингенных реципиентов. Помимо миграции клеток из костного мозга в другие органы, существует и обратный путь миграции клеток из кровотока в костный мозг. Развитие у интактных мышей линии C57Bl/6 меланомы B16 стимулирует процессы миграции трансплантированных ККМ и МСК в костный мозг. Установлено, что при опухолевом росте усилена миграция трансплантированных клеток костного мозга, в том числе и популяции МСК, в костный мозг. На ранней стадии формирования опухоли миграционная активность МСК в опухоль выше по сравнению с неразделенной фракцией костного мозга. На поздних стадиях формирования опухоли неразделенная популяция клеток костного мозга интенсивнее мигрирует в опухоль по сравнению с популяцией МСК. **Заключение.** Обсуждается возможность использования МСК костного мозга для таргетной терапии опухолевых заболеваний, так как миграция МСК в опухолевую ткань может быть использована для эффективной доставки противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: C57Bl/6; перевиваемая опухоль B16 меланомы; клетки костного мозга; мезенхимальные стромальные клетки; миграция; маркер миграции — специфическая последовательность Y-хромосомы.

Для цитирования: Повещенко А.Ф., Соловьева А.О., Зубарева К.Э., Стрункин Д.Н., Грицык О.Б., Повещенко О.В., Шурлыгина А.В., Коненков В.И. Изучение миграции и распределения клеток костного мозга трансплантированных животным с меланомой B16. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 10–21. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.10-21

Для корреспонденции: Повещенко Александр Федорович, доктор мед. наук зав. лаб. физиологии протективной системы, ФГБНУ НИИКЭЛ, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru

Поступила 20.09.2016

Poveshchenko A.F.^{1,3}, Solovieva A.O.¹, Zubareva K.E.¹, Strunkin D.N.¹, Gricyk O.B.²,
Poveshchenko O.V.^{1,3}, Shurlygina A.V.², Konenkov V.I.¹

Study of migration and distribution of bone marrow cells transplanted animals with B16 melanoma

¹ FGBNU «Institute of Clinical and Experimental Lymphology», Novosibirsk, st. Timakova, 2, Russia

² FGBNU «Institute of Physiology and Fundamental Medicine», st. Timakova, 4, Novosibirsk

³ FGBOU VPO State Pedagogical Universitet, 630126, Novosibirsk, Str. Viluiskaya, 28, Russia

⁴ FGBNU «Institute of Fundamental and Clinical Immunology», Novosibirsk, Str. Yadrinsovskaya 14, Russia

Purpose. Reveal features migration and distribution of syngeneic bone marrow cells (BMC) and subpopulations (MSC) after transplantation into the recipient carrier B16 melanoma bodies. **Methods.** We used mouse male and female C57BL/6 mice. Induction of Tumor Growth: B16 melanoma cells implanted subcutaneously into right hind paw of female

C57BL/6 mice at a dose of 2.5×10^5 cells / mouse. migration study in vivo distribution and BMC and MSC was performed using genetic markers — Y-chromosome specific sequence line male C57Bl/6 syngeneic intravenous transplantation in females using the polymerase chain reaction (PCR) in real time on Authorized Thermal Cycler — Light Cycler 480 II / 96 (Roche). Introduction suspension of unseparated bone marrow cells, mesenchymal stem cells from donor to recipient male mice (syngeneic recipient female C57BL/6), followed by isolation of recipients of organs was performed at regular intervals, then of organ recipients isolated DNA. Results. It was shown that bone marrow cells positive for Y-chromosome in migrate lymphoid (lymph nodes, spleen, bone marrow) or in non-lymphoid organs (liver, heart, brain, skin) syngeneic recipients. In addition to the migration of cells from the bone marrow to other organs, there is a way back migration of cells from the circulation to the bone marrow. B16 melanoma stimulates the migration of transplanted MSCs and BMC in bone marrow. It is found that tumor growth enhanced migration of transplanted bone marrow cells, including populations of MSCs in the bone marrow. In the early stages of tumor formation MSC migration activity higher than the BMC. In the later stages of tumor formation undivided population of bone marrow cells migrate to the intense swelling compared with a population of MSCs. **Conclusion.** The possibility of using bone marrow MSCs for targeted therapy of tumor diseases, because migration of MSCs in tumor tissue can be used to effectively deliver anticancer drugs.

Keywords: C57BL/6; B16 melanoma; bone marrow cells; mesenchymal stromal cells; Y-chromosome marker migration.

For citation: Poveshchenko A.F., Solovieva A.O., Zubareva K.E., Strunkin D.N., Gricik O.B., Poveshchenko O.V., Shurlygina A.V., Konenkov V.I. Study of migration and distribution of bone marrow cells transplanted animals with B16 Melanoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(2): 10–21. (in Russ.) DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.10-21

For correspondence: Alexandr F. Poveshchenko, Doctor of Medical Science, Head of the Laboratory of Physiology protective system. Institute of Clinical and Experimental Lymphology, 630060, Novosibirsk, st. Timakova, 2, Russia, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Information about authors:

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

Solovieva A.O., <http://orcid.org/0000-0002-7740-8456>

Zubareva K.E., <http://orcid.org/0000-0001-9181-1498>

Gricik O.B., <http://orcid.org/0000-0002-6176-670X>

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

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

Shurlygina A.V., <http://orcid.org/0000-0002-3576-9456>

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

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

Received 20.09.2016

Введение

Миграция является фундаментальным свойством клеток, участвующим в поддержании гомеостаза, регенерации и иммунной защите организма. Миграционная активность и характер распределения клеток после трансплантации зависит от множества факторов, таких, как тканевая принадлежность трансплантированных клеток, количество введенных и путь введения клеток, их тип и микроокружение [1, 2]. Миграционная активность трансплантированных клеток играет ключевую роль в эффективности клеточной терапии, поскольку для осуществления своих функций — дифференцировки в клетки поврежденной ткани, выделение ростовых факторов, цитокинов и др., клет-

ки должны мигрировать в патологический очаг. Отсутствие либо наличие патологического очага (воспаление, повреждение, опухолевый рост и др.) также влияет на миграцию и распределение трансплантированных клеток [3].

Костный мозг содержит два типа стволовых клеток: гемопоэтические стволовые и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), которые функционально взаимодействуют и находятся в специализированном микроокружении, влияющем на их миграцию, эффективность их приживания после трансплантации, секрецию цитокинов и ростовых факторов. МСК костного мозга, обладают набором уникальных свойств (наиболее важным из которых

является пластичность), которые делают их идеально подходящими, для клеточной терапии в регенеративной медицине [1].

Принципиально важным вопросом для трансплантологии и регенеративной медицины является вопрос эффективности использования при лечении тех или иных патологий трансплантации цельного (неразделенного на субпопуляции) костного мозга или его отдельных популяций например мезенхимальных стромальных клеток костного мозга.

Таким образом, изучение влияния опухолевого процесса у реципиента на миграционную активность разных типов трансплантируемых клеток актуально, имеет фундаментальное и прикладное значение. Не ясны особенности распределения трансплантированных МСК предшественников по сравнению с цельной неразделенной популяцией костного мозга в норме и в условиях опухолевого роста в органах животного-опухоленосителя. Успешность клеточной терапии с использованием МСК также зависит не только от способности клеток восстанавливать поврежденные ткани и регулировать процессы репарации, но также, главным образом, от их способности мигрировать в поврежденные ткани и органы с целью адресной доставки препаратов, например при лечении опухолей.

Цель — выявление особенностей миграции и распределения клеток костного мозга (цельной, неразделенной популяции клеток) и его субпопуляции (МСК) после сингенной трансплантации в лимфоидных и не лимфоидных органах здорового реципиента и реципиента-носителя меланомы В16.

Методика

В работе использовались мыши самцы и самки линии С57В1/6 в возрасте 8—12 нед., число реципиентов в каждой исследуемой группе составляло 8—10 животных. Животные находились на стандартной сбалансированной диете в виварии СО РАМН. Эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Индукция опухолевого роста. Клетки меланомы В16 в дозе $2,5 \times 10^5$ клеток/мышь имплантировали подкожно в заднюю правую лапу самок мышей С57В1/6 6—8-недельного возраста.

Изучение миграции и распределения in vivo ККМ и МСК при помощи генетического маркера — специфической последовательности Y-хромосомы самцов линии С57В1/6 при сингенной внутривенной трансплантации самкам. Для изучения миграции и распределения клеток донора в организме был использован маркер специфической последовательности

Y-хромосомы самцов-доноров клеток костного мозга, наличие которого количественно оценивалось в органах сингенных реципиентов самок с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на Authorized Thermal Cycler — Light Cycler 480 II/96 (Roche). Y-хромосома является маркером трансплантированных клеток доноров.

Проводили выделение ДНК из органов реципиента и определение ее концентрации. ДНК, содержащая маркер трансплантированных клеток костного мозга сингенных самцов (специфическую последовательность Y-хромосомы), выделяли при помощи стандартной обработки додецилсульфатом натрия (SDS) с протеиназой К и методом высаливания [4]. Пробы ДНК приводили к единой концентрации, амплифицировали в реакционной смеси, содержащей мышьячные праймеры специфичные для Y-хромосомы [5]. Для амплификации целевой последовательности были использованы следующие последовательности праймеров: 5'- TCCAGGCTGGTCCGAAACTCATTT-3', 5'- ACATGAACAACGCCTTGGGCTTCA -3' и зонд 5'- [FAM]- tccactggcctgtgtggcattgcagttat-<BHQ1>-3'. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 20 пмоль каждого праймера, 20 пмоль зонда, 5 мкл ДНК. Условия реакции амплификации: денатурация 95°C в течение 5 мин, 40 циклов: денатурация 95°C 20 с, отжиг праймеров 65°C 20 с, и элонгация 72°C 20 с.

Для определения абсолютного количества маркерного гена в образцах использовали серию разведений стандарта, в качестве которого была использована плаزمиды с наработанным геном Zfy Y-хромосомы. Поскольку в клетках самца содержится по 2 копии гена Zfy Y-хромосомы, количество трансплантированных клеток в образце рассчитывалось по формуле:

$$N = A/2,$$

где N — количество Y-позитивных клеток; A — количество гена, определенного в образце.

В реакцию брали ДНК образцов одинаковой концентрации, из 100 тыс. клеток.

В качестве внутреннего контроля был использован ген «домашнего хозяйства» β-актина, присутствующий в одинаковых количествах во всех клетках.

В качестве позитивного и негативного контроля использовали ткань интактных самцов и самок соответственно. Введение суспензии неразделенных клеток костного мозга, МСК от самцов-доноров мышам-реципиентам (сингенным реципиентам самкам С57В1/6) с последующим выделением органов реципиентов проводилось через определенные временные интервалы, проводилось выделение ДНК из органов. Выделение органов реципиентов (самок линии С57В1/6) производили через 1 ч, 3, 7 сут. после трансплантации донорских клеток. Для исследования выделялись лимфатические узлы паховые, аксилляр-

ные, селезенка, печень, сердце, кожа, мышцы бедра, головной мозг, костный мозг. Выделенные органы замораживались при температуре -70°C .

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи программы Statistica 6,0 (StatSoft, США). Полученные данные проверяли на нормальность распределения, согласно критериям Колмогорова—Смирнова. Значимость различий между выборочными величинами независимых выборок оценивали при помощи непараметрического критерия Крускала—Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки статистической значимости различий использовался непараметрический критерий Манна—Уитни. Результаты выражались в количестве Y-позитивных клеток на 100 тысяч клеток реципиента \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

Результаты и обсуждение

1. Влияние меланомы B16 на миграционную активность неразделенной популяции клеток костного мозга и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Для изучения влияния опухоли на миграционную активность трансплантированных клеток мы провели сравнительный анализ количественного распределения клеток костного мозга в течение 2 нед. после трансплантации в норме и в условиях опухолевого роста. В качестве опухолевой модели использовали меланому B16, характеризующуюся агрессивностью и быстрым ростом, поэтому выбор временных точек для анализа распределения трансплантированных клеток был обусловлен ограничением жизни опухоленосителей (в среднем 21 сут), а также динамикой роста опухоли. Через 1 ч после введения клеток опухоль еще не сформирована. Через 7 сут. после введения клеток (на 11-е сут. после прививки опухоли) опухоль видна макроскопически, размер около $0,9 \text{ см}^3$. Через 14 сут. размер опухоли достигает 2 см^3 , видны очаги некроза опухолевой ткани. Данная модель исследования позволяет описать влияние опухоли на миграционную активность трансплантированных клеток.

Для исследования распределения трансплантированных клеток костного мозга по органам интактного реципиента неразделенную популяцию клеток костного мозга самцов доноров (содержащих эндогенный маркер Y-хромосому) трансплантировали интактным самкам реципиентам. Через 1 ч, 3, 7 и 14 сут. после трансплантации ККМ органы самок-реципиентов анализировали на количественное содержание маркера (специфической последовательности Y-хромосомы трансплантированных клеток самца) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Было показано, что через 1 час после трансплантации клетки были обнаружены в крови, печени, селезенке, легких, костном мозге, сердце и лимфоузлах. Кожа и головной мозг не содержали Y-позитивных клеток. Максимальное количество трансплантированных клеток обнаружено в крови по сравнению со всеми другими органами (1800 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$) (рис. 1). Через 3 сут. после трансплантации Y-позитивные клетки покидают кровяное русло и распределяются по всем исследуемым органам с максимальными показателями в головном мозге и костном мозге (770 и 750 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, соответственно, $p < 0,01$). В печени на данном сроке отмечается статистически значимо более низкий уровень накопления маркера по сравнению с другими органами (3 Y-позитивных клетки/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$) (рис. 1). К 7-м сут. клетки накапливаются в основном в селезенке (4442 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$) и в костном мозге (2190 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$). В крови, сердце, головном мозге реципиента на данном сроке Y-позитивные клетки не обнаружены (рис. 1). Через 2 нед. после трансплантации маркер трансплантированных клеток определялся во всех исследуемых органах. На данном сроке клетки аккумулируются в основном в лимфатических узлах (3190 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$). Кроме того, на данном сроке отмечено появление трансплантированных клеток костного мозга в крови реципиента (430 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток).

Итак, через 1 ч после введения клетки находятся в основном в крови реципиента. Однако через 3 сут. трансплантированные клетки выходят из кровяного русла и распределяются по органам, в основном аккумулируются в костном и головном мозге. Через 1 нед. после трансплантации максимальное количество Y-позитивных клеток содержат селезенка и костный мозг. Через 2 нед. трансплантированные клетки аккумулируются в лимфатических узлах реципиента и появляются в крови.

Для анализа влияния опухолевого роста на миграцию и распределение трансплантированных ККМ мы использовали опухолевую модель меланомы B16. Нами показано, что через 1 ч после трансплантации (3-и сут. после прививки опухоли) клетки костного мозга детектировались в печени, селезенке, легких, костном мозге, сердце, лимфоузлах, крови и опухоли. В головном мозге, коже, околоопухолевых лимфоузлах трансплантированных клеток не обнаружено. На данном сроке максимальное количество клеток определялось в крови реципиента-опухоленосителя (12000 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципи-

ента, $\rho < 0,01$). Также отмечается высокий показатель миграции трансплантированных клеток в костный мозг (1213 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента) по сравнению с остальными органами, где определяются единичные Y-позитивные клетки (рис. 2, А).

Через 3 сут. после трансплантации ККМ (7 сут. после прививки опухоли) маркер трансплантированных клеток определялся во всех исследуемых органах, кроме крови. В печени показатель накопления ККМ статистически значимо выше по сравнению с другими исследуемыми органами (1400 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $\rho < 0,01$). Минималь-

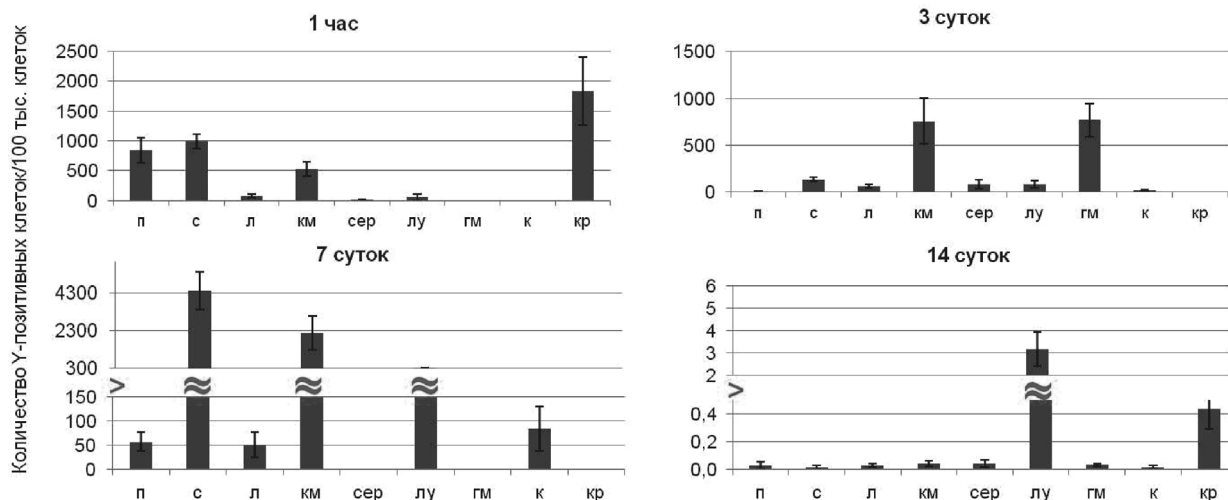


Рис. 1. Количественный анализ трансплантированных клеток в органах реципиента методом ПЦР в режиме реального времени. Клетки костного мозга самца (содержащие Y-хромосому) вводили самкам реципиентам. Через 1 ч, 3 сут., 7 сут., 14 сут. определяли количество трансплантированных клеток в органах самок-реципиентов методом ПЦР в режиме реального времени.

По оси ординат — количество Y-позитивных клеток на 100 тыс. клеток органов самки-реципиента. Данные представлены как $M \pm \sigma$. Сокращения: п — печень, с — селезенка, км — костный мозг, сер — сердце, лу — лимфатические узлы, гм — головной мозг, л — легкие, к — кожа, кр — кровь.

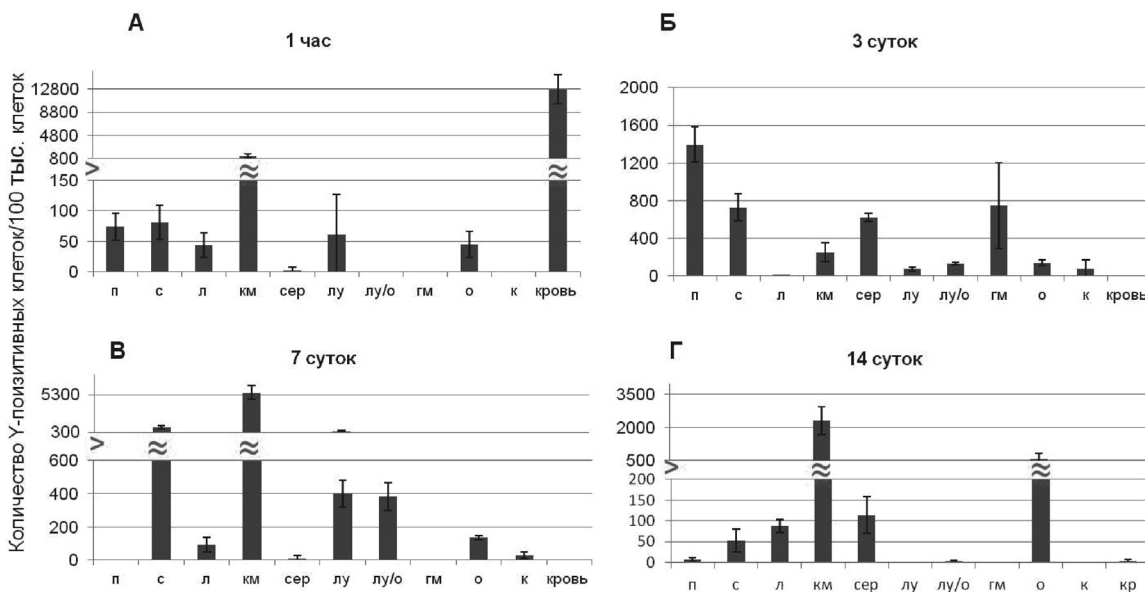


Рис. 2. Анализ количественного распределения трансплантированных клеток костного мозга в органах реципиента-опухоленосителя методом ПЦР в режиме реального времени. Самкам мышей С57В1 трансплантировали клетки меланомы В16. Через 3 сут. после прививки опухоли внутривенно вводили клетки костного мозга самцов мышей С57В1 (содержащие Y-хромосому). Через 1 ч, 3 сут., 7 сут., 14 сут. определяли количество трансплантированных клеток в органах самки — реципиента методом ПЦР в режиме реального времени.

По оси ординат — количество Y-позитивных клеток на 100 тыс. клеток органов самки-реципиента. Данные представлены как $M \pm \sigma$. Сокращения: п — печень, с — селезенка, л — легкие, км — костный мозг, сер — сердце, лу — лимфатические узлы, гм — головной мозг, к — кожа, кр — кровь, о — опухоль, лу/о — околоопухолевые лимфоузлы.

ное накопление маркера отмечается в легких реципиента (4,1 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента $p < 0,01$) (рис. 2, Б). Отмечено, что значимых различий между накоплением трансплантированных ККМ в ткани опухоли и околоопухолевых лимфоузлах на данном сроке не обнаружено (138 и 129 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, соответственно, $p = 0,78$) (рис. 2, Б).

Через 1 нед. после введения ККМ (11 сут. после прививки опухоли, объем опухоли $\sim 0,9 \text{ см}^3$), Y-позитивные клетки обнаружены в костном мозге, лимфоузлах, селезенке, околоопухолевых лимфоузлах, опухоли, легких, сердце, коже. В печени, головном мозге и крови Y-позитивных клеток не обнаружено. В основном на данном сроке клетки аккумулируются в костном мозге (5554 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$) (рис. 2). Кроме того высокий показатель накопления ККМ обнаружен в селезенке (950 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$). Показано, что в регионарных лимфатических лимфоузлах и околоопухолевых лимфоузлах статистически значимых различий между уровнем накопления маркера не выявлено (400 и 380 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p = 0,77$) (рис. 2). В опухоли на данном сроке маркера клеток донора статистически значимо меньше по сравнению с околоопухолевыми лимфатическими узлами (140 и 382,8 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $p < 0,01$) (рис. 2, В).

Через 2 нед. после трансплантации ККМ (объем опухоли $\sim 1,4 \text{ см}^3$) клетки детектировались в костном мозге, опухолевой ткани, печени, селезенке, легких, сердце, околоопухолевых лимфоузлах и крови. Максимальное количество маркера трансплантированных клеток определялось в костном мозге реципиента (2280 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$), также отмечается высокое накопление клеток в опухолевой ткани по сравнению с остальными исследуемыми органами (560 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$) (рис. 2, Г).

Итак, через 1 ч после трансплантации максимальное количество клеток определяется в крови и в костном мозге реципиента-опухоленосителя, через 3 сут. Y-позитивные клетки из крови мигрируют в периферические органы, максимальное количество трансплантированных клеток определяется в печени. Через 7 и 14 сут. большинство трансплантированных клеток находится в костном мозге. Необходимо отметить, что в опухолевой ткани показано постепенное увеличение количества Y-позитивных клеток (рис. 2).

Влияние опухолевого роста на миграционную активность и распределение трансплантированных кле-

ток костного мозга оценивали путем сравнения количественного соотношения мигрировавших клеток в органах интактного реципиента и реципиента-опухоленосителя меланомы В16.

Количество трансплантированных ККМ в селезенке интактного реципиента через 1 ч после введения значительно выше по сравнению с количеством трансплантированных клеток в селезенке реципиента-опухоленосителя (1000 и 80 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $p = 0,00003$). На 3-и сут. трансплантированные клетки выходят из селезенки интактного реципиента, тогда как у опухоленосителя количество мигрировавших клеток в селезенке возрастает (135 и 728 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $p = < 0,01$). Через 1 нед. количество Y-позитивных клеток в селезенке интактного животного достигает своего максимума и значительно превышает показатель миграции Y-позитивных клеток в селезенку при опухолевом росте (4424 и 947 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $p = < 0,01$). Через 2 нед. количество трансплантированных ККМ в селезенке интактного реципиента падает и существенно не отличается от показателя миграции на опухолевой модели (53 и 15 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно) (рис. 3).

Костный мозг реципиентов-опухоленосителей через 1 ч после трансплантации содержал статистически значимо больше Y-позитивных клеток по сравнению с таковым интактного реципиента (1213 и 529 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $p = 0,00002$). Через 3 сут. количество трансплантированных клеток в костном мозге реципиента-опухоленосителя снижается, в то время как в костном мозге интактного реципиента происходит постепенное накопление трансплантированных клеток (251 и 754 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $p = 0,0002$). Однако через 1 нед. после трансплантации происходит существенное повышение количества Y-позитивных клеток в костном мозге реципиента-опухоленосителя (5541 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента) и превышает количество трансплантированных клеток в костном мозге интактного реципиента (2193 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента). Через 2 нед. количество Y-позитивных клеток в костном мозге в норме и при опухолевом росте снижается, однако в костном мозге реципиента — опухоленосителя их значительно больше по сравнению с количеством трансплантированных клеток в костном мозге интактного реципиента (2309 и 42 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $p < 0,01$) (рис. 3).

Показано, что активность миграции в лимфатические узлы реципиентов двух групп в течение 7 сут. имеет схожую динамику. Однако на 14-е сут. количество ККМ в лимфоузлах интактного животного значительно возрастает (321 через 7 сут. и 3190 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента через 14 сут., p<0,01), тогда как при опухолевом росте лимфоузлы реципиента на 14-е сут. после трансплантации не содержали Y-позитивные клетки (рис. 3).

Различия в активности миграции в печень реципиентов двух групп отмечаются только в первые 3 сут. Через 1 ч после введения Y-позитивных клеток в печени интактных реципиентов значимо больше по сравнению с печенью реципиентов-опухоленосителей (847 и 74 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента соответственно, p<0,01). В течение 3-х сут. в печени интактных реципиентов значительно снижается

количество Y-позитивных клеток (3 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента), тогда как при опухолевой нагрузке миграция трансплантированных клеток в печень увеличивается к 3-м сут. после трансплантации (1396 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента). В последующие 2 нед. печень реципиентов как в норме так и при опухолевом росте содержит единичные Y-позитивные клетки (рис. 3, Г).

В легких интактного реципиента через 3 сут. после трансплантации определяется статистически значимо большее количество трансплантированных ККМ по сравнению с легкими реципиента-опухоленосителя (66,6 и 4,1 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента соответственно, p = 0,00001). Однако в течение 2 нед. количество Y-позитивных клеток в легких реципиента-опухоленосителя возрастает. Через

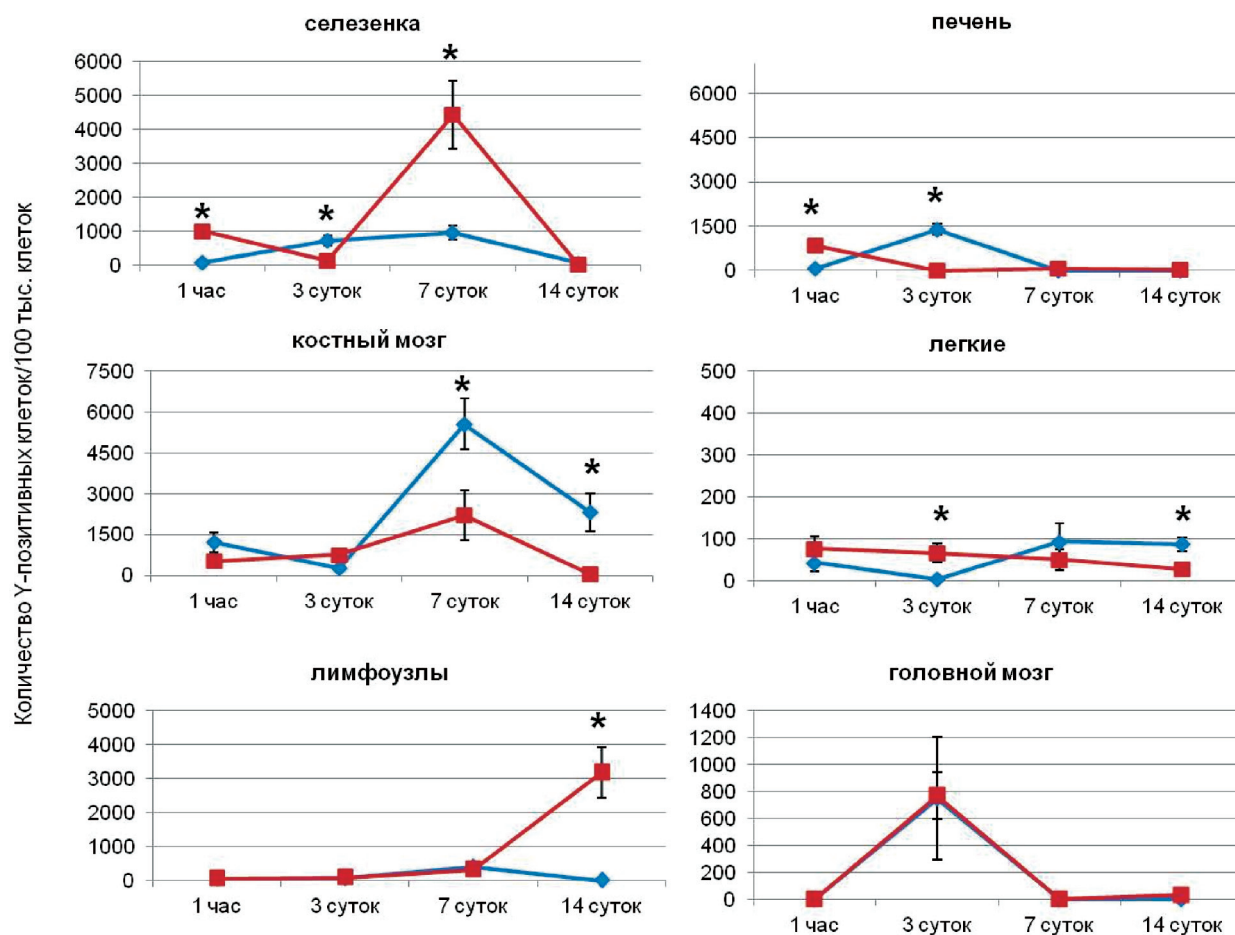


Рис. 3. Сравнительный анализ количественного распределения трансплантированных клеток костного мозга в норме и в условиях опухолевого роста методом ПЦР в режиме реального времени. В качестве реципиентов – интактные самки мышей линии С57 В1 (красные линии) и самки мышей С57В1-носители меланомы В16 (синие линии). Клетки костного мозга самца мышей С57В1 (содержащие Y-хромосому) внутривенно вводили 2 группам реципиента в одинаковой дозе. Через 1 ч, 3 сут., 7 сут., 14 сут. определяли количество трансплантированных клеток в органах самки – реципиента методом ПЦР в режиме реального времени. По оси абсцисс – время после трансплантации клеток костного мозга. По оси ординат – количество Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток органов самки – реципиента. Данные представлены как М±σ. * – p<0,01.

14 сут. после трансплантации в легких реципиента-опухоленосителя Υ -позитивных клеток статистически значимо больше по сравнению с легкими интактного реципиента ($p = 0,0002$)

В сердце реципиентов-опухоленосителей определяется статистически значимо большее количество трансплантированных клеток по сравнению с интактными реципиентами через 3 сут. (263,2 и 84,9 Υ -позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $p = 0,00002$) и через 14 сут. (115,5 и 40 Υ -позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $p = 0,0007$) (рис. 3).

Активность миграции трансплантированных ККМ в головной мозг не зависит от опухолевого роста, поскольку количество мигрировавших Υ -позитивных клеток не отличалось в головном мозге интактного реципиента и реципиента-опухоленосителя (рис. 3).

Наиболее значимые отличия миграции и распределения трансплантированных клеток костного мозга показаны в костном мозге, селезенке, лимфатических узлах, печени и сердце. При опухолевом росте преобладает миграция трансплантированных клеток в костный мозг через 1 ч, 7 и 14 сут., причем максимальные показатели количества трансплантированных клеток

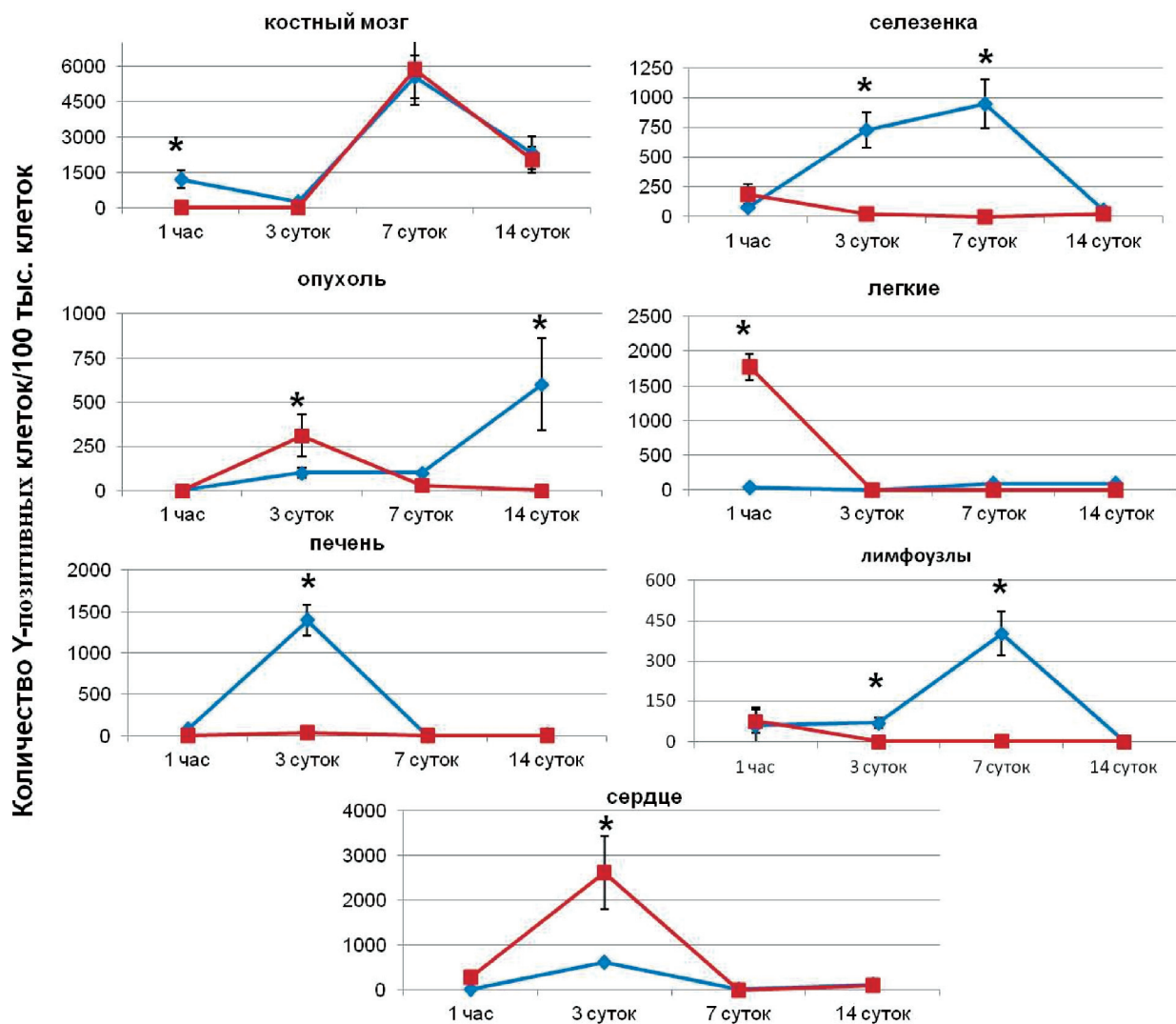


Рис. 4. Сравнительный анализ количественного распределения трансплантированных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга и неразделенной популяции костного мозга в условиях опухолевого роста методом ПЦР в режиме реального времени.

В качестве реципиентов: самки мышей С57В1 – носители меланомы В16.

Не разделенную популяцию костного мозга (синие линии) и МСК (красные линии) самца мышей С57В1 (содержащие Υ -хромосому) внутривенно вводили самкам-реципиентам в одинаковой дозе. Через 1 ч, 3 сут., 7 сут., 14 сут. определяли количество трансплантированных клеток в органах самки – реципиента методом ПЦР в режиме реального времени. По оси X – время после трансплантации клеток. По оси ординат – количество копий маркерного гена Zfy клеток самца на 100 тыс. клеток органов самки – реципиента. Данные представлены как $M \pm \sigma$. * – $p < 0,01$.

отмечаются через 7 сут. после трансплантации. В организме интактного реципиента аналогичная динамика распределения трансплантированных клеток отмечается в селезенке. Обнаружено, что опухолевый рост не влияет на миграционную активность трансплантированных ККМ в головной мозг.

Было показано, что через 1 ч после трансплантации Y-позитивные ККМ определяются в основном в крови реципиента-опухоленосителя (рис. 2). В свою очередь, основная масса трансплантированных МСК на данном сроке обнаружена в легких реципиента (рис. 2, 4, 5). Также через 1 ч после трансплантации отмечается отличие миграционной активности ККМ и МСК в костный мозг и сердце реципиента (рис. 2, 4, 5). В костный мозг интенсивнее мигрирует неразделенная фракция костного мозга (1213 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента), тогда как трансплантированные МСК в костном мозге не обнаружены (рис. 2, 4). Показана более интенсивная миграция МСК в сердце реципиента по сравнению с ККМ (293 и 33 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента соответственно, p = 0,0003). В остальных исследуемых органах через 1 ч после трансплантации различий в количестве мигрировавших ККМ и МСК не определялось (рис. 4).

Через 3 сут. после трансплантации ККМ мигрируют в печень и селезенку реципиента-опухоленосителя (рис. 2, 4), тогда как максимальный показатель

миграции МСК обнаружен в сердце и опухоли реципиента (рис. 4).

На 7-е сут. после трансплантации (опухоль достигает размеров ~0,9 см³) как ККМ, так и МСК активно мигрируют в костный мозг реципиента-опухоленосителя (рис. 2, 4). Отмечается более высокий показатель миграции ККМ в опухоль, селезенку, легкие, лимфоузлы и околоопухолевые лимфоузлы по сравнению с МСК (рис. 4).

Через 2 нед. (опухоль достигает размеров ~2 см³), обнаружено большее количество трансплантированных ККМ в опухоли и легких реципиентов-опухоленосителей. Y-позитивные МСК в основном определяются в костном мозге и околоопухолевых лимфоузлах (рис. 4).

Таким образом, трансплантированные ККМ и МСК КМ имеют различную динамику распределения по организму реципиента-опухоленосителя, однако в костном мозге через 7 и 14 сут. определялось одинаковое количество Y-позитивных ККМ и МСК

В ткани опухоли Y-позитивные клетки определяются только через 3 сут. после трансплантации, причем количество трансплантированных МСК больше по сравнению с количеством трансплантированных ККМ. Однако через 2 нед. МСК не определяются в ткани опухоли, а количество ККМ возрастает по сравнению с начальными временными точками.

Механизмы миграции клеток, связаны с цитокинами, хемокинами и их клеточными рецепторами.

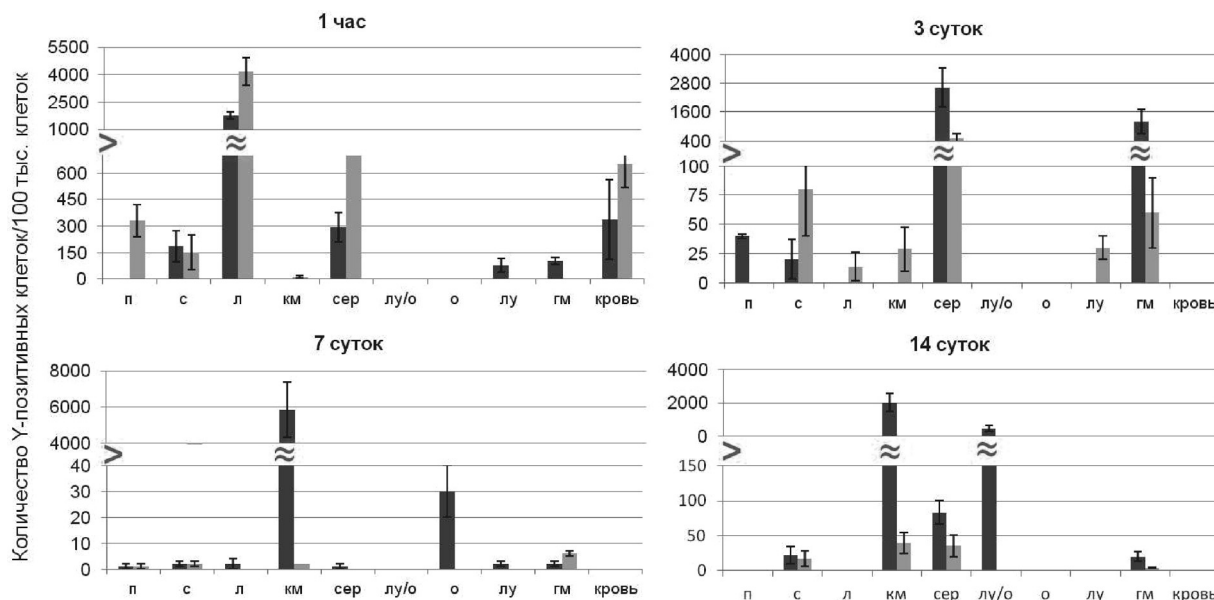


Рис. 5. Сравнительный анализ количественного распределения трансплантированных МСК в органах реципиента-опухоленосителя и интактного реципиента методом ПЦР в режиме реального времени.

По оси ординат — количество Y-позитивных клеток на 100 тыс. клеток органов самки-реципиента. Данные представлены как M±σ. Сокращения: п — печень, с — селезенка, л — легкие, км — костный мозг, сер — сердце, лу/о — околоопухолевые лимфотические узлы, лу — лимфатические узлы, гм — головной мозг, о — опухоль, кр — кровь.

Важным цитокином, регулирующим миграцию клеток служит фактор стромальных клеток-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1), решающую роль в синтезе которого играет тканевая гипоксия [6]. Блокада индуцируемого гипоксией фактора 1 (HIF-1) приводит к снижению синтеза SDF-1 и снижению адгезивной способности стволовых клеток в культуре. Взаимодействие хемокина SDF-1 и рецептора CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) является ключевым в регуляции хоминга и миграции стволовых клеток, оно контролирует прикрепление, заселение костного мозга стволовыми клетками, развитие и выход зрелых клеток костного мозга в циркуляцию крови. Активация SDF-1/CXCR4 происходит в ответ на воспалительные, хемотаксические стимулы, такие, как ИЛ-6, выделяющиеся в очаге воспаления, инфаркте, инсульте, травме, опухоли, при образовании новых сосудов, для рекрутирования эндотелиальных клеток предшественников. Миграционная активность в печень, легкие, кости и другие нелимфоидные органы, вероятно, также связана с высокой экспрессией в данных органах хемокина SDF1.

Миграция лимфоцитов из кровяного русла во вторичные лимфоидные ткани (лимфатические узлы или Пейеровы бляшки) происходит при взаимодействии хоминг-рецепторов с сосудистыми адресинами на поверхности клеток высокого эндотелия в этих тканях [7]. Как видно из полученных результатов, процессы миграции клеток-предшественников костного мозга тесно связаны с их последующей пролиферацией и дифференцировкой. Так, например, увеличение количества маркера в органах через 1 и 24 ч больше объяснимы именно миграцией и перераспределением клеток, а через 1 и 3 мес., вероятно, больше свидетельствуют о пластичности клеток, пролиферации и дифференцировке трансплантированных клеток в органах. Рядом авторов показано, что при внутривенной трансплантации МСК уже в первые часы после трансплантации обнаруживаются практически во всех органах, однако через 2 сут. количество введенных клеток в организме реципиента уменьшается [8]. В нашем исследовании обнаружено, что клетки костного мозга мигрируют во все органы и ткани, в том числе и в головной мозг, причем уровень определяемого маркера клеток донорского происхождения постепенно увеличивается, что может свидетельствовать о пролиферации и дифференцировке трансплантируемых клеток. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что мезенхимальные клетки костного мозга обладают способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и мигрировать от места введения к различным областям головного мозга [9].

Трансплантированные клетки не только мигрируют и интегрируются в ткани, но и химеризируют их. Предполагается, что понятие дифференцировки трансплантированных стволовых клеток может подразумевать дифференцировку, трансдифференцировку, клеточное слияние [10], перенос поверхностных антигенов (трогоцитоз) [11]. Клеточное слияние подразумевает слияние клеточных мембран, цитоплазм и ядер, в результате чего клетки содержат хромосомы и клеток хозяина, и трансплантированных клеток [10]. Во время трогоцитоза происходит перенос только поверхностных антигенов, без слияния цитоплазм и ядер. Трансдифференцировка заключается в способности дифференцированных клеток изменять свой фенотип и дифференцироваться в другой клеточный тип без дедифференцировки [12].

Данные о влиянии клеток костного мозга на опухолевый рост противоречивы. Одни авторы утверждают, что клетки костномозгового происхождения стимулируют рост опухоли, в основном за счет участия в формировании стромы опухоли, неоангиогенеза, стимуляции метастазирования [13], установления иммунологической толерантности [14]. Результаты исследования других авторов свидетельствуют об ингибирующем влиянии клеток костного мозга на туморогенез [15]. Очевидно, это объясняется тем, что костный мозг содержит различные популяции клеток, которые обладают противоопухолевой активностью. Для исследования влияния опухолевого роста на миграционную активность клеток костного мозга мы сравнили количественное соотношение мигрировавших клеток в органах интактного реципиента и реципиента-носителя меланомы В16. Через 1 ч после введения клеток (3 сут. после прививки опухоли) опухоль еще не сформирована. Через 7 сут. после введения клеток (11 сут. после прививки опухоли) опухоль видна макроскопически, размер опухоли около 0,9 см³. Через 14 сут. размер опухоли достигает 2 см³, видны очаги некроза опухолевой ткани.

Наиболее значимые отличия миграции и распределения трансплантированных клеток обнаружены в костном мозге, селезенке и лимфатических узлах. При опухолевом росте преобладает миграция трансплантированных клеток в костный мозг, тогда как в нормальных условиях миграционная активность выше в селезенку реципиента.

Предполагается, что накопление раковых клеток в костном мозге является основополагающим фактором метастазирования опухоли, такие клетки обозначаются диссеминированными опухолевыми клетками [16]. Возможно, интенсивная миграция трансплантированных клеток в костный мозг реципиентов-носителей меланомы В16 опосредована хемоаттрактантами диссеминированных опухолевых клеток. Существует

также теория, согласно которой метастазирование опухолевых клеток происходит путем слияния костно-мозговых лимфоидных клеток с опухолевыми клетками, такие гибридные клетки обладают способностью к направленной миграции и неконтролируемому росту [17].

В работе было оценено влияние опухолевого роста на миграцию и распределение неразделенной популяции клеток костного мозга введенных внутривенно. Показано, что у мышей реципиентов-носителей меланомы В16 по мере роста опухоли, введенные клетки аккумулируются в костном мозге и опухолевой ткани, тогда как у интактных животных-реципиентов максимальное количество Y-позитивных клеток через 14 сут. после трансплантации детектируется в лимфатических узлах. Также было оценено влияние опухолевого роста на миграцию и распределение трансплантированных МСК костного мозга. Показано, что по мере роста опухоли, введенные МСК накапливаются в костном мозге реципиента-опухоленосителя и в околоопухолевых лимфатических узлах. Таким образом, сравнительное исследование распределения трансплантированных ККМ и МСК в организме реципиента-опухоленосителя показало, что опухолевый рост стимулирует миграцию как ККМ, так и МСК в костный мозг реципиента-опухоленосителя.

Заключение

Клетки костного мозга, позитивные по Y-хромосоме, мигрируют как в лимфоидные (лимфатические узлы, селезенку, костный мозг), так и в нелимфоидные органы (печень, сердце, головной мозг, кожу) сингенных реципиентов и определяются в течение 1 мес. наблюдения.

Помимо миграции клеток из костного мозга в другие органы, существует и обратный путь миграции клеток из кровотока в костный мозг. Миграция созревающих в костном мозге клеток с различной стадией дифференцировки и пластичности носит непрерывный характер и является динамическим процессом.

Развитие у интактных мышей линии C57Bl/6 меланомы В16 стимулирует процессы миграции трансплантированных клеток костного мозга и мезенхимальных стромальных клеток в костный мозг.

Установлено, что при опухолевом росте усилена миграция трансплантированных клеток костного мозга, в том числе и популяции МСК, в костный мозг. На ранней стадии формирования опухоли миграционная активность МСК в опухоль выше по сравнению с неразделенной фракцией костного мозга. На поздних стадиях формирования опухоли неразделенная популяция клеток костного мозга интенсивнее мигри-

рует в опухоль по сравнению с отдельной популяцией МСК.

Таким образом, исследование свойства клеток костного мозга — миграции имеет фундаментальное значение, а изучение особенностей миграции разных популяций клеток костного мозга, в норме и при наличии опухолевого процесса у реципиента является не только актуальной фундаментальной задачей, но и задачей имеющей прикладное значение. В настоящее время активно обсуждается возможность использования МСК костного мозга для таргетной терапии опухолевых заболеваний, так как миграция МСК в опухолевую ткань может быть использована для эффективной доставки противоопухолевых препаратов.

References

1. Solovieva A.O., Zubareva K.E., Poveshchenko A.F., Nechaeva E.A., Kononov V.I. Methods of cells labeling for visualization in vivo. *Geny I kletki*. 2013; 4: 33-8. (in Russian)
2. Solovieva A.O., Poveshchenko A.F., Poveshchenko O.V., Zubareva K.E., Miller T.V., Kononov V.I. Comparative study of migration and distribution of donor cells in the bone marrow and spleen lymphoid and non-lymphoid organs at different times after transplantation in vivo in mice CBA. *Sibirskiy nauchnyy Meditsinskiy zhurnal*. 2013; 33 (4): 35-1. (in Russian)
3. Poveshchenko A.F., Kononov V.I. Mechanisms and factors of angiogenesis. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2010; 41 (2): 68-9. (in Russian)
4. Jolkowska J., Pieczonka A., Strabel T., Boruczowski D., Wachowiak J., Bader P., Witt M. Hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation: a comparison of quantitative analysis by automated DNA sizing and fluorescent in situ hybridization. *BMC Blood Disord*. 2005; 5(1):1-6.
5. Pang W. Role of muscle-derived cells in hematopoietic reconstitution of irradiated mice. *Blood*. 2000. 95. (3). 1106-110.
6. Hitchon C., Wong K., Ma G. et al. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2002; 46(10): 2587-97.
7. Tavassoli M., Hardy C.L., Aizawa S. et al. Molecular mechanism of hematopoietic stem cell binding to the supportive stroma. *Prog. Clin. Biol. Res*. 1990; 352: 87-5.
8. Li Z.H., Liao W., Cui X.L. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *Int. J. Med. Sci*. 2011; 8 (1): 74-3.
9. Kopen G.C., Prockop D.J., Phinney D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 10711-16.
10. Oren-Suissa M, Podbilewicz B. Cell fusion during development. *Trends Cell Biol*. 2007; 17: 537-46.
11. Yamanaka N., Wong C.G., Gertsenstein M. et al. Bone marrow transplantation results in human donor blood cells acquiring and displaying mouse recipient class I MHC and CD45 antigens on their surface [Electronic resource].

PLoS One. 2009; 4(12):8489. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2796175/>.

12. Rechavi O., Goldstein I., Kloog Y. Intercellular exchange of proteins: the immune cell habit of sharing. *FEBS Lett.* 2009; 583: 1792-99.

13. Zhang T., Lee Y.W., Rui Y.F. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 13:1-15.

14. Stockmann C., Schadendorf D., Klose R., Helfrich I. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. *Front Oncol.* 2014; 4: 69.

15. Finnberg N.K., Hart L.S., Dolloff N.G., Zachary B., Rodgers Z., Dicker D.T., El-Deiry W.S. High-Resolution Imaging and Antitumor Effects of GFP Bone Marrow-Derived Cells Homing to Syngeneic Mouse Colon Tumors *Am. J. Pathol.* 2011; 179(5): 2169-76.

16. Bubnovskaya L, Kovelskaya A, Gumenyuk L, Disseminated tumor cells in bone marrow of gastric cancer patients: correlation with tumor hypoxia and clinical relevance. *J Oncol.* 2014; 2014:1-7.

17. Pawelek J.M. Fusion of bone marrow-derived cells with cancer cells: metastasis as a secondary disease in cancer. *Chin J Cancer.* 2014; Mar 5;33(3):133-9.

Сведения об авторах:

Соловьева Анастасия Олеговна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: solovey_ao@mail.ru

Зубарева Кристина Эдуардовна, мл. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: zubareva_kje@mail.ru

Грицьук Оксана Борисовна, канд. мед. наук, науч. сотр. НИИФФМ, e-mail: oks-gricik@yandex.ru

Шурлыгина Анна Вениаминовна, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. экспериментальной нейробиологии НИИФФМ, e-mail: anna_v_s@mail.ru

Стрункин Дмитрий Николаевич, канд. мед. наук, науч. сотр. НИИКЭЛ, e-mail: strunkind@mail.ru

Повещенко Ольга Владимировна, доктор мед. наук, зав. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ, e-mail: PoveshchenkoOV@yandex.ru

Коненков Владимир Иосифович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, директор НИИКЭЛ, e-mail: vikonenkov@gmail.com

© Коллектив авторов, 2017
УДК 612.119:539.1.06:616-092.9

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

Активация регенерации красной и белой пульпы селезенки после проведения сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в условиях воздействия ионизирующего излучения

¹ ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, г. Екатеринбург, Россия, ул. Репина, д. 3

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

Цель — изучение влияния сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), выделенных из плаценты, на регенерацию белой и красной пульпы селезенки в физиологических условиях и в условиях воздействия ионизирующего излучения. **Методика.** Эксперименты выполнены белых лабораторных беспородных мышках-самцах. Облучение животных проводилось на гамма-терапевтической установке типа АГАТ-С с радионуклидным источником Co-60 типа ГИК-8-4, поглощенная доза составила 4,0 Гр, мощность поглощенной дозы 20 сГр/мин. Животным опытной группы внутривенно вводились аллогенные ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг, суспендированные в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Выделение гемопоэтических стволовых клеток осуществлялось методом прямой иммуномагнитной сепарации. Проводили морфометрию лимфоидных фолликулов селезенки (средняя площадь, средняя площадь В-зоны, средняя площадь герминативного центра, средняя площадь Т-зоны), а также определялось среднее расстояние между центрами фолликулов и средняя клеточность красной пульпы. **Результаты.** Показано, что после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК происходит увеличение размеров лимфоидного фолликула за счет площади В-зоны фолликула, площади герминативного центра фолликула, восстановление содержания лимфобластов, пролимфоцитов и лимфоцитов до значений нормы. На фоне трансплантации ММСК и ГСК в условиях лучевой нагрузки установлено увеличение плотности клеток в красной пульпе селезенки и, как следствие, увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов. Увеличение плотности клеток в красной пульпе происходит как за счет увеличения содержания эритроидных клеток, так и за счет увеличения гранулоцитов. **Заключение.** Проведенные исследования свидетельствуют об эффективности сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в отношении основных морфометрических показателей селезенки после воздействия ионизирующего излучения.

Ключевые слова: ионизирующее излучение; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; гемопоэтические стволовые клетки; селезенка; регенерация.

Для цитирования: Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П. Активация регенерации красной и белой пульпы селезенки после проведения сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в условиях воздействия ионизирующего излучения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61 (2): 22—27.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.22-27

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.04.2016

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

Activation of regeneration of red and white pulp of the spleen after the combined transplantation of HSC and MSCS in terms of exposure to ionizing radiation

¹ Ural state medical University of the Ministry of health of Russia, Ekaterinburg, Repin street 3, 620028, Russia

² «Institute of medical cell technologies», 620026, Ekaterinburg, Karla Marksa str 22 A, 620026, Russia

The purpose of this work was to study the effect of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal (MSCS) and hematopoietic stem cells (HSCs) isolated from the placenta, on the regeneration of white and red pulp of the spleen under physiological conditions and in conditions of exposure to ionizing radiation. **Methods.** The experiments were performed with laboratory mice-males. We studied the influence of ionizing radiation dose of 4.0 Gy. Animals of the experimental group were intravenously infused into MMSK and GSK respectively at a dose of 6 million cells/kg and 330 thousand

cells/kg, suspended in 0.2 ml of 0.9% NaCl solution. The selection of hematopoietic stem cells was carried out using the direct technique of immune magnetic separation. Were studied the following morphometric parameters of the spleen: the average area of lymphoid follicles, the average area of zone of lymphoid follicles, average size of germinal center of lymphoid follicles, average size T-zones of lymphoid follicles, the average distance between the centers of the follicles, the average cellularity of the red pulp. **Results.** As a result, of research obtained that after exposure to ionizing radiation on the background of combined transplantation of HSC and MSCS there is an increase in size of lymphoid follicle at the expense of area B-zone of the follicle, the area germinative center of the follicle, restoring the content of lymphoblasts and lymphocytes to normal values. On the background of transplantation MMSC and GSK in terms of radiation exposure changes and the red pulp of the spleen. The increase in the density of cells in the red pulp of the spleen and, as a consequence, of the increase of the distance between the centers of lymphoid follicles. The increase in the density of cells in the red pulp occurs due to the increase in the content of erythroid cells and by increasing granulocytes. Key words: ionizing radiation, multipotent mesenchymal stromal cells, hematopoietic stem cells, spleen, regeneration. **Conclusion.** Studies have shown the effectiveness of combined transplantation MSC and GSK in respect of the main morphometric parameters of the spleen after exposure to ionizing radiation.

Keywords: ionizing radiation; multipotent mesenchymal stromal cells; hematopoietic stem cells; spleen; regeneration.

For citation: Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Yastrebov A.P. Activation of regeneration of red and white pulp of the spleen after the combined transplantation of HSC and MSCS in terms of exposure to ionizing radiation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya. (Patological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61 (2): 22–27.* (in Russ.) DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.22-27

For correspondence: Grebnev Dmitriy Yurievich (Head. Department of pathological physiology of the USMU is conducted by the Ministry of health of Russia, Ph.D., senior researcher «Institute of medical cell technologies», laboratory of anti-aging technology), e-mail: dr-Grebnev77@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 06.04.2016

Введение

Основная причина катастрофического клеточного опустошения селезенки, происходящего в самые ранние сроки после воздействия ионизирующего излучения (ИИ), состоит в резком торможении процессов клеточного деления, гибели клеток [1–5]. При этом восстановление регенерации обеспечивается небольшим количеством стволовых клеток, сохранившихся в тканях после глубокого начального опустошения и обладающих высоким пролиферативным потенциалом. Восполнение пула стволовых клеток в физиологических условиях, а также после действия экстремальных факторов представляется перспективным в плане активации регенерации тканей [5–8]. Исследования, проведенные в последние годы, свидетельствуют о возможности выделения из ткани зрелой плаценты мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [9–11]. ММСК, обладая выраженными иммуносупрессивными свойствами при совместном введении с ГСК могут обеспечить защиту введенных клеток от иммунной системы реципиента. Способность ММСК вырабатывать факторы, обеспечивающие направленную миграцию ГСК, повышающие их жизнеспособность, а также возможность формировать микроокружение для ГСК может обеспечить лучшее приживание трансплантата [12–14].

Цель исследования — изучение влияния сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, выделенных из

плаценты, на регенерацию белой и красной пульпы селезенки в физиологических условиях и в условиях воздействия ионизирующего излучения.

Методика

Эксперименты выполнены на 72 белых лабораторных беспородных мышках-самцах возраста 6–8 мес., массой 20–25 г. Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК выполнены на 6 интактных лабораторных беспородных животных мышках-самках 5–6-месячного возраста, массой 20–25 г, срок гестации 14 дней. Облучение животных проводилось на гамма-терапевтической установке типа АГАТ—С с радионуклидным источником ^{60}Co — 60, поглощенная доза составила 4,0 Гр, мощность поглощенной дозы 20 сГр/мин. Животные были разделены на 2 группы — опыт и контроль. Контрольную группу составили животные, не подвергавшиеся облучению. Животным опытной группы внутривенно вводили аллогенные ММСК и ГСК в дозе 6 млн клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг соответственно, суспендированные в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Контрольной группе вводили 0,9% раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 ч после облучения однократно. Забой животных осуществлялся на 1-е и 7-е сут. после облучения.

Выделение ММСК осуществлялось из плаценты лабораторных животных по методу Тепляшина А.С. Культивирование ММСК проводилось в условиях CO_2 -инкубатора (Termo Scientific) при температуре 37°C с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Для трансплантации лабораторным животным были использованы клетки 3-го пассажа. Для подтверждения принадлежности выделенных клеток к ММСК производилась их дифференцировка в адипогенном и остеогенном направлениях. Идентификация ММСК иммуноцитохимическим методом проводилась с использованием набора — MILLIPORE®'s Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit. MILLIPORE®'s Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit содержит панель позитивных и негативных маркеров, характеризующих популяцию ММСК. Позитивные маркеры включают антитела, направленные против антигенов, расположенных на поверхности клеток — интегрин- $\beta 1$, CD 54, а также антитела к молекулам внеклеточного матрикса, формирующимся в культуре ММСК — фибронектину и коллагену I типа. К негативным маркерам для ММСК относятся специфичные антигены гемопоэтических клеток — CD 14 и CD45.

Выделение ГСК осуществлялось методом прямой иммуномагнитной сепарации. Иммунофенотипирование суспензии ГСК было проведено методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами (Vecton Dickinson, США). Во фракции трансплантируемых клеток оценивалось содержание ГСК с иммунофенотипом положительных по CD117+, Sca-1+ и отрицательных по Lin- на проточном цитометре BD. Содержание клеток с иммунофенотипом CD117+, Sca-1+, Lin- составило 85—93%. Жизнеспособность клеток, определенная с использованием трипанового синего, составила 95—97%. Для проведения гистологического исследования селезенки материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, после стандартной принятой в гистологии обработки готовили парафиновые срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрические исследования проводили с использованием программы Biovision 4.0. Исследовали не менее 3 срезов каждого органа, полученных с разного уровня тканевого блока. Определялись следующие показатели:

- 1 — средняя площадь лимфоидного фолликула = суммарная площадь лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов;
- 2 — средняя площадь В-зоны лимфоидного фолликула = суммарная площадь В-зоны лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов;
- 3 — средняя площадь герминативного центра лимфоидного фолликула = суммарная площадь герми-

нативных центров лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов (не менее 40);

4 — средняя площадь Т-зоны лимфоидного фолликула = суммарная площадь Т-зоны лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов (не менее 40).

5 — среднее расстояние между центрами фолликулов = сумма расстояний между ближайшими фолликулами / количество подсчитанных расстояний (не менее 40);

6 — средняя клеточность красной пульпы определялась как среднее содержание клеток в красной пульпе не менее чем в 60 визуальных тестовых полях ($0,01 \text{ мм}^2$).

Для исследования клеточного состава селезенки образец ткани селезенки промывали, измельчали, обрабатывали раствором Аккутазы (Millipore, США). Раствор аккутазы обеспечивает ферментативное разрушение межклеточных контактов, не разрушая при этом мембрану клеток. Полученную суспензию инкубировали на шейкере при медленном покачивании в течение 7 мин при температуре 37°C , профильтровывали через фильтры на 70 мкм (Millipore, США). Для выделения мононуклеарной фракции настоящую суспензию наносили на раствор лимфолайт-М (Stem-Cell Technologies, США) в соотношении 1:1 и центрифугировали. Из полученного осадка готовили мазки на предметном стекле, аналогично мазку крови. Окраска проводилась по методу Паппенгейма. Использование данного метода окраски позволяет наиболее четко дифференцировать структуру ядер и зернистость лейкоцитов. При увеличении $\times 1000$, подсчитывали в 1000 клеток процент клеток разных рядов кроветворения.

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку среднего. Статистическую значимость отличий в сравниваемых выборках рассчитывали по критерию Манна—Уитни (U). В некоторых случаях для вычисления статистической значимости полученных результатов использовался критерий χ^2 . Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0). Вероятность различий считалась статистически значимой при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В физиологических условиях на 1-е сут. после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК у зрелых животных при проведении морфометрического и цитологического исследования селезенки не выявлено существенных отличий от данных группы контроля. При проведении морфометрического исследования селезенки

животных на 1-е и 7-е сут. после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК отмечен эффект от введения стволовых клеток, что проявлялось увеличением изучаемых показателей по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Тем не менее, по данным цитологического исследования селезенки содержание клеток (макрофаги, моноциты, гранулоцитарные и эритроидные клетки) в красной пульпе было значительно ниже значений нормы (табл. 2).

При проведении морфометрических исследований в селезенке зрелых животных на 7-е сут. после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК установлено, что площадь лимфоидного фолликула была статистически значимо больше ($1,06 \pm 0,05 \text{ мкм}^2 \cdot 10^5$, $p < 0,05$), чем в контроле. При этом данный показатель восстановился практи-

чески до значений нормы. При анализе площади герминативного центра выявлено увеличение по сравнению с контрольной группой изучаемого показателя до значений нормы. Проводя сравнительный анализ с площадью В-зоны у интактных животных следует отметить, что произошло восстановление данного показателя до значений близких к норме. При анализе площади Т-зоны в опытной группе выявлено отсутствие эффекта от трансплантации стволовых клеток. Установлено увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов относительно контрольной группы. При анализе плотности клеток в красной пульпе обнаружено значимое увеличение изучаемого показателя по сравнению с контрольной группой. При этом данный показатель восстановился до значений нормы (табл. 3).

Таблица 1

Морфометрические параметры селезенки зрелых мышей на 1-е сут. после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации стволовых клеток ($M \pm m$)

Параметр	Воздействие ИИ		
	Интактные животные (n = 9)	Введение NaCl (n = 9), контроль	Введение стволовых клеток (n = 9), опыт
Площадь лимфоидного фолликула (мкм ²)	109012 ± 6020	71035 ± 4042	71036 ± 3140*
Площадь В-зоны (мкм ²)	102017 ± 6241	70276 ± 3183*	72296 ± 5422*
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула (мкм ²)	17273 ± 2216	9263 ± 1125*	10165 ± 1253*
Площадь Т-зоны (мкм ²)	09243 ± 502	6712 ± 623*	6312 ± 1262*
Расстояние между центрами фолликулов, мкм	379,86 ± 9,31	279,43 ± 11,80*	275,14 ± 10,16*
Общая клеточность красной пульпы, 0,01 мм ²	244,29 ± 7,76	175,43 ± 8,20*	200,29 ± 7,76* **

Примечание. * — статистически значимое отличие от показателей интактных животных, $p < 0,05$; ** — отличие от показателей контрольной группы животных после воздействия ИИ, достоверно с $p < 0,05$

Таблица 2

Клеточный состав селезенки зрелых мышей на 1-е сут. после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации стволовых клеток ($M \pm m$)

Клеточные элементы	Содержание клеток, 10 ⁶		
	Интактные животные (n = 9)	Введение NaCl (n = 9), контроль	Введение стволовых клеток (n = 9), опыт
Общее число клеток	217 ± 8,42	129,43 ± 2,75 *	131,36 ± 4,06*
Лимфобласты	1,99 ± 0,05	1,20 ± 0,20*	1,09 ± 0,24*
Пролимфоциты	9,17 ± 0,58	5,66 ± 0,53*	5,90 ± 0,49*
Лимфоциты	151,86 ± 7,31	82,97 ± 3,05*	84,01 ± 3,93*
Плазматические клетки	0,61 ± 0,10	0,49 ± 0,04*	0,47 ± 0,04*
Макрофаги	6,63 ± 0,55	5,20 ± 0,29*	5,20 ± 0,29*
Моноциты	2,61 ± 0,27	1,93 ± 0,24*	1,93 ± 0,24*
Гранулоцитарные клетки	11,70 ± 0,74	8,41 ± 0,39*	8,84 ± 0,60*
Эритроидные клетки	25,53 ± 0,68	17,44 ± 0,56*	18,13 ± 0,63*
Прочие	7,89 ± 0,58	6,13 ± 0,40*	6,03 ± 0,32*

Примечание. * — статистически значимое отличие от показателей интактных животных, $p < 0,05$

Таблица 3

Морфометрические параметры селезенки зрелых мышей на 7-е сут. после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации стволовых клеток (M ± m)

Параметр	Введение NaCl (n = 9), контроль	Введение стволовых клеток (n = 9), опыт
Площадь лимфоидного фолликула (мкм ²)	89156 ± 5235*	106024 ± 4147 **
Площадь В-зоны (мкм ²)	79156 ± 5024*	97153 ± 4024**
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула (мкм ²)	14238 ± 618*	17237 ± 502 **
Площадь Т-зоны (мкм ²)	7536 ± 2183*	6723 ± 592 *
Расстояние между центрами фолликулов, мкм	304,57 ± 10,33*	338,00 ± 6,86* **
Общая клеточность красной пульпы, 0,01 мм ²	186,71 ± 5,47*	224,57 ± 6,65 **

Примечание. * — статистически значимые отличия от интактных животных, p<0,05; ** — от контрольной группы животных после воздействия ИИ, p<0,05

Таблица 4

Клеточный состав селезенки зрелых мышей на 7-е сут. после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации стволовых клеток, (M ± m)

Клеточные элементы	Содержание клеток, 10 ⁶	
	Введение NaCl (n = 9), контроль	Введение стволовых клеток (n = 9), опыт
Общее число клеток	130,84 ± 2,78*	204,66 ± 7,10**
Лимфобласты	1,54 ± 0,11*	1,86 ± 0,15 **
Пролимфоциты	5,73 ± 0,44*	8,41 ± 0,72 **
Лимфоциты	82,97 ± 3,05*	146,86 ± 6,98 **
Плазматические клетки	0,49 ± 0,04*	0,53 ± 0,05
Макрофаги	5,20 ± 0,29*	5,41 ± 0,26
Моноциты	1,93 ± 0,24*	2,04 ± 0,24
Гранулоцитарные клетки	8,41 ± 0,25*	10,40 ± 0,71**
Эритроидные клетки	17,44 ± 0,56*	22,57 ± 2,98 **
Прочие	6,13 ± 0,40	6,59 ± 0,41

Примечание. * — статистически значимые отличия от интактных животных, p<0,05; ** — от контрольной группы животных после воздействия ИИ, p<0,05

В то же время при анализе цитологического состава селезенки обнаружено увеличение по сравнению с контролем общего количества клеток в органе на 56,4%. Это увеличение было достигнуто за счет существенного увеличения содержания лимфобластов (+20,4%), пролимфоцитов (+25,1%), лимфоцитов (+77,0%), а также гранулоцитарных (+23,6%) и эритроидных элементов (+29,4%). При этом содержание плазматических клеток, моноцитов и макрофагов существенно не отличалось от значений нормы (табл. 4).

Заключение

Таким образом, проведенные исследования по изучению действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК после воздействия ионизирующего излучения выявили увеличение размеров лимфоидного фолликула за счет площади В-зоны фолликула,

площади герминативного центра фолликула. Эти изменения соответствуют данным цитологического исследования. Так было отмечено восстановление содержания лимфобластов, пролимфоцитов и лимфоцитов до значений нормы. На фоне трансплантации ММСК и ГСК в условиях лучевой нагрузки выявлены изменения и со стороны красной пульпы селезенки. Установлено увеличение плотности клеток в красной пульпе селезенки и, как следствие увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов. Увеличение плотности клеток в красной пульпе происходит как за счет увеличения содержания эритроидных клеток, так и за счет увеличения количества гранулоцитов. Выявленные изменения могут быть обусловлены способностью ММСК вырабатывать антиапоптозные факторы (НIF-1α), а также стимулировать экспрессию этих факторов другими клетками. Другой механизм действия сочетанной транс-

плантации ММСК и ГСК может быть обусловлен стимулирующим действием на гемопоэз в миелоидной ткани [9, 10]. Способность ММСК к выработке хемоаттрактанта для аллогенных и аутологических ГСК (SDF-1) может усиливать миграцию последних в селезенку и индуцировать таким образом формирование различных типов колоний.

References

1. Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu., Yastrebov A.P. The prospect of using stem cells for the activation of hematopoiesis in terms of age-related involution on the background of the effects of ionizing radiation. *Uspekhi gerontologii*. 2004; 27(2): 348-52. (in Russian)
2. Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu., Yastrebov A.P. Effect of different doses of GSK in the conduct of combined transplantation with MSCS on regeneration of myeloid tissue after exposure to ionizing radiation. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2014; (5): 73-7. (in Russian)
3. Isaev A.A., Melikhova V.S. The use of umbilical cord blood cells in clinical practice. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2008; 3 (1): 34- 41. (in Russian)
4. Glyukman E. Cord blood as an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2011; 6(1): 12- 5. (in Russian)
5. Grebnev D.Yu., Yastrebov A.P., Maklakova I.Yu. Changes in the morphometric parameters of the spleen of old laboratory animals after exposure to ionizing radiation on the background of stem cell transplantation. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 94 (6): 911-14. (in Russian)
6. Sazonov S.V. T-lymphocytes-regulators of the activity of cell proliferation in the tissue (scientific review). *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2007; (1): 91-4 (in Russian)
7. Mikkola H.K., Gekas C., Orkin S.H. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Experimental Hematology*. 2005; Vol. 33: 1048-54.
8. Teplashin A.S., Rostovskaya M.S., Harifullina S.Z. The allocation of mesenchymal stem cells from human placenta and their characterization. *International Symposium on the biology of cells in culture, «Stem cells, regeneration, cell therapy»*. 2004.
9. Patel D.M., Shah J., Srivastava A.S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells International*. 2013; Vol. 2013: 15.
10. Sazonov S.V. Morphogenetic properties of lymphoid cells in age-related involution of the organism. *Allergologiya i immunologiya*. 2008; 9(3): 267.
11. Sazonov S.V., Yastrebov A.P. State of proliferative processes in the kidney during cold exposure on the body. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2008; 22(4): 105-7.
12. Yastrebov A.P., Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu. Correction of the regeneration of myeloid tissue after acute blood loss in old experimental animals. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2011; 37(4): 103-5. (in Russian)
13. Zhao T., Zhang Z.N., Rong Z., Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; Vol. 474: 212-5.
14. Benito A.I., Diaz M.A., Gonzalez-Vicent M., Sevilla J., Madero L. Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical result. *Bone Marrow Transplantation*. 2004; Vol. 33: 675-90.

Сведения об авторах:

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

Ястребов Анатолий Петрович, член-корр. РАН, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий».

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Темнов А.А.¹, Волкова А.Г.¹, Мелерзанов А.В.², Новоселов В.И.¹

Эффект кондиционированной среды, полученной из культивированных мезенхимальных стволовых клеток, на регенерацию эндотелия при HCl-индуцированном повреждении трахеи у крыс

¹ ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН», 142292, Московская область, г. Пущино, Россия, ул. Институтская, д. 3

² МФТИ, 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Россия, Институтский пер., д. 9

Цель — изучение регенерации респираторного эпителия крысы при ингаляционной травме трахеи парами соляной кислоты. **Методика.** Активация процессов регенерации проводилась после химического ожога путем аппликации в трахею кондиционированной среды, полученной при культивировании аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (кМСК). **Результаты.** Показано, что на 3-и 7-е сут. после аппликации препарата кМСК эпителий трахеи практически полностью восстанавливается. При этом в процессе регенерации в подслизистом слое эпителия образуются замкнутые структуры, содержащие цилиарные клетки, аналогичные реснитчатым клеткам респираторного эпителия трахеи. Эти структуры мигрируют в сторону эпителия и встраиваются в пораженный эпителий. Заключение. Показано, что препарат кМСК, введенный непосредственно в трахею в ранние сроки после повреждения, способствует восстановлению нормального подслизистого слоя. Было отмечено снижение выраженности воспаления, ускорение темпов миграции цилиарных клеток к поверхности трахеи и формирование реснитчатого эпителия de novo.

Ключевые слова: трахея, HCl-индуцированная травма, мезенхимальные стволовые клетки; кондиционированная среда; эндотелий.

Для цитирования: Темнов А.А., Волкова А.Г., Мелерзанов А.В., Новоселов В.И. Эффект кондиционированной среды, полученной из культивированных мезенхимальных стволовых клеток, на регенерацию эндотелия при HCl-индуцированном повреждении трахеи у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 28–36.
DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.28-36

Для корреспонденции: Темнов Андрей Александрович, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. Институт биофизики клетки РАН, e-mail: aa-temnov@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта: Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», РФФИ 15-04-04021 и 15-04-04009.

Поступила 05.12.2016

Temnov A.A.¹, Volkova A.G.¹, Melerzanov A.V.², Novoselov V.I.¹

Effect of conditioned medium from mesenchymal stem cells on regeneration of endothelium at HCl-induced damage trachea in rats

¹ Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya st. 3, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology 9 Institutsky Pereulok, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia, 141707

The purpose. Respiratory epithelium regeneration is studied in rats with tracheal damage induced by inhaling hydrochloric acid vapor. **Method.** Regeneration process after the chemical burn was activated by intratracheal administration of preparations obtained from the same-species mesenchymal stem cells (MSC). **Results.** Tracheal epithelium is shown to recover almost completely on day 3–7 after applying MSC compositions (MSCs). Closed structures containing ciliated cells similar to ciliated cells of the respiratory epithelium lining the trachea are formed in the submucosal epithelium during regeneration. These structures migrate towards epithelium and get incorporated into the damaged epithelium. This phenomenon is apparently indicative of the special mechanism of respiratory epithelium regeneration after HCl-induced injury. **Conclusion.** It is demonstrated in this study that cell-free MSCs instilled intratracheally promote the recovery of normal submucosal epithelium by either preventing or reducing necrosis and inflammation. Such topical MSCs administration significantly accelerates migration of ciliated cell towards the surface and de novo formation of the ciliary epithelium.

Keywords: trachea; HCl-induced damage; conditioned medium; mesenchymal stem cells; endothelium.

For citation: Temnov A.A., Volkova A.G., Melerzanov A.V., Novoselov V.I. Effect of conditioned medium from mesenchymal stem cells on regeneration of endothelium at HCl-induced damage trachea in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2017; 61(2): 28–36. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.28-36

For correspondence: Temnov Andrey, Doctor Med of Science aa-temnov@yandex.ru

Acknowledgement. The study is performed under the grant Presidium of the RAS «Molecular and Cellular Biology» and RFBR-supported grant: №15-04-04009 and 15-04-04021.

Received 05.12.2016

Введение

Острое повреждение легких может быть опосредовано как патологическими процессами, протекающими непосредственно в легочной ткани (пневмония или хроническая обструктивная болезнь легких), так и воздействием внелегочных факторов [1, 2]. Сепсис, массивная гемотрансфузия, аспирация желудочного содержимого может привести к фатальным осложнениям и прежде всего к острому респираторному дистресс-синдрому [3]. Аспирация содержимого желудка может произойти как во время операции при проведении анестезии, так и при приеме ряда фармакологических средств, наркотиков или алкоголя. При этом HCl является одним из главных патогенетических факторов, определяющих степень повреждения легочной ткани [4].

В действии соляной кислоты можно выделить две фазы. Вначале происходит непосредственно химическое повреждение эндотелия трахео-бронхиального дерева, гибель цилиарных и базальных клеток. На втором этапе наблюдается потеря сурфактанта, миграция нейтрофилов, гиперпродукция NO и провоспалительных цитокинов, активация перекисного окисления липидов [5—6]. Все эти процессы приводят к отеку, повреждению альвеол, и как следствие — к вентиляционно-перфузионному дисбалансу.

Несмотря на то, что клиническая и гистологическая картина повреждения трахеи при химическом ожоге хорошо изучены, остаются не до конца ясными процессы повреждения эндотелия верхних дыхательных путей, механизмы и сроки регенерации при HCl-индуцированной аспирационной травме. Особый интерес представляет изучение факторов, которые могут ускорить процесс заживления аспирационной травмы и восстановления функции реснитчатого эпителия трахеи после ожога.

Как было показано ранее, потенциальными агентами, ускоряющими процесс регенерации ткани, могут стать паракринные факторы, продуцируемые мезенхимальными стволовыми клетками [29]. К настоящему времени имеется достаточно наблюдений подтверждающих их регенераторный и противовоспалительный эффект [7]. Однако в доступной литературе мы не нашли достоверных данных, доказывающих возможность ингаляционного использования препаратов, полученных из стволовых клеток, для ускорения процессов регенерации эпителия трахеи после HCl-индуцированного ожога.

Цель — изучение возможности использования факторов, синтезируемых стволовыми клетками, на процесс регенерации эпителия трахеи после ингаляции HCl.

Методика

Животные

В экспериментах использовали крыс-самцов «Вистар» массой 200 г. Эксперименты проводились под наркозом в соответствии с требованиями к гуманному обращению с животными.

Химический ожог верхних дыхательных путей

Химический ожог верхних дыхательных путей вызывали выдерживанием животного в атмосфере насыщенных паров соляной кислоты. Животных наркотизировали внутривенным введением золотила (5 мг/кг) и рометара (10 мг/кг) и помещали в эксикатор (объем 10 литров, температура воздуха 20°C) с насыщенными парами HCl на 15 мин.

Получение стволовых клеток костного мозга

Для получения кондиционированной среды использовали аллогенные мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые получали из костного мозга бедренной кости крысы, находящейся под общим наркозом. Мононуклеарную фракцию клеток костного мозга выделяли центрифугированием в градиенте плотности с использованием стандартного раствора Lympholyte-H (фирма Cedarlane, Canada). Полученную суспензию мононуклеарных клеток высевали на чашки Петри и культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Антибиотики в процессе культивирования не применялись.

Для подтверждения того, что используемые клетки обладают свойствами МСК, была проведена их остеогенная, хондрогенная и адипогенная дифференцировка по стандартной методике [8].

Получение препаратов кМСК

После 3-го пассажа и получения клеточного моносоля проводили полную смену культуральной среды и через 3 сут. кондиционированную культуральную среду объединяли с лизатом МСК. Для получения лизата культуру клеток подвергали трем циклам замораживания-оттаивания. После объединения конди-

ционированной среды и лизата клеток полученный раствор подвергли фильтрации через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Это обеспечивало стерилизацию и гарантировало отсутствие клеточных элементов в конечном препарате. Проведенный электрофорез показал, что в конечном препарате преимущественно содержатся белки с М.м. 50—60 кДа [29].

Оценка рН трахеи

Для оценки уровня рН слизи в отдельной группе животных, находящихся под наркозом, под контролем осветителя в трахею вводили зонд (0,5 мм) с индикаторной полоской. Измерения рН проводили каждые 10 мин в течение 30 мин.

Ингаляция препаратов МСК

Через 30 мин после ингаляции HCl, когда рН слизи достигает физиологического значения, животное, находящееся в состоянии наркоза, фиксировали в станке и с помощью расширителя ротовой полости обеспечивали доступ в трахею. Препараты кМСК вводили в трахею в момент вдоха с помощью зонда с микроосветителем. Объем вводимого раствора — 200 мкл, концентрация белков 10 мг/мл.

Контрольные животные получали ингаляцию исходным раствором культуральной среды с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Антибиотики в ингаляционные препараты не добавляли.

Гистология и иммуногистохимия

Для гистологического исследования последствий химического ожога выделяли среднюю часть трахеи, полученные образцы фиксировали в фиксаторе «Minsky's Fixative» (National Diagnostics, USA) в течение 24 ч. Парафиновые срезы толщиной 2 мкм получали на микротоме Thermo scientific micron HM 325, Германия. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Для иммуногистохимических исследований в качестве первичных антител использовались моноклональные антитела против α -тубулина (Cell Signaling Technology, USA), Krt5 (Covance, USA), CCSP (Chemicon, USA); включение антител в клетки оценивалось после инкубации срезов с вторичными антителами к мышиным IgG конъюгированными с щелочной фосфатазой (Abcam, USA).

Результаты и обсуждение

Уровень рН в трахее после ингаляции HCl. Анализ рН слизи трахеи показал, что сразу после ожога насыщенными парами соляной кислоты (в пределах 5 мин) рН принимает очень низкие значения (2—2,5), что и является основным поражающим фактором при ожогах такого типа. В течение 30 мин происходит возвращение рН к нормальному значению (рН 7.3).

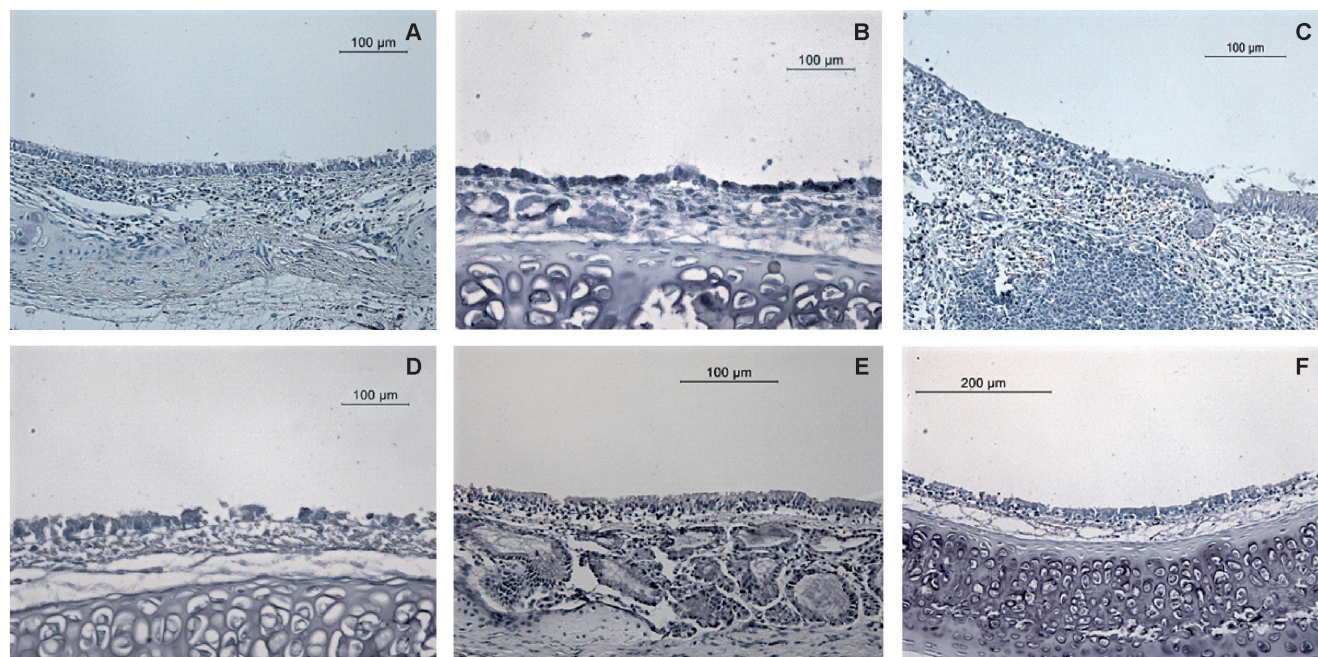


Рис. 1. Регенерация респираторного эпителия крысы после ингаляционной травмы парами соляной кислоты: А — нормальный респираторный эпителий трахеи; В — эпителий крысы через сутки после химического ожога; сохраняются в основном бокаловидные клетки; С — наличие фагоцитов в подслизистом слое после химического ожога (3 день после ожога); D — регенерация эпителия после химического ожога (7 суток после ожога); E — регенерация эпителия после химического ожога и аппликации кМСК (3 суток после ожога); F — регенерация эпителия после химического ожога и аппликации кМСК (7 суток после ожога).

*Влияние ингаляции HCl
на эпителиальный слой трахеи*

В норме слизистая оболочка трахеи выстлана многоядерным призматическим реснитчатым эпителием, в котором различают реснитчатые, бокаловидные и базальные клетки (рис. 1, А). Химический ожог в контрольной группе приводит к значительным разрушениям, причем гибель клеток эпителия трахеи после химического ожога в основном идет по пути некроза и через 24 ч после ожога приблизительно 50—70% поверхности эпителия остается поврежденным. При этом в основном гибнут реснитчатые клетки, что, по-видимому, связано с большой поверхностью ресничек, локализованных в слизи эпителия трахеи (рис. 1, В). Степень повреждения остается приблизительно такой же на 3-и сут. после ожога, кроме того, у некоторых животных наблюдается скопление в трахее макрофагов, что свидетельствует о развитии воспалительного процесса (рис. 1, С). Видимая регенерация эпителия трахеи наблюдается на 7-е и 14-е сут. после ожога (рис. 1, D).

Влияние ингаляции препарата, полученного из культивированных МСК, на состояние эпителия трахеи после HCl-индуцированной травмы

Принципиально другая гистологическая картина наблюдается после аппликации (через 30 мин после химического ожога) на обожженную трахею кондиционированной среды, полученной при культивировании МСК. Морфологический анализ структуры в опытной группе через 3 сут. после ожога показал, что эпителий трахеи в значительной степени сохранен, в эпителии

присутствуют реснитчатые клетки, отсутствующие при ожоге у контрольных животных, что свидетельствует об интенсивных регенеративных процессах после аппликации препарата кМСК (рис. 1, Е); через 7 сут. после ожога наблюдается полное восстановление эпителия (рис. 1, F). Таким образом, аппликация в поврежденную трахею препарата кМСК существенно ускоряет процессы регенерации эпителия трахеи после химической ингаляционной травмы.

Изучение проникновения экзогенных белков при HCl-индуцированном повреждении трахеи

Для определения глубины проникновения белков в поврежденную ткань трахеи были проведены опыты с ингаляцией раствора альбумина, меченого FITC, что имитирует проникновение высокомолекулярных белковых компонентов в стенку поврежденной трахеи. Анализ проводили через 30 мин после аппликации альбумина-FITC. Было показано, что в случае поврежденной трахеи альбумин локализовался только в самом эпителии, не доходя до подслизистого слоя (рис. 2, А). В случае HCl-индуцированной травмы трахеи меченый белок обнаруживался также в подслизистом слое, проникая через базальную мембрану (рис. 2, В).

*Влияние ингаляции HCl
на базальные клетки трахеи*

Основную роль в физиологической регенерации эпителия трахеи играют базальные клетки (рис. 3, А), которые способны пролиферировать и дифференцироваться в реснитчатые и секреторные клетки эпи-

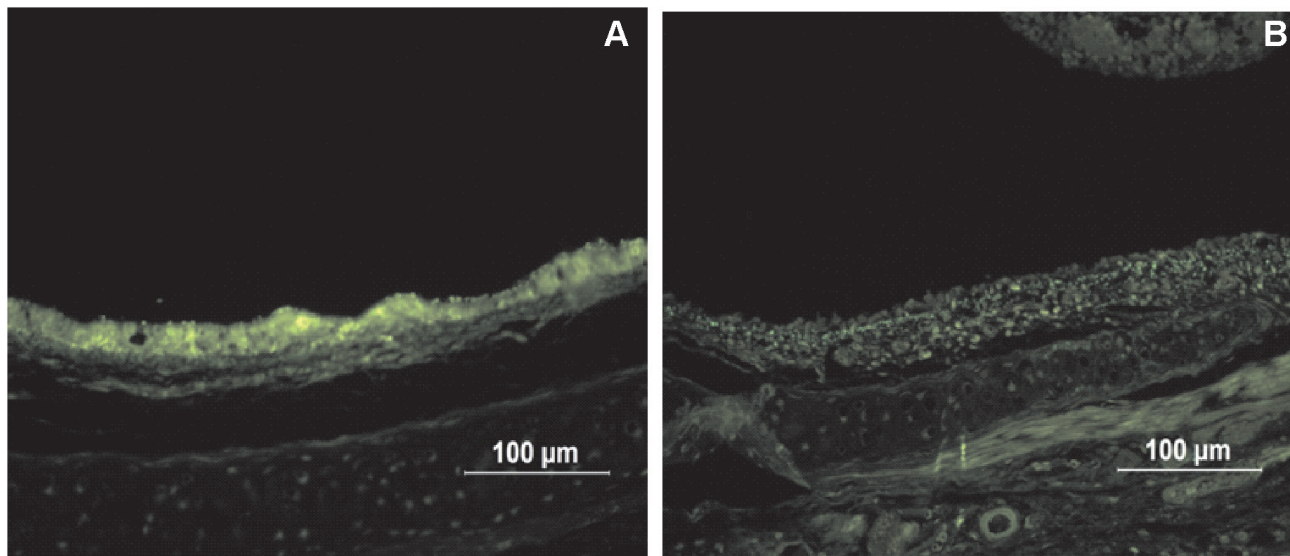


Рис. 2. Распределение FITC-меченого альбумина в респираторном эпителии при его аппликации в трахею:

А — аппликация в нормальный эпителий, В — аппликация в обожженный эпителий. Анализ проводили через 30 минут после аппликации FITC-меченого альбумина.

теля трахеи. Ингаляция препарата, полученного при культивировании МСК, обеспечивает частичную сохранность базальных клеток на поверхности трахеи (рис. 3, В). Сохранившиеся базальные клетки могут, во-видимому, принимать участие в последующей регенерации, дифференцируясь в цилиарные клетки.

Влияние препарата кМСК на подслизистый слой трахеи после HCl-индуцированной травмы

Во время микроскопического исследования тканей трахеи при аппликации препарата кМСК было обнаружено, что в подслизистом слое трахеи образуются замкнутые структуры эпителиальной природы, которые в нормальной ткани не наблюдались. Появляются они в 1-е сут. после ожога при аппликации кМСК, затем их количество увеличивается и достигает максимума на 3-и и 4-е сут. (рис. 4, А). В последующем число структур уменьшается и к 7-м и 8-м сут. обнаружить их в подслизистом слое практически невозможно. Отличительной особенностью структур, выявленных в подслизистом слое является то, что они выстланы клетками с ресничками, которые аналогичны реснитчатым клеткам эпителия (рис. 5). Структуры выстланы клетками по составу схожими с воздухоносным эпителием трахеи. Следует отметить, что такие реснитчатые клетки наблюдались как в больших, так и в маленьких по размеру замкнутых структурах в подслизистом слое.

Для выяснения вопроса, что является предшественником данных структур, были проведены исследования на выявление в подслизистом слое базальных клеток и клеток Клара, которые могут дифференцироваться в другие клетки эпителия. Нам не удалось обнаружить базальные клетки, однако клетки Клара

были довольно широко представлены в подслизистом слое (рис. 6). В то же время в уже сформировавшихся везикулярных структурах клеток Клара не было обнаружено. Мы предполагаем, что клетки Клара являются предшественниками клеток, из которых образуются данные структуры. Как уже отмечалось, максимальное количество замкнутых структур в подслизистом слое эпителия наблюдается на 3-и и 4-е сут. после ожога и аппликации кМСК к концу 7-х сут. они исчезают. В это же время эти структуры обнаруживаются вблизи базальной мембраны с последующим их встраиванием в респираторный эпителий, где формируют новый участок эпителия (рис. 4, С, D). Этот процесс заканчивается к 7-м сут. регенерации эпителия после химического ожога с последующей аппликацией препарата кМСК.

Процесс регенерации эпителия дыхательных путей при остром повреждении зависит от ряда факторов, в том числе от интенсивности воздействия повреждающего фактора, вида патогенного агента и от зоны повреждения (трахея, бронхи, альвеолы). Данные различия вызваны, прежде всего, особенностями анатомического строения разных отделов дыхательных путей. В трахее псевдомногослойный эпителий состоит из реснитчатых клеток (маркерами которых выступают *b-Tubulin* и *Foxj1*), клубных (*club*) клеток или клеток Клара (экспрессируют *Scgb1a1* и *Muc5B*), бокаловидных клеток (маркерами являются *Scg1a1*, *Muc5B*, *Muc5A/C*, *Spdef*) и базальных клеток, экспрессирующих *transformation-related protein 63 (p63)*, цитокератин 5 и/или 14 [9—14]. Между эпителиальным слоем и хрящевой тканью расположены железы, секретирующие слизь в просвет трахеи. Было показано, что эти железы содержат дуктальные клетки,

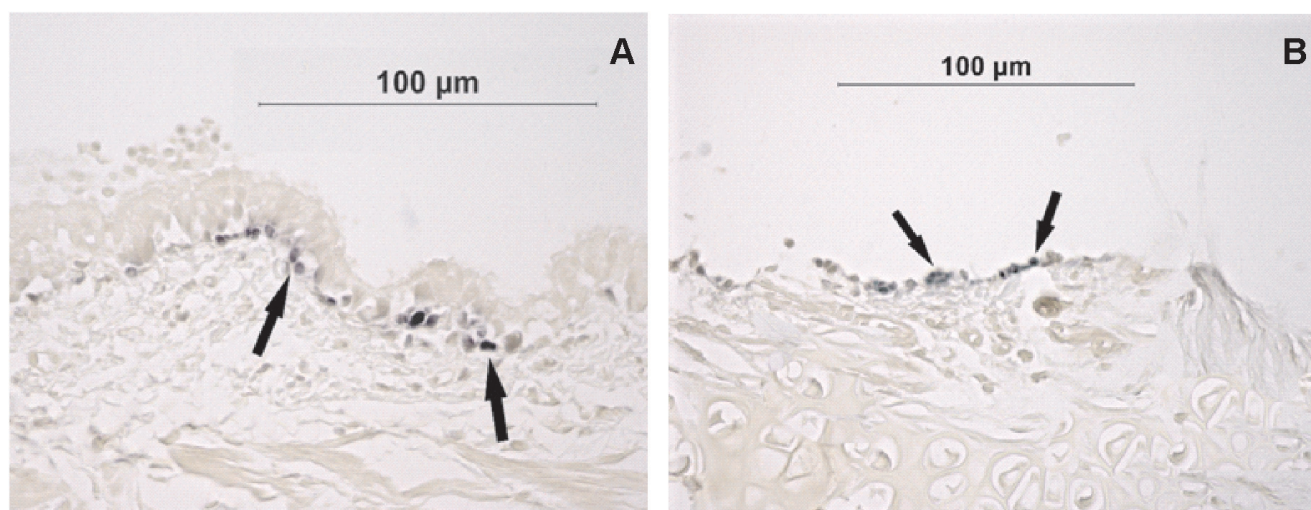


Рис. 3. Локализация базальных клеток: А — интактная трахея; В — трахея через 1 час после ингаляции HCl и аппликации кМСК. Выявление базальных клеток с помощью антител к Krt5. Видна сохранность базальных клеток после ожога.

экспрессирующие цитокератин (Кrt 5 и Кrt 14). Эти клетки обладают способностью восстанавливать все типы клеток и участвуют в регенерации при сильных (фатальных) повреждениях эпителия, вызванных, на-

пример, ишемией или в результате трансплантации трахеи [15—16].

Показано, что при воздействии химических агентов (таких, как SO_2 , HCl , нафталин), происходит

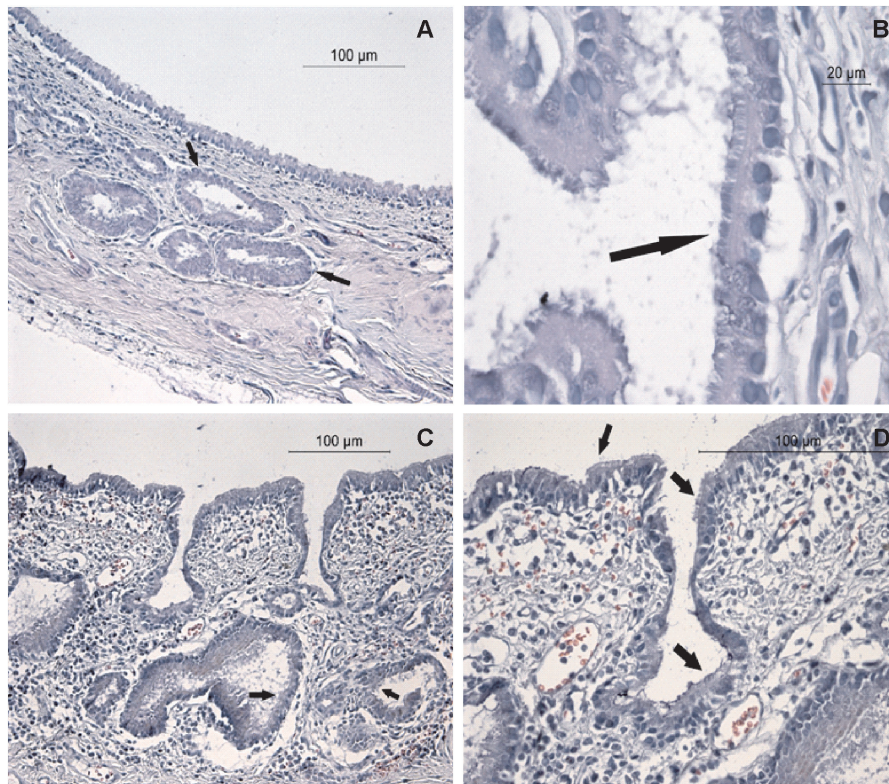


Рис. 4. Появление замкнутых структур в подслизистом слое эпителия трахеи:

А — 3 суток после ингаляции HCl и аппликации препарата КМСК. В — реснитчатый эпителий. Стрелкой показаны реснички на поверхности клетки. С, D — встраивание везикул в эпителиальный слой. Стрелкой показаны реснички на поверхности клетки.

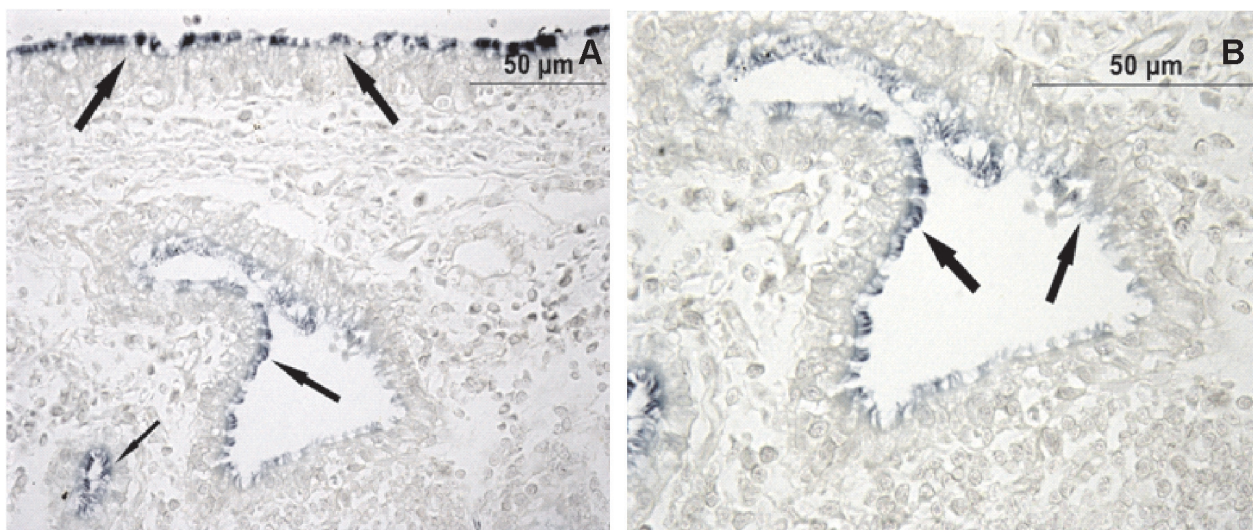


Рис. 5. Выявление реснитчатых клеток в новообразованных замкнутых структурах в подслизистой эпителия трахеи. Выявление реснитчатых клеток с помощью антител к α -тубулину:

А — увеличение $\times 20$; В — увеличение $\times 40$. Стрелкой показаны реснички на поверхности клетки.

повреждение реснитчатого эпителия, но при этом частично сохраняются клубные клетки Клара, базальные клетки, участвующие в процессе регенерации, в результате которой восстанавливаются реснитчатые и бокаловидные клетки (без участия дуктальных стволовых клеток) [11, 17—20].

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что препараты, полученные из культивированных стволовых клеток, проникают через базальную мембрану в подслизистый слой и активируют пролиферацию и дифференцировку дуктальных клеток, в конечном итоге приводя к ускоренной регенерации эпителия, что не типично для такой незначительной степени повреждения, которую вызывает ингаляция HCl в контрольном эксперименте, т.е. без обработки травмы препаратом кМСК.

Роль мезенхимальных стволовых клеток в процессе регенерации эпителия трахеи было показано во многих работах. Так, используя в качестве метки Y-хромосому или GFP, было продемонстрировано, что МСК костного мозга участвуют в восстановлении эпителия проксимальных и дистальных отделов дыхательных путей [22]. Однако степень интернализации МСК в ткань легкого была крайне низкая. По разным данным, она составляет от 1 до 14% [21—22]. Интратрахеальное введение МСК на модели ЛПС-индуцированного повреждения легких у мышей показало, что трансплантированные клетки снижают уровень TNF и MIP-2 и повышают концентрацию ИЛ-10 в лаважной жидкости. Это приводило к статистически значимому повышению выживаемости животных (80% против 42%) и снижению уровня

отека легких. Несмотря на то, что менее 5% МСК задерживается в ткани легкого, их интратрахеальное введение обладает значимым терапевтическим эффектом [22]. Аналогичные данные были получены при внутривенном введении МСК животным с блеомидин-индуцированной легочной недостаточностью [23—24]. Выраженный терапевтический эффект, полученный, несмотря на низкое содержание МСК в ткани легкого (<1%), говорит о преимущественном паракринном механизме действия МСК.

Паракринный механизм воздействия МСК на процесс острого повреждения легкого под действием ЛПС также подтверждается экспериментами с использованием системы Transwell, в которых отсутствовал прямой контакт между альвеолярными макрофагами и МСК. Было показано, что ЛПС индуцирует продукцию МСК факторов, регулирующих синтез провоспалительных цитокинов альвеолярными макрофагами [22].

Следует отметить важную роль ИЛ6, который стимулирует, а ингибиторы STAT3 тормозят регенерацию реснитчатых клеток. Передача сигнала IL6/STAT3 способствует активации генов и увеличивает экспрессию FoxJ1 протеина, являющегося маркером реснитчатых клеток. В то же время ингибирование сигнального пути через STAT3 приводит к увеличению секреторных и базальных клеток. При травме у IL-6 null мышей образуется меньше реснитчатых клеток и больше секреторных клеток [25]. Эффект ускорения регенерации эпителия трахеи у животных после HCl-индуцированной травмы под действием препарата кМСК можно объяснить, по-види-

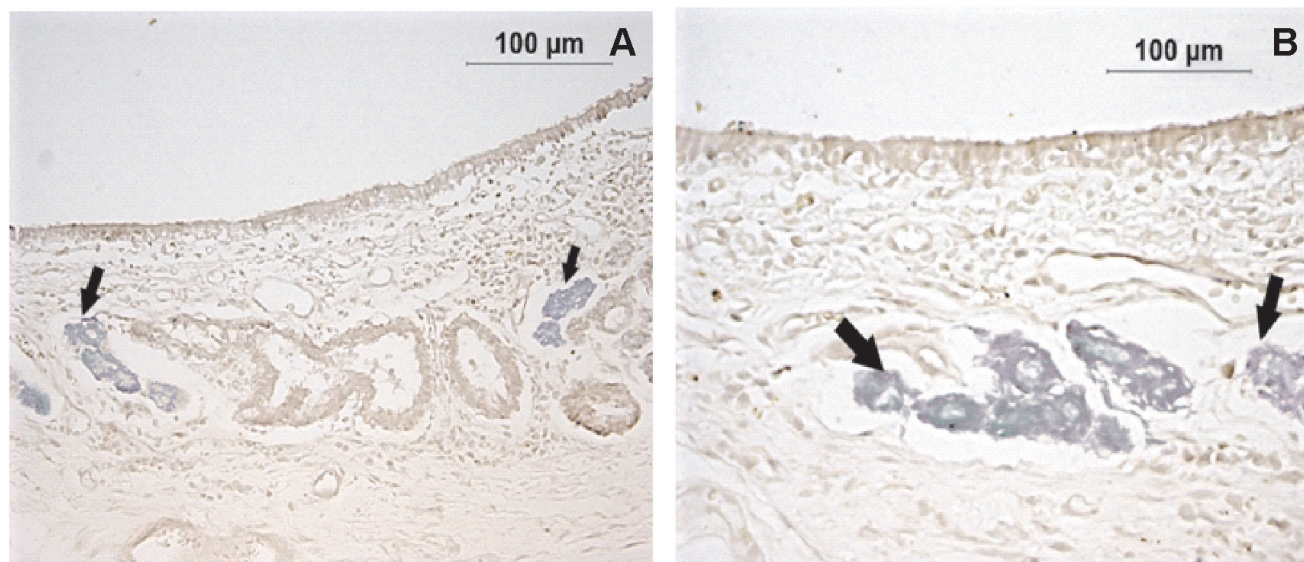


Рис. 6. Выявление клеток Клара в новообразованных замкнутых структурах в подслизистой эпителии трахеи. Выявление клубных клеток с помощью антител к CCSP: А — увеличение x20; В — увеличение x40. Стрелкой показаны клубные клетки.

тому, кроме упомянутого выше эффекта ускорения пролиферации и дифференцировки дуктальных стволовых клеток, также протективным действием цитокинов и ростовых факторов содержащихся в препарате кМСК на поверхностные базальные клетки эпителия трахеи. На наш взгляд, в частности, один из ключевых механизмов защитного эффекта МСК может быть связан с активностью VEGF [26], обладающего антиапоптатическим и противовоспалительным действием. С другой стороны, важное значение может иметь также присутствие ИЛ-6. Данный цитокин при ингаляционном пути введения оказывает противовоспалительный эффект, снижая уровень цитокинов при воспалении легких, вызванном интратрахеальным введением LPS [27].

В проведенных ранее работах, нами было показано, что в процессе культивирования МСК выделяют большое количество паракринных факторов в среду культивирования. Предварительные данные масс-спектрометрии показали наличие в полученной нами кондиционированной среде более 600 биологически активных факторов. При иммуноферментном анализе ряда факторов (VEGF, ИЛ-6, ИЛ-8) было показано, что их концентрация в течение 3 сут. существенно повышается в среде культивирования по сравнению с исходной средой, содержащей 10% ЭТС (VEGF — 1780 пг/мл (2,3 пг/мл); ИЛ-6 — 400 пг/мл (2,7 пг/мл) [28, 29].

Можно предположить, что данное повышение паракринных факторов в кондиционированной среде ускоряет процессы регенерации трахеи как при химической травме, так и при термическом ожоге, что было показано в предыдущих работах [29]. В отличие от контроля (ингаляция исходной среды культивирования с 10% ЭТС), у опытной группы (ингаляция препарата кМСК) в просвете трахеи после термической травмы также наблюдалось преимущественное появление реснитчатых клеток в структурах, возникающих в подслизистом слое [29]. Причиной этого может быть эффект ИЛ-6, действие которого описано в работе Т. Табокоро и соавт. [25].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что паракринные механизмы играют важную роль в процессе регенерации эпителиального слоя трахеи при острой травме. Бесклеточная кондиционированная среда, полученная при культивировании мезенхимальных стволовых клеток, открывает перспективу получения новых препаратов для эффективного лечения острых повреждений респираторного тракта. Доказанная эффективность ингаляционного использования препарата позволяет упростить процедуру его применения, повысить эффективность проникновения действующих факторов в ткани и избежать осложне-

ний, характерных для инвазивных способов введения, например при трансплантации МСК.

References

1. Chu S.J., Chang D.M., Wang D., Lin H.I., Lin S.H., Hsu K. Protective effect of U74500A on phorbol myristate acetate-induced acute lung injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 31(8) (2004), pp523-9.
2. Matthay M.A., Thompson B.T., Read E.J. et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for severe acute lung injury. *Chest.* 138(4) (2010), pp965-72. doi: 10.1378/chest.10-0518.
3. Yilmaz M.Z., Guzel A., Torun A.C. et al. The therapeutic effects of anti-oxidant and anti-inflammatory quercetin on aspiration-induced lung injury in rats. *J Mol Histol.* 45(2) (2014), pp.195-203. doi: 10.1007/s10735-013-9542-3.
4. Jian M.Y., Koizumi T., Tsushima K., Fujimoto K., Kubo K. Effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on acid-induced lung injury in rats. *Inflammation.* 28(6) (2004), pp. 327-36.
5. Jian M.Y., Koizumi T., Tsushima K., Kubo K. JTE-607, a cytokine release blocker, attenuates acid aspiration-induced lung injury in rats. *Eur J Pharmacol.* 19; 488(1-3) (2004), pp. 231-8.
6. Jian M.Y., Koizumi T., Kubo K. Effects of nitric oxide synthase inhibitor on acid aspiration-induced lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 18(1) (2005), pp.33-9.
7. Khubutiya M.S., Vagabov A.V., Temnov A.A., Sklifas A.N. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury. *Cytotherapy.* 16(5) (2014), pp. 579-85. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.07.017.
8. Yagi H., Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N. et al. Reactive bone marrow stromal cells attenuate systemic inflammation via sTNFR1. *Mol Ther.* 18(10) (2010), pp. 1857-64. doi: 10.1038/mt.2010.155.
9. Evans M.J., Van Winkle L.S., Fanucchi M.V., Plopper C.G. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Exp Lung Res.* 27(5) (2001), pp. 401-15.
10. Zhu Y., Ehre C., Abdullah L.H. et al. Munc13-2/-/- baseline secretion defect reveals source of oligomeric mucins in mouse airways. *J Physiol.* 1;586(Pt 7) (2008), pp.1977-92. doi: 10.1113/jphysiol.2007.149310.
11. Rock J.R., Onaitis M.W., Rawlins E.L. et al.: Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 4;106(31) (2009), pp.12771-5. doi: 10.1073/pnas.0906850106.
12. Blatt E.N., Yan X.H., Wuerffel M.K., Hamilos D.L., Brody S.L. Forkhead transcription factor HFH-4 expression is temporally related to ciliogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21(2) (1999), pp.168-76.
13. You Y., Huang T., Richer E.J. et al. Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286(4) (2004), pp. 650-657.
14. Volckaert T., De Langhe S. Lung epithelial stem cells and their niches: Fgf10 takes center stage. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 8;7 (2014):8. doi: 10.1186/1755-1536-7-8.
15. Hegab A.E., Ha V.L., Gilbert J.L. et al. Novel stem/progenitor cell population from murine tracheal sub-

mucosal gland ducts with multipotent regenerative potential. *Stem Cells*. 29(8)(2011), pp. 1283-93. doi: 10.1002/stem.680.

16. Hegab A.E., Nickerson D.W., Ha V.L., Darmawan D.O., Gomperts B.N. Repair and regeneration of tracheal surface epithelium and submucosal glands in a mouse model of hypoxic-ischemic injury. *Respirology*. 17(7)(2012), pp. 1101-13. doi: 10.1111/j.1440-1843.2012.02204.x.

17. Reynolds S.D., Giangreco A., Power J.H., Stripp B.R. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol*. 156(1)(2000), pp.269-78.

18. Reynolds S.D., Hong K.U., Giangreco A. et al. Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 278(6)(2000), pp. 1256-63.

19. Giangreco A., Reynolds S.D., Stripp B.R. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol*. 161(1)(2002), pp. 173-82.

20. Hsu H.S., Liu C.C., Lin J.H., Hsu T.W., Su K., Hung S.C.: Repair of naphthalene-induced acute tracheal injury by basal cells depends on β -catenin. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 148(1)(2014), pp. 322-32. doi: 10.1016/j.jtcvs.2013.10.039.

21. Theise ND, Henegariu O, Grove J et al.: Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. *Exp Hematol*. 30(11)(2002), pp. 1333-8.

22. Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates en-

dotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol*. 179(3)(2007), pp.:1855-63.

23. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(14)(2003), pp. 8407-11.

24. Rojas M, Xu J, Woods CR et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 33(2)(2005), pp.145-52.

25. Tadokoro T, Wang Y, Barak LS, Bai Y, Randell SH, Hogan BL. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(35)(2014), pp.3641-9. doi: 10.1073/pnas.1409781111

26. Kagiwada H, Yashiki T, Ohshima A, Tadokoro M, Nagaya N, Ohgushi H. : Human mesenchymal stem cells as a stable source of VEGF-producing cells. *J.Tissue Eng Regen Med*. 2(4)(2008), pp. 184-9. doi: 10.1002/term.79.

27. Bhargava R, Janssen W, Altmann C et al. Intratracheal IL-6 protects against lung inflammation in direct, but not indirect, causes of acute lung injury in mice. *PLoS One*. 8;8(5)(2013), e61405. doi: 10.1371/journal.pone.0061405.

28. M.S.Khubutiya, K.A.Rogov, Y.A.Zhgutov et al. Effect of cultivation conditions bone marrow stem cells to effectively treat acute liver failure in the experiment. *Clinical and experimental morphology*. 2016, 3(19), p.46-54 (in Russian)

29. Temnov AA, Vagabov AV, Sklifas AN et al. The role of mesenchymal stromal cells in the repair of acute organ injury. In Book «The Biology and Therapeutic Application of Mesenchymal Cells» by edited Kerry Atkinson. Published Online: 26 NOV 2016, DOI: 10.1002/9781118907474.ch35

Сведения об авторах:

Волкова Анастасия Геннадьевна, аспирант, Институт биофизики клетки РАН

Мелерзанов Александр Викторович, канд. мед. наук, научный руководитель лаб. клеточных и молекулярных технологий, декан ФБМФ МФТИ

Новоселов Владимир Иванович, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., Институт биофизики клетки РАН

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-005.6

Шкорик Е.В.¹, Маркелова Е.В.¹, Силаев А.А.², Гельцер Б.И.³, Семенихин А.А.¹, Федянина Л.Н.³

Матриксные металлопротеиназы-1, -8, -9 и риск развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с ИБС до и после реваскуляризации миокарда

¹ ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 690002, г. Владивосток, Россия, просп. Острякова, д. 2

² ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, 664003, г. Иркутск, Россия, Красного Восстания, д. 1

³ ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» Министерства Образования и науки Российской Федерации, 690950, г. Владивосток, Россия, ул. Суханова, д. 8

До сих пор существует потребность в поиске биомаркеров для раннего прогнозирования и диагностики сердечно-сосудистых осложнений (ССО) у пациентов с ИБС. **Цель** — определение роли матриксных металлопротеиназ (ММП-1, 8, 9) в риске развития ССО у пациентов с ИБС до и после аортокоронарного шунтирования (АКШ). **Методика.** В исследование включены 75 больных с ИБС до и после реваскуляризации миокарда методом АКШ, из них 40 мужчин и 35 женщин в возрасте от 45 до 74 лет. Пациенты были разделены на 2 группы: I группа — 25 больных с зарегистрированными ССО после АКШ (острый инфаркт миокарда, ишемический инсульт, тромбоэмболия легочных ветвей); II группа — 50 больных с ИБС без осложнений после реваскуляризации миокарда. Забор крови осуществлялся за сутки до операции, в 1-е, 3-и и 10-е сутки после АКШ. Определение уровня ММП-1, -8, -9 проводилось в сыворотке крови методом твердофазного ИФА, с использованием специфических реактивов «RD Diagnostics Inc.», USA. Результаты выражали в нг/мл. Данные представляли в виде медианы и двух квартилей (Me, Q₂₅, Q₇₅). Внутри и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна—Уитни, коэффициента корреляции Спирмена и критерия χ^2 в рамках прикладной программы SPSS №16. Статистически значимыми считали различия между показателями при отклонении нулевой гипотезы и уровне значимости $p < 0,05$. **Результаты.** Выявлено статистически значимое повышение концентрации ММП-1 и ММП-8 у больных в I группе. Не выявлено значимой динамики ММП-9 у пациентов после реваскуляризации миокарда. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что уровень ММП-1 2,5 нг/мл и более у пациентов с ИБС является диагностическим критерием риска возникновения ТЭ осложнений. Не установлено связи между повышенным содержанием ММП-8 и наличием осложнений у пациентов после операции. Не выявлено значимой динамики ММП-9 у пациентов после реваскуляризации миокарда.

Ключевые слова: матриксная металлопротеиназа; сердечно-сосудистые осложнения.

Для цитирования: Шкорик Е.В., Маркелова Е.В., Силаев А.А., Гельцер Б.И., Семенихин А.А., Федянина Л.Н. Матриксные металлопротеиназы -1, -8, -9 и риск развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с ИБС до и после реваскуляризации миокарда. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 37—45.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.37-45

Для корреспонденции: Шкорик Елена Валерьевна, аспирант каф. нормальной и патологической физиологии человека ФГБОУ ВО ТГМУ г. Владивостока, врач анестезиолог-реаниматолог ФГАУ ВО Медицинского центра ДВФУ г. Владивостока, e-mail: shkorikev@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.12.2016

Shkorik E.V.¹, Markelova E.V.¹, Geltser B.I.³, Silaev A.A.², Semnikhin A.A.¹, Fedjanina L.N.³

Matrix metalloproteinase-1, -8, -9 and the risk of cardiovascular complications in patients with CHD before and after myocardial revascularization

¹ FGBOU IN «Vladivostok State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Vladivostok (690002, Vladivostok, prospect Ostryakova 2)

² FGBOU IN «Irkutsk State Medical University» of the Ministry of Health of Russian Federation, Irkutsk (664003, Irkutsk, Red 1 Uprising)

³ FGAOU IN «Far Eastern Federal University» of the Ministry of Education and science of the Russian Federation, Vladivostok (690950, Vladivostok, ul. Sukhanova 8)

There is still a great need for detection of biomarkers for early prediction and diagnosis of cardiovascular complications (CVC) in patients with CHD. Objective: To determine the role of MMP-1, 8, 9 in the risk of CCO in patients with CHD before and after coronary artery bypass grafting (CABG). Methods. The study included 75 patients with coronary heart dis-

ease before and after myocardial revascularization by CABG, including 40 men and 35 women aged from 45 to 74 years. Patients were divided into two groups: I group — 25 patients with CVC registered after CABG (acute myocardial infarction, ischemic stroke, pulmonary thromboembolism Branch); II group — 50 patients with coronary heart disease without complications after myocardial revascularization. Blood sampling was performed the day before surgery, on the 1st, 3rd and 10th days after CABG. Determining the level of MMP-1, 8, 9 in the serum was performed by ELISA using reagents specific «RD Diagnostics Inc.», USA. Results are expressed in ng/ml. Data are presented as medians and quartiles of two (Me, Q25, Q75). Within and between-group differences were evaluated using the Mann — Whitney, Spearman correlation coefficient and χ^2 test within the application program SPSS №16. Statistically significant differences between the indicators considered when you reject the null hypothesis and significance level of $p < 0,05$. Results. A statistically increased concentration of MMP-1 and MMP-8 in patients in group I. Undetermined significant dynamics of MMP-9 in patients after myocardial revascularization. Conclusion. The results indicate that the level of MMP-1, 2.5 ng/ml or more in patients with CAD is a diagnostic criterion for the risk of TE complications. No association between high content of MMP-8 and the presence of complications in patients after surgery. There were no significant dynamics of MMP-9 in patients after myocardial revascularization.

Keywords: matrix metalloproteinase; cardiovascular complications.

For citation: Shkorik E.V., Markelova E.V., Silaev A.A., Geltser B.I., Semehin A.A. Fedyanina L.N. Matrix metalloproteinase -1, -8, -9 and risk of cardiovascular events in patients with coronary heart disease before and after myocardial revascularization. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(2): 37—45 (In Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.37-45

For correspondence: Shkorik Elena V., graduate student of normal and pathological human physiology FGBOU IN TSMU Vladivostok, anesthesiologist-intensivist FGAOU IN Medical Center, Far Eastern Federal University in Vladivostok, 690002, Russian Federation, e-mail: shkorikev@mail.ru

Information about authors:

Shkorik E.V. <http://orcid.org/0000-0001-8969-6777>

Markelova E.V. <http://orcid.org/0000-0001-5846-851X>

Silaev A.A. <http://orcid.org/0000-0001-7663-4768>

Geltser B.I. <http://orcid.org/0000-0002-9250-557X>

Semehin A.A. <http://orcid.org/0000-0002-2201-3967>

Fedyanina L.N. <http://orcid.org/0000-0002-9849-8358>

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

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received 15.12.2016

Введение

Несмотря на высокий уровень развития кардиологии, сердечно-сосудистые (СС) заболевания остаются основной причиной смертности населения во всем мире [1—5]. Основной задачей в лечении данной группы пациентов являются диагностика, лечение и снижение риска развития тромботических осложнений [3]. Матричные металлопротеиназы (ММП) играют важную роль в воспалительных процессах. В настоящее время получило широкое признание утверждение, что развитие и разрыв уязвимой бляшки участвует в возникновении острого коронарного синдрома (ОКС). ММП-1 является одним из членов семейства ММП и вырабатывается несколькими типами клеток, в том числе эндотелиальными клетками атеросклеротических бляшек. Некоторые авторы предполагают, что ММП-1 может играть ключевую роль в разрыве уязвимой бляшки [6], ММП-8, по мнению авторов, связана с прогрессированием роста атеросклеротических бляшек [7].

В миокарде человека идентифицировано 6 представителей ферментов семейства ММП (ММП-1, 2, 3, 9, 13, 14) [8]. Однако, исследования проводятся в основном в отношении ММП-1, 2, 9, но и для них окончательно не установлена роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний.

Существует потребность в поиске биомаркеров для раннего прогнозирования и диагностики СС осложнений (ОКС и ишемический инсульт (ИИ)) у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС).

Цель — определение роли ММП-1, 8, 9 в риске развития СС осложнений у пациентов с ИБС до и после аортокоронарного шунтирования (АКШ).

Методика

В исследовании включены 75 больных с ИБС до и после реваскуляризации миокарда методом аорто-коронарного шунтирования (АКШ), из них 40 мужчин и 35 женщин в возрасте от 45 до 74 лет. Пациенты после АКШ были разделены на 2 основные группы:

I группа — 25 больных с зарегистрированными СС осложнениями после реваскуляризации миокарда (острый инфаркт миокарда (ОИМ), ишемический инсульт (ИИ), тромбоэмболия ветвей легочных артерий (ТЭ)); II группа — 50 больных с ИБС без осложнений после реваскуляризации миокарда.

Пациенты обеих групп были разделены в зависимости от пола, возраста, функционального класса (ФК) стенокардии напряжения, наличия или отсутствия постинфарктного кардиосклероза (ПИКС), наличия и срока давности инфаркта миокарда (ИМ) в анамнезе заболевания (до 6 мес, от 6 до 12 мес. и более), длительности искусственного кровообращения (ИК) (менее/более 90 мин). Группу контроля составили 30 здоровых доноров, сопоставимых по возрасту и полу.

Забор крови осуществлялся за сутки до операции, в 1-е, 3-и и 10-е сут. после АКШ. Сыворотку крови получали центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин, образцы разливали по 1,0 мл и хранили при -36°C . Определение уровня ММП-1, -8, -9 проводилось в сыворотке крови методом твердофазного ИФА, с использованием реактивов «RD Diagnostics Inc.», USA. Результаты выражали в нг/мл. Данные представляли в виде медианы и двух квартилей (Me, Q_{25} , Q_{75}). Внутри- и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна—Уитни, коэффициента корреляции Спирмена и критерия χ^2 в рамках прикладной программы SPSS №16. Статистически значимыми считали различия между показателями при отклонении нулевой гипотезы и уровне значимости $p < 0,05$. Для исследования значимости

изменения уровня ММП-1 и выбора оптимального значения для прогнозирования развития тромбоэмболических (ТЭ) осложнений у больных с ИБС после АКШ, вычисляли площадь, ограниченную ROC-кривой и осью доли ложных положительных классификаций (AUC), при помощи пакета программ Graph Pad Prism 4.00 for Windows (Graph Pad Prism Software Inc., США).

Результаты и обсуждение

Результаты динамики уровня ММП-1, -8, -9 у больных с ИБС в сравнении с группой здоровых добровольцев представлены в табл. 1. ММП-1 была повышена до операции в 1,3 раза, в 1-е и 3-и сут. ее уровень соответствовал референсному значению, а на 10-е сут. после АКШ определено повторное существенное ее увеличение. Концентрация ММП-8 в 1-е сут. после операции не отличалась от референсного значения, на 3-и сутки выявлено максимальное ее значение в сравнении с группой контроля, далее на 10-е сут. ее уровень снижался, но оставался статистически значимо более высоким в сравнении с референсным показателем. Дооперационное содержание ММП-8 было самым низким в сравнении с здоровыми людьми и с ее концентрацией в послеоперационном периоде на протяжении всего мониторинга. Дооперационный уровень ММП-9 у больных с ИБС был значимо ниже, чем в группе контроля, далее ее содержание после операции в динамике на протяжении всех сроков наблюдения соответствовало контролю (табл. 1).

Таблица 1

Содержание матричных металлопротеиназ в сыворотке крови обследованных пациентов с ИБС до и после АКШ и контрольной групп

№	Показатели (Me; Q_{25} ; Q_{75})	Больные с ИБС до и после АКШ (n = 75)	Группа контроля (n = 30)
1	ММП-1 (нг/мл) до АКШ	2,72* (1,8; 3,48) $p_1 < 0,05$	1,1 (0,56; 3,3)
	1-е сутки после АКШ	1,9 (1,63; 2,56)	
	3-и сутки после АКШ	1,84 (0,9; 2,67)	
	10-е сутки	3,7*** (2,86; 5,94) $p_{5,6} < 0,001$	
2	ММП-8 (нг/мл) до АКШ	9,34*** (6,3; 16,7) $p_{1,2,3} < 0,001$	20,35 (20,08; 25,6)
	1-е сутки после АКШ	24,8 (11,9; 36,73)	
	3-и сутки после АКШ	33,0*** (22,3; 43,7)	
	10-е сутки	27,74* (12,08; 41,17)	
3	ММП-9 (нг/мл) до АКШ	222,72* (136,73; 319,2)	336,7 (229,69; 396,5)
	1-е сутки после АКШ	279,47 (227,13; 376,5)	
	3-и сутки после АКШ	377,93 (184,4; 468,7)	
	10-е сутки	348,8 (269,1; 467,6)	

Примечание. Статистическая значимость различий показателей с группой контроля: $p < 0,05$ — *; $p < 0,01$ — **; $p < 0,001$ — ***; статистическая значимость различий показателей в динамике: p_1 (до АКШ — 1-е сут.); p_2 (до АКШ — 3-и сут.); p_3 (до АКШ — 10-е сут.); p_4 (1-3-и сут.); p_5 (1-10-е сут.); p_6 (3-10-е сут.).

У больных обоего пола и возрастов сравнении с здоровыми людьми ММП-1 была повышена только на 10-е сут. после АКШ, до этого ее концентрация соответствовала референсному значению. У лиц среднего возраста (44—59 лет) и мужского пола ММП-1 на 10-е сут. была увеличена в 2,5 раза (3,5 (3,43; 7,34) нг/мл при $p < 0,05$ и 3,51 (2,9; 4,36) нг/мл при $p < 0,01$ в сравнении с 1,1 (0,56; 3,3) нг/мл), а у пациентов 60—74 лет и женского пола — в 3,5 раза (3,9 (3,0; 5,95) нг/мл при $p < 0,001$ и 5,59 (3,73; 4,36) нг/мл при $p < 0,05$).

Концентрация ММП-8, как у больных различного возраста, так и обоих полов, была понижена в 1,5 раза до реваскуляризации в сравнении с здоровыми людьми ($p < 0,01$). Далее у пациентов женского пола в 1-е и 3-и сут. уровень ММП-8 повышался в 1,5 раза (28,5 (26,96; 39,12) нг/мл и 32,34 (20,07; 46,93) нг/мл в сравнении с 20,35 (20,08; 25,6) нг/мл при $p < 0,05$) и на 10-е сут. достигал показателя группы контроля. Тогда как, у мужчин ее концентрация была увеличена в сравнении с здоровыми людьми только на 10-е сут. после АКШ (26,33 (12,15; 40,54) нг/мл при $p < 0,05$).

У пациентов старшего возраста после АКШ на 3-и сут. зафиксирована гиперпродукция ММП-8 в сравнении с группой контроля (33,8 (22,3; 43,87) нг/мл против 20,35 (20,08; 25,6) нг/мл при $p < 0,001$). Других статистически значимых различий у пациентов в зависимости от возраста не выявлено.

Уровень ММП-9 у пациентов женского пола был понижен в 1,5—2 раза до операции (167,4 (142,9; 330,8) нг/мл против 336,7 (229,7; 396,5) нг/мл при $p < 0,05$), на протяжении дальнейшего мониторинга не установлено значимых различий у пациентов различного возраста и пола в сравнении с группой здоровых добровольцев и между подгруппами.

Содержание ММП-1 у больных с ИБС было повышено до АКШ, затем снижалось до уровня здоровых людей и повторно возрастало на 10-е сут. после операции (табл. 1). ММП-1 является интерстициальной коллагеназой, которая считается основным ферментом, ответственным за деградацию коллагена [9]. ММП-1, в первую очередь, обнаруживается в атеросклеротических бляшках и в клетках в области нестабильных уязвимых бляшек и чем выше ее уровень, тем выше риск разрыва атеросклеротической бляшки и возникновения ОКС. Была установлена гиперпродукция ММП-1 на 10-е сутки после реваскуляризации у лиц старшего возраста.

При распределении пациентов на 2 исследуемые группы в зависимости от наличия или отсутствия осложнений в послеоперационном периоде, были получены следующие результаты: в I группе с ТЭ осложнениями (табл. 2) концентрация ММП-1 на протяжении всего мониторинга была статистически значимо повышена в сравнении с группой контроля и ее уровень до АКШ и на 3-и сут. после операции был значимо выше, чем во II группе пациентов с ИБС со стабильным течением послеоперационного

Таблица 2

Содержание матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови обследованных пациентов с ИБС до и после АКШ и контрольной группах

№	Показатели (Me; Q ₂₅ ; Q ₇₅) нг/мл	I группа (n = 25)	II группа (n = 50)	Группа контроля (n = 30)
1	ММП-1 до АКШ	4,35*** (3,5; 7,5)	2,24* (1,5; 4,2)	1,1 (0,56; 3,3)
	1-е сутки после АКШ	2,78* (2,3; 7,96)	2,06 (1,22; 4,75)	
	3-и сутки	3,98** (2,95; 9,5)	2,0 (1,25; 3,88)	
	10-е сутки	3,27** (3,14; 4,5)	3,98** (3,08; 7,07)	
2	ММП-8 до АКШ	14,65** (12,84; 27,5)	6,83* (6,29; 17,65)	20,35 (20,08; 25,16)
	1-е сутки после АКШ	16,59 (6,2; 45,48)	27,47 (15,46; 36,73) $p_1 < 0,05$	
	3-и сутки	36,17* (32,47; 51,23) $p_2 < 0,001$	19,95 (18,57; 31,17) $p_2 < 0,05$	
	10-е сутки	32,39* (28,89; 41,69) $p_3 < 0,001$	16,3 (12,49; 40,15) $p_3 < 0,05$	
3	ММП-9 до АКШ	144,7* (133,35; 374,4)	222,72 (136,73; 319,19)	336,71 (229,69; 396,5)
	1-е сутки после АКШ	284,04 (107,23; 476,89)	279,47 (227,13; 376,51)	
	3-и сутки	353,14 (190,2; 562,8)	377,93 (184,4; 468,7)	
	10-е сутки	384,03 (295,9; 605,7)	348,8 (269,1; 467,55)	

Примечание. Статистическая значимость различий показателей с группой контроля: $p < 0,05$ — *; $p < 0,01$ — **; $p < 0,001$ — ***; статистическая значимость различий показателей между I и II группами: $p < 0,05$ — #; $p < 0,01$ — ##; $p < 0,001$ — ###; статистическая значимость различий показателей в динамике: p_1 (до АКШ-1-е сут.); p_2 (до АКШ-3-и сут.); p_3 (до АКШ-10-е сут.); p_4 (1-3-и сут.); p_5 (1-10-е сут.); p_6 (3-10-е сут.).

периода. Уровень ММП-1 во II группе был статистически значимо повышен только в сравнении с референсным значением до операции и на 10-е сут. после АКШ.

Предыдущие исследования показали, что высокие уровни ММП-1 у пациентов с ИБС, могут быть связаны с наличием нестабильных бляшек в коронарных артериях. Кроме того, концентрация ММП-1 в сыворотке крови положительно ассоциируется с некальцинированным поражением коронарных артерий, которые в первую очередь были обнаружены у больных с ОКС и нестабильной стенокардией [10, 11].

Показано, что тромбоциты покрывают ММП-1, которая в свою очередь, приводит к активации самих тромбоцитов [12]. Таким образом, ММП-1 может играть патогенную роль в развитии атеросклероза и его осложнений с помощью двух разных, но дополняющих друг друга, механизмов, а именно — деградации матрицы в стенке сосуда и тромбин-независимого влияния и активации тромбоцитов [12]. Нами был выявлен статистически значимо повышенный уровень ММП-1 у больных с ТЭ осложнениями на протяжении всего исследования, а его предоперационная концентрация была выше, чем у пациентов со стабильным течением в послеоперационном периоде во II группе, что может являться диагностическим показателем для больных с риском возникновения ТЭ осложнений. Нами зарегистрирована статистически значимая связь между повышенной концентрацией ММП-1 (более 2,5 нг/мл) и возникновением тромбоэмболических осложнений при $p < 0,05$, $\chi^2 = 4,8$.

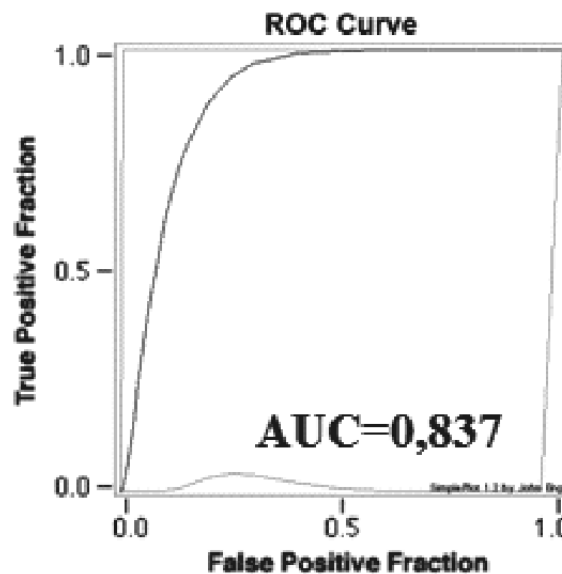
Обнаруженное увеличение уровня ММП-1 в сыворотке крови пациентов с зарегистрированными ТЭ осложнениями в послеоперационном периоде позволили поставить вопрос об исследовании значимости определения данного маркера как предиктора развития вышеуказанных осложнений в клинике с использованием ROC-анализа. Определяли площадь, ограниченную ROC-кривой и осью доли ложных положительных классификаций (AUC). Выявлено, что AUC соответствует 0,837, что свидетельствует о достаточно высоком качестве предлагаемого диагностического признака (рисунок).

В I группе уровень ММП-8 был существенно повышен в сравнении с группой контроля (табл. 2) на 3-и и 10-е сут. после операции, а его дооперационное содержание было значимо более низким в сравнении с здоровыми людьми, но статистически значимо более высоким в сравнении со II исследуемой группой. Во II группе (табл. 2) зарегистрирован лишь значимо пониженный уровень ММП-8 до реваскуляризации в сравнении с группой здоровых добровольцев ($p < 0,05$).

ММП-8, также известная как коллагеназа-2 или нейтрофильная коллагеназа, связана с воспалительными состояниями. Она содержится в основном в нейтрофилах, эндотелиальных и гладкомышечных клетках, в макрофагах в атеросклеротических поражениях [13]. По данным авторов, апоптоз эндотелиальных клеток и высвобождение ММП-8 способствуют превращению стабильных поражений в нестабильные и может приводить к разрыву бляшки, повышенные уровни ММП-8 были обнаружены в уязвимых бляшках, склонных к разрыву. А инактивация ММП-8 приводит к существенному снижению степени атеросклероза, с уменьшением числа макрофагов и увеличением содержания коллагена в атеросклеротических поражениях [14]. Нами было выявлено повышенное содержание ММП-8 у больных в группе с ТЭ осложнениями. Однако анализ связи между повышенным содержанием ММП-8 и наличием ТЭ осложнений у пациентов с ИБС после АКШ, не подтвердил этого ($\chi^2 = 0,53$; $p > 0,05 < 0,25$).

При анализе уровня ММП-9 у больных обеих исследуемых групп, была установлена низкая ее концентрация в сравнении с здоровыми людьми в I группе до АКШ, далее ее значение достигало референсных величин.

При разделении исследуемых групп на подгруппы, у больных в зависимости от давности ИМ (табл. 3), в I группе в подгруппе с ИМ до 6 мес. концентрация ММП-1 была статистически значимо более высокой в сравнении с здоровыми людьми на протяжении всего мониторинга, а у больных с



ROC-анализ показателей экспрессии ММП-1 у пациентов с ИБС и ТЭ осложнениями после реваскуляризации миокарда методом АКШ.

ИМ от 6 до 12 мес. в ее содержание соответствовало значениям у здоровых людей. Во II группе в сравнении с группой контроля ММП-1 у больных с ИМ до 6 мес. была существенно повышена до операции и на 10-е сут. достигала ее предоперационного показателя, а у пациентов с ИМ от 6 до 12 мес. — только на 10-е сут. после реваскуляризации определено ее увеличение в 3-4 раза, до этого значение ММП-1 соответствовало референсной величине (табл. 3).

У больных с ИМ до 6 мес. в I группе дооперационная концентрация ММП-8 была понижена в 1,7 раза в сравнении с группой контроля, а в остальные исследуемые сроки после операции увеличивалась в 1,5 раза. В подгруппе с ИМ от 6 до 12 мес. уровень ММП-8 был статистически значимо повышен в сравнении с здоровыми людьми только на 3-и сут. после операции, а на протяжении дальнейшего наблюдения достигала уровня здоровых добровольцев. Во II группе у пациентов с ИМ до 6 мес. статистически значимо повышенная ММП-8 в сравне-

нии с группой контроля выявлена только на 3-и сут. после АКШ. У пациентов в подгруппе с ИМ от 6 до 12 мес. дооперационный уровень ММП-8 был двукратно ниже в сравнении с группой контроля, а на 3-и и 10-е сут. после АКШ ее уровень повышался в 1,5 раза. Концентрация ММП-9 на протяжении всего мониторинга в зависимости от давности развития ИМ (табл. 3) изменялась мало и соответствовала референсному значению.

У больных в зависимости от степени ФК стенокардии, в I группе у пациентов с III ФК до операции и в 1-е сут. после АКШ уровень ММП-1 достигал референсного значения, далее на 3-и сут. повышался двукратно (2,72 (2,15; 4,26) нг/мл ($p < 0,05$) против 1,1 (0,56; 3,3) нг/мл) и на 10-е сут. был выше в 3 раза (3,93 (2,75; 5,87) нг/мл ($p < 0,01$) в сравнении с здоровыми людьми. В подгруппе с II ФК в I группе ММП-1 была статистически значимо повышена только на 10-е сут. после реваскуляризации в сравнении с группой контроля (3,67 (2,63; 5,2) нг/мл ($p < 0,01$)).

Таблица 3

Содержание матричных металлопротеиназ в сыворотке крови у больных с ИБС до и после АКШ в зависимости от давности ИМ

	Показатели (Ме; Q ₂₅ ; Q ₇₅) нг/мл	I группа (n = 25)		II группа (n = 50)	
		ИМ до 6 мес. (n = 14)	ИМ от 6 до 12 мес. (n = 11)	ИМ до 6 мес. (n = 28)	ИМ от 6 до 12 мес. (n = 22)
1	ММП-1 до АКШ	4,1** (3,4; 6,15)	2,8 (2,14; 4,78)	3,2* (2,49; 5,14)	2,14 (1,76; 3,32)
	1-е сутки после АКШ	3,8** (3,2; 5,93)	2,92 (2,44; 3,74)	2,43 (1,98; 2,56)	2,39 (1,73; 3,36)
	3-и сутки	3,2* (2,7; 5,54)	2,42 (1,98; 3,85)	2,2 (1,07; 2,8)	1,7 (1,42; 2,5)
	10-е сутки	3,8** (3,12; 5,86)	2,96 (1,82; 3,64)	3,21* (2,95; 5,06)	3,98*** (3,12; 5,6) p _{3,5,6} < 0,05
2	ММП-8 до АКШ	11,3* (7,8; 15,64)	18,3 (16,34; 24,2)	16,34 (16,23; 22,56)	8,56* (6,3; 23,85)
	1-е сутки после АКШ	28,53* (19,72; 41,34) p ₁ < 0,05	26,64 (22,43; 37,8)	24,12 (12,2; 36,6)	30,6 (11,85; 36,74)
	3-и сутки	38,64* (28,62; 44,73) p ₂ < 0,01	28,72* (19,83; 36,53)	35,36* (27,73; 46,93) p ₂ < 0,01	27,57* (18,6; 46,8) p ₂ < 0,05
	10-е сутки	35,64* (27,64; 42,44) p ₃ < 0,01	23,5 (17,64; 28,63)	26,46 (26,3; 53,94)	37,98* (17,87; 41,7) p ₃ < 0,05
3	ММП-9 до АКШ	289,63 (221,7; 382,12)	245,9 (176,2; 293,14)	244,43 (184,8; 391,04)	269,18 (156,2; 358,45)
	1-е сутки после АКШ	315,18 (268,6; 367,92)	293,43 (214,08; 376,68)	251,93 (239,9; 394,42)	279,5 (227,13; 370,5)
	3-и сутки	387,18 (312,5; 435,9)	337,4 (276,8; 383,72)	407,3 (395,7; 479,8)	365,41 (209,8; 393,85)
	12-е сутки	362,82 (287,34; 433,76)	312,8 (286,5; 393,87)	344,13 (315,4; 329,83)	305,06 (269,1; 412,6)

Примечание. Статистическая значимость различий показателей с группой контроля: p < 0,05 — *; p < 0,01 — **; p < 0,001 — ***; статистическая значимость различий показателей между I и II группами: p < 0,05 — #; p < 0,01 — ##; p < 0,001 — ###; — статистическая значимость различий показателей с исследуемой подгруппой больных: p < 0,05 — °; p < 0,01 — °°; p < 0,001 — °°°; статистическая значимость различий показателей в динамике: p₁ (до АКШ-1-е сут.); p₂ (до АКШ-3-и сут.); p₃ (до АКШ-10-е сут.); p₄ (1-3-и сут.); p₅ (1-10-е сут.); p₆ (3-10-е сут.).

Во II группе в подгруппах с II и III ФК концентрация ММП-1 соответствовала референсному значению до 3-х исследуемых суток. На 10-е сут. она была увеличена в 3—4 раза в сравнении с группой контроля (3,7 (3,46; 5,06) нг/мл и 4,5 (3,27; 6,9) нг/мл ($p < 0,01$).

Уровень ММП-8 в I группе у пациентов с III ФК до операции был понижен в 2 раза (10,56 (8,76; 18,75) нг/мл ($p < 0,05$), далее в 1-е сут. соответствовал референсному значению, а на 3-и и 10-е сут. увеличивался в 1,5 раза в сравнении с группой контроля (38,4 (20,2; 52,6) нг/мл и 31,1 (23,5; 48,93) нг/мл против 20,35 (20,08; 25,16) нг/мл ($p < 0,05$), а у пациентов с II ФК наблюдалась аналогичная динамика ММП-8, но на 10-е сут. его содержание достигало референсного уровня. Во II группе дооперационное содержание ММП-8 было ниже, чем у здоровых людей в обеих подгруппах, далее у пациентов с II ФК в 1-е и 3-и сут. после АКШ выявлено его умеренное (в 1,5 раза) повышение (31,85 (26,96; 38,12) нг/мл и 31,05 (29,6; 46,8) нг/мл ($p < 0,05$) и на 10-е сут. — снижалось до референсного значения. У пациентов с III ФК во II группе после операции не зарегист-

рировано статистически значимого различия уровня ММП-8 в сравнении с группой контроля и между подгруппами.

При анализе ММП-9 у пациентов в зависимости от степени ФК стенокардии, в I группе было выявлено более низкое ее содержание в сравнении с здоровыми людьми, в 1,5 раза в обеих подгруппах до АКШ (118,6 (98,2; 267,56) нг/мл и 121,43 (101,5; 278,5) нг/мл ($p < 0,05$) против 336,7 (229,7; 396,5) нг/мл), далее уровень ММП-9 повышался до референсного значения и на 10-е сут. снова уменьшался до предоперационной пониженной концентрации (145,6 (105,64; 237,8) нг/мл и 178,5 (112,3; 283,3) нг/мл ($p < 0,05$). А во II группе также установлено статистически значимо более низкое содержание ММП-9 в сравнении с группой контроля, но исключительно в подгруппе с II ФК — до АКШ (129,53 (100,14; 388,13) нг/мл ($p < 0,05$) и в 1-е сут. после операции (218,2 (203,46; 235,15) нг/мл ($p < 0,01$) против 336,7 (229,7; 396,5) нг/мл), на протяжении дальнейшего мониторинга не выявлено значимых различий в сравнении с здоровыми людьми и между подгруппами.

Таблица 4

Содержание матричных металлопротеиназ в сыворотке крови больных с ИБС до и после АКШ в зависимости от наличия / отсутствия ПИКС

	Показатели (Me; Q ₂₅ ; Q ₇₅), нг/мл	I группа (n = 25)			
		ПИКС (n = 11)	Нет ПИКС (n = 14)	ПИКС (n = 25)	Нет ПИКС (n = 25)
1	ММП-1 до АКШ	2,8* (1,92; 4,2)	3,3* (1,8; 4,52)	2,49* (1,96; 3,5)	3,01* (1,95; 7,33)
	1-е сутки после АКШ	2,2 (1,15; 3,4)	3,2* (2,3; 4,93)	1,98 (1,39; 2,7)	2,46 (1,89; 4,6)
	3-и сутки	2,05 (1,56; 3,6)	3,52* (2,4; 4,86)	1,77 (1,38; 2,7)	3,45* (2,15; 4,9)
	10-е сутки	3,34** (2,3; 5,63) $p_6 < 0,05$	3,92** (2,12; 6,23)	3,27** (2,98; 4,95) $p_3 < 0,05$; $p_{5,6} < 0,001$	4,5** (3,29; 9,24)
2	ММП-8 до АКШ	13,6 (9,82; 18,54)	10,7* (8,64; 16,98)	8,95* (6,29; 20,16)	8,9* (7,37; 23,23)
	1-е сутки после АКШ	28,32 (19,14; 38,26)	36,45* (21,85; 48,73) $p_1 < 0,01$	29,6 (10,95; 36,19)	24,8 (17,79; 37,95)
	3-и сутки	32,43 (22,23; 48,67) $p_2 < 0,01$	31,34 (25,6; 39,87) $p_2 < 0,01$	35,19* (19,5; 45,25)	27,01 (24,04; 34,46) $p_2 < 0,05$
	10-е сутки	30,16 (24,67; 42,92) $p_3 < 0,01$	27,58 (18,18; 39,57) $p_3 < 0,05$	27,96 (10,78; 40,66) $p_3 < 0,05$	26,3 (17,63; 46,08)
3	ММП-9 до АКШ	212,13 (176,5; 324,87)	254,6 (179,87; 348,7)	268,1 (151,1; 395,57)	200,06* (164,25; 245,12)
	1-е сутки после АКШ	285,6 (192,4; 378,32)	300,58 (213,45; 385,12)	265,02 (235,15; 361,84)	279,47 (220,03; 450,46) $p_1 < 0,02$
	3-и сутки	368,76 (304,5; 413,6) $p_2 < 0,05$	348,3 (287,6; 401,2)	377,93 (189,23; 408,21)	391,82 (312,9; 484,99) $p_2 < 0,01$
	10-е сутки после АКШ	302,4 (267,8; 378,8) $p_3 < 0,05$	305,6 (267,8; 389,9)	314,57 (258,03; 445,56)	369,52 (344,13; 496,75) $p_3 < 0,001$

Примечание. Статистическая значимость различий показателей с группой контроля: — статистическая значимость различий показателей с группой контроля: $p < 0,05$ — *; $p < 0,01$ — **; $p < 0,001$ — ***; — статистическая значимость различий показателей между I и II группами: $p < 0,05$ — #; $p < 0,01$ — ##; $p < 0,001$ — ###; — статистическая значимость различий показателей с исследуемой подгруппой больных: $p < 0,05$ — °; $p < 0,01$ — °°; $p < 0,001$ — °°°; статистическая значимость различий показателей в динамике: p_1 (до АКШ-1-е сут.); p_2 (до АКШ-3-и сут.); p_3 (до АКШ-10-е сут.); p_4 (1-3-и сут.); p_5 (1-10-е сут.); p_6 (3-10-е сут.).

В I группе у пациентов без ПИКС (табл. 4) ММП-1 была повышена в 3 раза в сравнении с группой контроля на протяжении всего этапа исследования, а в подгруппе с ПИКС до операции уровень ММП-1 был увеличен в 2 раза в сравнении с здоровыми людьми, далее ее концентрация достигала референсного значения и на 10-е сут. снова зарегистрировано трехкратное ее повышение. Во II группе концентрация ММП-1 была повышена до АКШ и на 10-е сут. достигала предоперационного содержания в обеих подгруппах в сравнении с здоровыми добровольцами.

В I группе у пациентов без ПИКС дооперационный уровень ММП-8 был ниже в 2 раза в сравнении с здоровыми людьми, далее в 1-е сут. ее концентрация двукратно возрастала, а на 3-и и 10-е сут. ММП-8 снова уменьшалась до референсных величин (табл. 4). А в подгруппе с кардиосклерозом содержание ММП-8 соответствовало уровню здоровых людей на протяжении всего мониторинга (табл. 4). Во II группе в обеих подгруппах значение ММП-8 до операции было статистически значимо более низким в сравнении с группой контроля, далее у пациентов без ПИКС ее уровень достигал референсного значения, а в подгруппе с ПИКС на 3-и сут. после операции ММП-8 увеличивалась в 1,5 раза в сравнении с группой здоровых добровольцев и далее достигала референсных величин.

При характеристике ММП-9, определено значимо более низкое ее содержание в сравнении с группой контроля во II группе до реваскуляризации в подгруппе без ПИКС (табл. 4). Нами не зафиксировано других статистически значимых различий уровня ММП-9 ни в сравнении с здоровыми людьми, ни между подгруппами.

В зависимости от продолжительности искусственного кровообращения (ИК) в I группе пациентов ММП-1 была увеличена трехкратно до операции в обеих подгруппах в сравнении с референсным значением (3,8 (2,56; 5,62) нг/мл ($p < 0,01$) и 3,2 (2,2; 4,14) нг/мл ($p < 0,05$) против 1,1 (0,56; 3,3) нг/мл), на 1-е и 3-и сут. ее концентрация уменьшалась до уровня группы контроля и на 10-е сут. снова увеличивалась в 2,5 раза (3,2 (2,68; 4,35) нг/мл ($p < 0,05$) и 3,05 (2,34; 4,78) нг/мл ($p < 0,05$)). Во II группе у пациентов с ИК менее 90 мин до АКШ зарегистрирована гиперпродукция ММП-1 (3,85 (2,69; 6,94) нг/мл ($p < 0,001$)), в 1-е сут. ее уровень уменьшался до референсной величины, на 3-и сут. ММП-1 увеличивалась в 2 раза (2,7 (2,04; 4,6) нг/мл ($p < 0,05$) против 1,1 (0,56; 3,3) нг/мл) в сравнении с группой контроля, нарастая на 10-е сут. (3,11 (2,83; 7,07) нг/мл ($p < 0,05$)). В подгруппе с ИК более 90 мин

уровень ММП-1 до АКШ был повышен в 2 раза (2,36 (1,8; 3,62) нг/мл ($p < 0,05$)), далее — в 1-е и 3-и сут. ее концентрация достигала референсного значения и на 10-е сут. снова зарегистрировано ее увеличение (в 3,5 раза) в сравнении с группой контроля (3,8 (3,04; 4,74) нг/мл ($p < 0,001$)).

При анализе содержания ММП-8 в I группе был выявлен значимо более низкий уровень до реваскуляризации в обеих подгруппах (13,5 (9,8; 21,23) нг/мл и 11,8 (7,56; 19,04) нг/мл ($p < 0,05$) против 20,35 (20,08; 25,6) нг/мл). После операции ее концентрация соответствовала референсному значению на протяжении всего мониторинга. Во II группе у пациентов с ИК менее 90 мин ММП-8 была повышена в 2 раза в сравнении с группой контроля только на 3-и сут. после АКШ (43,0 (29,14; 51,5) нг/мл ($p < 0,05$)). В другие исследуемые периоды ее уровень не отличался от референсной величины. Концентрация ММП-8 в подгруппе с ИК более 90 мин до АКШ была значимо пониженной (6,56 (5,98; 25,5) нг/мл ($p < 0,05$)) также как и в I группе, далее в 1-е и 3-и сут. сравнивалась с референсным значением, а на 10-е сут. повышалась в 2 раза в сравнении с группой контроля (40,1 (14,74; 41,7) нг/мл против 20,35 (20,08; 25,6) нг/мл ($p < 0,05$)). Концентрация ММП-9 на протяжении всего мониторинга, в зависимости от длительности ИК, соответствовала уровню группы контроля.

Таким образом, ММП-1 была статистически повышена на протяжении всего этапа исследования до и после АКШ, у больных с ИБС в I группе с ТЭ осложнениями, в подгруппе с ИМ до 6 мес. и без ПИКС. В остальных исследуемых подгруппах и во II группе ее концентрация была умеренно повышена в сравнении со здоровыми людьми — до АКШ и на 10-е сут. после реваскуляризации, а в 1-е и 3-и сут. соответствовала референсному значению. На 10-е сут. после операции уровень ММП-1 стремился к ее дооперационным значениям.

Выводы

1. Уровень ММП-1 2,5 нг/мл и более у пациентов с ИБС является диагностическим критерием риска возникновения ТЭ осложнений.
2. Анализ концентрации ММП-8 у пациентов с ИБС до и после АКШ не выявил связи между повышенным ее содержанием и наличием осложнений у пациентов после операции.
3. Не выявлено значимой динамики ММП-9 у пациентов после реваскуляризации миокарда.

Список литературы

1. Гусев Е.И., Мартынов М.Ю., Камчатнов П.Р. Ишемический инсульт. Современное состояние проблемы. Неврология. 2013; 5 (83): 7-12;
2. Невзорова В.А. Бродская Т.А., Саковская А.Н., Чикаловец И.В. Состояние жесткости аорты у пациентов молодого и среднего возраста с гипертонической болезнью. Тихоокеанский медицинский журнал. 2015; 1: 43-47;
3. Панченко Е.П. Выбор антиагрегантной терапии у различных пациентов с острыми коронарными синдромами. Атеротромбоз. 2015; 2: 66-85;
4. Перуцкий Д.Н., Коваленко И.Б., Константинов С.Л. Современные подходы к оценке многососудистого поражения коронарного русла у больных хронической ишемической болезнью сердца. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2011; 7 (6): 744-751;
5. Турмова Е.П., Григорюк А.А., Маркелова Е.В., Коцюрбий Е.А. и др. Мониторинг показателей структурно-функционального повреждения сосудов при экспериментальном атеросклерозе. Вестник медицинских технологий. 2012; XIX (2): 276;
6. Austin K.M., Nguyen N., Javid G., Covic L., Kuliopulos A. Noncanonical matrix metalloproteinase-1-protease-activated receptor-1 signaling triggers vascular smooth muscle cell dedifferentiation and arterial stenosis. Biol Chem. 2013; 288 (32): 23105-23115;
7. Henneman M.M., Schuijf J.D., Pundziute G., van Werkhoven J.M., Wall E.E. van der, Jukema J.W., Bax J.J. Noninvasive evaluation with multislice computed tomography in suspected acute coronary syndrome: plaque morphology on multislice computed tomography versus coronary calcium score. J. Am Coll. Cardiol. 2008; 52: 216-222;
8. Lehrke M., Greif M., Broedl U.C., Leberherz C., Laubender R.P., Becker A., et al. MMP-1 serum levels predict coronary atherosclerosis in humans. Cardiovasc Diabetol. 2009; 8 (50): 136-142;
9. Lenglet S., Mach F., Montecucco F. Role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. Mediators Inflamm. 2013; 659-662;
10. Liu M., Zhang P., Chen M., et al. Aging might increase myocardial ischemia. Reperfusion-induced apoptosis in humans and rats. 2012; 34 (3): 621-632;
11. Nieminen M.T., Vesterinen P., Tervahartiala T., Kormi I., Sinisalo J., Pussinen P.J., Sorsa T. Practical implications of novel serum ELISA-assay for matrix metalloproteinase-8 in acute cardiac diagnostics. Acute Card Care. 2015; 17 (3): 46-47;
12. Pengyu Jia, Nan Wu, Xiaowen Zhang, Dalin Jia Association of matrix metalloproteinase-1-519A/G polymorphism with acute coronary syndrome: a meta-analysis. Int. J. Clin. Exp. Med. 2015; 8(4): 5675-5682;
13. Ross C. Laxton, Yanhua Hu, Johan Duchene, A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. Circ Res. 2009; 105(9): 921-929;
14. Spinale F.G. Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. Circulation Research. 2002; 90: 520-529.

Сведения об авторах:

Маркелова Елена Владимировна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нормальной и патологической физиологии человека ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, e-mail: patphis-vl@mail.ru;

Силаев Андрей Анатольевич, канд. мед. наук, зав. отд. анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии медицинского центра ДВФУ г.Владивостока, докторант ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, e-mail: silaevaa@mail.ru;

Гельцер Борис Израилевич, доктор мед. наук, член корр. РАН, проф., зав. каф. пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, e-mail: boris.geltser@vvsu.ru;

Семенихин Андрей Анатольевич, аспирант каф. нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, e-mail: andsema@mail.ru;

Федянина Людмила Николаевна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. биотехнологии и общественного питания ФГАОУ ВО ДВФУ Министерства Образования и науки России, e-mail: fedyanina.ln@dvfu.ru

References

1. Gusev E.I., Martynov M.Ju., Kamchatnov P.R. Ischemic stroke. Modern state of problem. Nevrologiya. 2013; 5 (83): 7-12. (in Russian)
2. Nevzorova V.A., Brodskaya T.A., Sakovskaya A.N., Chikalovets I.V. State of inflexibility of aorta for the patients of young and middle age with hypertensive illness. Tihookeanskiy meditsinskiy zhurnal. 2015; 1: 43-7. (in Russian)
3. Panchenko E.P. The choice of antiplatelet therapy in different patients with acute coronary syndromes. Aterotromboz. 2015; 2: 66-85. (in Russian)
4. Perutskiy D.N., Kovalenko I.B., Konstantinov S.L. Modern approaches to the assessment of multi-vessel coronary lesion in patients with chronic ischemic heart disease. Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii. 2011; 7 (6): 744-51. (in Russian)
5. Liu M., Zhang P., Chen M., et al. Aging might increase myocardial ischemia. Reperfusion-induced apoptosis in humans and rats. 2012; 34 (3): 621-32.
6. Pengyu J., Nan W., Xiaowen Z., Dalin J. Association of matrix metalloproteinase-1-519A/G polymorphism with acute coronary syndrome: a meta-analysis. Int. J. Clin. Exp. Med. 2015; 8(4): 5675-82.
7. Nieminen M.T., Vesterinen P., Tervahartiala T., Kormi I., Sinisalo J., Pussinen P.J., Sorsa T. Practical implications of novel serum ELISA-assay for matrix metalloproteinase-8 in acute cardiac diagnostics. Acute Card Care. 2015; 17 (3): 46-7.
8. Spinale F.G. Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. Circulation Research. 2002; 90: 520-9.
9. Turmova E.P., Grigorjuk A.A., Markelova E.V., Kocjurbij E.A. et al. The monitoring of indicators of structural and functional vascular damage in experimental atherosclerosis. Vestnik meditsinskikh tehnologiy. 2012; XIX (2): 276. (in Russian)
10. Lehrke M., Greif M., Broedl U.C., Leberherz C., Laubender R.P., Becker A., et al. MMP-1 serum levels predict coronary atherosclerosis in humans. Cardiovasc Diabetol. 2009; 8 (50): 136-42.
11. Henneman M.M., Schuijf J.D., Pundziute G., van Werkhoven J.M., Wall E.E. van der, Jukema J.W., Bax J.J. Noninvasive evaluation with multislice computed tomography in suspected acute coronary syndrome: plaque morphology on multislice computed tomography versus coronary calcium score. J. Am Coll. Cardiol. 2008; 52: 216-22.
12. Austin K.M., Nguyen N., Javid G., Covic L., Kuliopulos A. Noncanonical matrix metalloproteinase-1-protease-activated receptor-1 signaling triggers vascular smooth muscle cell dedifferentiation and arterial stenosis. Biol Chem. 2013; 288 (32): 23105-15.
13. Lenglet S., Mach F., Montecucco F. Role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. Mediators Inflamm. 2013; 659- 662.
14. Ross C. L., Yanhua H., Johan D., A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. Circ Res. 2009; 105(9): 921-9.

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Петрищев Н.Н.¹, Семенов Д.Ю.¹, Цибин А.Ю.¹, Юкина Г.Ю.¹,
Беркович А.Е.², Бурсиан А.А.², Белянкин А.Б.², Сенчик К.Ю.²

Влияние выключения кровотока на характер повреждения вен при воздействии HIFU

¹ ФГБОУ ВО Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Л. Толстого, д. 6-8

² ФГАУ ВО Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, г. Санкт-Петербург, Россия, Политехническая ул., д. 29

Цель — изучение в эксперименте влияния частичного выключения кровотока на развитие структурных изменений в стенке задней полой вены после воздействия высокоинтенсивного фокусированного ультразвука (high-intensity focused ultrasound, HIFU). **Методика.** Параметры и режим воздействия: частота 1,65 МГц, интенсивность ультразвука в фокусе 13,6 кВт/см², площадь фокального пятна 1мм², воздействие непрерывное, длительность воздействия 3 с. **Результаты.** Сразу после HIFU воздействия во всех отделах стенки вены наблюдались характерные признаки термического повреждения. Через 1 нед. после облучения в той части вены, в которой сохранялся кровоток, структурные изменения в интиме, меди и адвентиции были минимальны, а через 4 нед. отсутствовали. В изолированном участке вены через неделю после воздействия HIFU наблюдалась частичная деэндотелизация, разрушение миоцитов, дезорганизация и консолидация коллагеновых волокон в адвентиции; через 4 нед. эндотелиальный слой восстанавливался, признаки повреждения меди и адвентиции сохранялись, но были менее выражены, чем через 1 нед. после облучения. **Заключение.** Выключение кровотока после воздействия на вену HIFU способствует развитию более стойких изменений в стенке вены. Компрессия вен, по-видимому, необходима для развития облитерации, при использовании HIFU-технологии.

Ключевые слова: высокоинтенсивный фокусированный ультразвук; вены; эндотелий; коллаген.

Для цитирования: Петрищев Н.Н., Семенов Д.Ю., Цибин А.Ю., Юкина Г.Ю., Беркович А.Е., Бурсиан А.А., Белянкин А.Б., Сенчик К.Ю. Влияние выключения кровотока на характер повреждения вен при воздействии HIFU. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 46—50.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.46-50

Для корреспонденции: Петрищев Николай Николаевич, доктор мед. наук, проф., Руководитель центра лазерной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, e-mail: lasmed@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение о предоставлении субсидии № 14.578.21.0081 от 28.11.2014 г.).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.12.2016

Petrishchev N.N.¹, Semenov D.U.¹, Tsibin A.U.¹, Yukina G.U.¹,
Berkovich A.E.², Bursian A.A.², Belyankin A.B.², Senchik K.U.²

Effekt of blood flow shutdown on the vein damage when exposed to HIFU

¹ FSEIH «PFStPSMU» Federal State Educational Institution of Higher Education «Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University» Russian Ministry of Health, 6-8, Tolstoy Str. St. Petersburg, 197022, Russia

² FSAEI «PGStPPU» Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University», Polytechnical St., 29, St. Petersburg, 195251, Russia

The purpose. In the study we investigated the impact of the partial blood flow shutdown on structural changes in the rabbit vena cava posterior wall after exposure to high-intensity focused ultrasound (HIFU). **Methods.** Ultrasound Exposure: frequency of 1.65 MHz, the ultrasound intensity in the focus of 13.6 kW/cm², the area of the focal spot 1 mm², continuous ultrasound, exposure for 3 seconds. **Results.** Immediately after HIFU exposure all layers of the vein wall showed characteristic signs of thermal damage. A week after exposure structural changes in the intima, media and adventitia was minimal in the part of vessel with preserved blood flow, and after 4 weeks the changes were not revealed. A week after HIFU exposure partial endothelium destruction, destruction of myocytes, disorganization and consolidation of collagen fibers of the adventitia were observed in an isolated segment of the vessel, and in 4 weeks endothelium restored and signs of damage in media and adventitia persisted, but were less obvious than in a week after exposure. **Conclusion.** The shutdown of blood flow after exposure to HIFU promotes persistent changes in the vein wall. Vein compression appears to be necessary for the obliteration of the vessel, when using HIFU-technology.

Keywords: high-intensity focused ultrasound — HIFU; vein; endothelium; collagen.

For citation: Petrishchev N.N., Semenov D.U., Tsibin A.U., Yukina G.U., Berkovich A.E., Bursian A.A., Belyankin A.B., Senchik K.U. Effekt of blood flow shutdown on the vein damage when exposed to HIFU. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal).* 2017; 61(2): 46—50. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.46-50

For correspondence: Petrishchev N.N., doctor of Medical Sciences, professor, Director of Laser Center Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, 6-8, Tolstoy Str. St. Petersburg, 197022, Russian Federation, e-mail: lasmed@yandex.ru

Information about authors:

Petrishchev N.N., <http://orcid.org/0000-0003-4760-2394>

Semenov D.U., <http://orcid.org/0000-0003-2130-2940>

Tsibin A.U., <http://orcid.org/0000-0002-6345-7038>

Yukina G.U. <http://orcid.org/0000-0001-8888-4135>

Berkovich A.E., <http://orcid.org/0000-0001-5686-2994>

Bursian A.A., <http://orcid.org/0000-0003-1938-3323>

Belyankin A.B. <http://orcid.org/0000-0002-0969-0330>

Senchik K.U., <http://orcid.org/0000-0002-7562-8885>

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

Acknowledgement. The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (grant agreement № 14.578.21.0081 from 11.28.2014 г.)

Received 05.12.2016

Введение

В настоящее время для лечения варикозной болезни вен нижних конечностей широко применяются малоинвазивные методы — склеротерапия, радиочастотная и эндоваскулярная лазерная абляция. Однако даже эти минимально инвазивные методы требуют хирургического вмешательства, не исключая риск таких осложнений как флебиты, кровотечения, тромбоз, тромбоэмболии, изъязвление кожи и др. В последние годы все большее внимание уделяется изучению возможности использования высокоинтенсивного фокусированного ультразвука (high-intensity focused ultrasound — HIFU) при венозной патологии.

Впервые применение высокоинтенсивного фокусированного ультразвука для индукции окклюзии сосудов путем тепловой коагуляции было показано в 1995 г. Delon-Martin С. и соавт. В экспериментальном исследовании на крысах, бедренные вены которых подвергались воздействию HIFU, авторы наблюдали тромбоокклюзию сосудов при отсутствии каких-либо повреждений окружающих тканей [1]. Окклюзия артерий и вен как эффект воздействия HIFU продемонстрирована и в ряде других экспериментальных исследований [2—4]. В последние годы основное внимание исследователей сконцентрировано на поиске режимов и условий воздействия HIFU на вены, которые позволят использовать эту технологию в клинике [5—9].

Основные механизмы действия HIFU на сосуды включают термические эффекты (нагревание свыше 60°C) и механические, связанные с кавитацией, акустическими микропотоками и т.д. В зависимости от параметров облучения эффекты воздействия HIFU на сосуды могут быть различными: образование окклюдированного и неокклюдированного тромба, разрыв, повреждение отдельных слоев сосудистой стенки без нарушения проходимости, облитерация [10]. HIFU-технология рассматривается как перспективная для лечения варикозной болезни вен, однако не получила широкого применения, так как остаются невыясненными условия определяющие оптимальный эффект [5, 11, 12]. Одним из таких условий является сохранность тока крови в вене, на которую воздействует HIFU.

Цель исследования — изучение влияния выключения кровотока на характер повреждения стенки вены при воздействии HIFU.

Методика

Эксперименты выполнены на кроликах-самцах Шиншилла (масса тела 2,5—3,0 кг). Животные содержались в стандартных условиях вивария. Исследования проводились в соответствии с правилами лабораторной практики (приказ № 267 МЗ РФ от 19.06.2003) и одобрены локальным Этическим комитетом.

Под эндотрахеальной комбинированной анестезией выполняли верхне-срединную лапаротомию. Все петли тонкой и толстой кишок выводили из брюшной полости влево и укрывали влажной марлевой салфеткой. При этом открывается доступ к задней полой вене (ЗПВ) на протяжении 4—5 см от нижнего края печени до бифуркации. На этом участке в нее впадают почечные вены, у мест их впадения расположены правый и левый надпочечники. Над ЗПВ рассекали париетальную брюшину, при необходимости остановки кровотока под вену подводили лигатуру. После контроля гемостаза и введения в брюшную полость канамицина рану послойно ушивали глухим швом.

Для визуализации кровотока и воздействия HIFU использовали описанный ранее лабораторный стенд, состоящий из ультразвукового блока (УБ), блока управления, устройства позиционирования [13]. УБ включает ультразвуковой диагностический линейный датчик и фокусирующий сферический силовой излучатель. Акустический контакт между УБ и объектом исследования обеспечивался за счет слоя эхогеля. Органы управления стенда позволяют варьировать длительность и интенсивность силового воздействия. Во всех опытах использовалось напряжение питания генератора силового излучателя 24 В, частота силового излучения 1,65 МГц, интенсивность ультразвука в фокальном пятне составляла 13,6 кВт/см².

Задняя полая вена у кролика обычно имеет диаметр около 10—12 мм, протяженность вены такого диаметра составляет 2—3 см. В процессе эксперимента сначала фокусировали HIFU на задней (дальней) стенке сосуда, а затем на передней (ближней), так как при повреждении передней стенки могут создаться изменения в ней, влияющие на распространение ультразвуковой волны. Учитывая, что HIFU в наших опытах дает точку поражения в фокусе диаметром 1 мм, нанося 25 точек, расположенных в 5 рядах с интервалом 1 мм по 5 точек в ряду с шагом 1 мм, мы повреждали площадку на стенке вены размером 5х5 мм. Две таких площадки, расположенные на задней и передней стенках, составляют 30% площади стенки участка вены, подвергнувшегося воздействию.

Подвергнутые воздействию HIFU участки сосудов с окружающими тканями иссекали для гистологического исследования. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7,4) в течение суток, обезвоживали и заливали в парафиновые блоки по стандартной гистологической методике. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Bio-Optica, Италия). Микроскопический анализ проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Германия) при увеличении в x100 и x400 раз. Фотосъемку гистологических объектов выполняли, используя цифровую микрофотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

Результаты и обсуждение

В остром опыте сразу после воздействия HIFU на заднюю полую вену при сохраненном кровотоке наблюдались макроскопические изменения — сужение и побледнение сосуда, просвет сосуда был сохранен, при морфологическом исследовании в месте повреждения выявлены изменения во всех отделах стенки сосуда, мозаично выявлялись участки фибриноидного некроза. Эндотелий и субэндотелиальный слой отсутствовали на всем протяжении. Гладкие миоциты средней оболочки граничили непосредственно с кровью, их цитоплазма была гомогенизирована, границы клеток не прослеживались. Коллагеновые волокна представлялись дезорганизованными и набухшими, местами отмечалась их фрагментация и слипание. Коллагеновые волокна в адвентициальной оболочке также частично фрагментированы.

В хроническом эксперименте нам было необходимо остановить кровоток с целью создания условий для облитерации сосуда. Самый надежный способ остановки кровотока — перевязка сосуда, но при перевязке ЗПВ даже ниже впадения почечных вен кролики погибают. Для решения поставленной задачи выделяли заднюю полую вену в участке с максимальным диаметром сосуда (около 1 см), проводили необходимые экспериментальные действия, в том числе воздействие HIFU, и затем участок стенки сосуда, на которую воздействовали силовым ультразвуком, прошивали на 1/3 просвета на протяжении 1—1,5 см непрерывным швом атравматичной нерассасывающейся нитью 5-0 (prolene). Таким образом, отток крови по ЗПВ сохранялся, однако часть сосуда была выключена из кровотока.

Описанная выше операция была выполнена у 2 интактных кроликов без воздействия HIFU (контроль), 5 кроликам проводили облучение HIFU.

Контрольные кролики хорошо перенесли операцию и в течение 4 нед. наблюдения оставались живы, задние лапы не отекают, что свидетельствует о сохранении оттока крови. Под наркозом выполняли повторную лапаротомию, проводили осмотр задней полой вены в области операции. В брюшной полости асцитической жидкости не обнаружено, сосуды брюшины не инъецированы, вена до места ушивания не расширена, стенка ее не утолщена, обычного цвета. В зоне ушитой ЗПВ развился спаечный процесс.

При гистологическом исследовании установлено, что в участке вены, с сохраненным кровотоком, эндотелий не изменился, медия представлена двумя слоями гладких миоцитов, в адвентиции волокнистая соединительная ткань с фибробластами и коллагеновыми волокнами без изменений. В изолированном от кровотока участке вен, эндотелий также сохранён, гладкие миоциты средней оболочки и волокнистая соединительная ткань адвентиции без видимых признаков

повреждения. Таким образом, длительное выключение части полых вен из кровотока (4 нед.) не привело к структурным изменениям в стенке сосуда.

Через 1 нед. после воздействия HIFU (опыты на 2 кроликах) в той части вены, в которой кровоток не был нарушен, эндотелий сохранен, гладкие миоциты меди и адвентиция не повреждены (рис. А).

В изолированном после облучения участке вены наблюдалась частичная дезэндотелизация, разрушение миоцитов средней оболочки, дезорганизация и консолидация коллагеновых пучков в адвентициальной оболочке (рис. Б). Несмотря на очевидные проявления повреждения интимы, тромбоз не развивался.

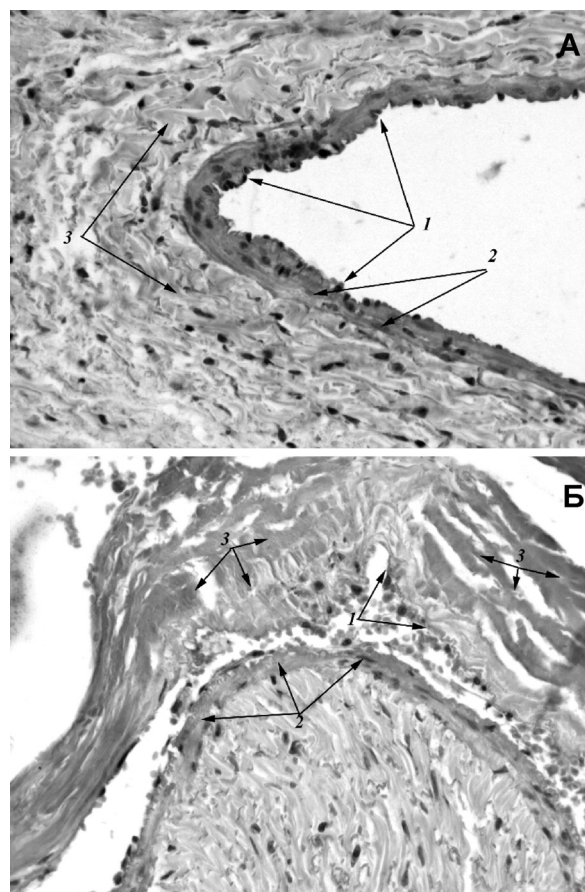
Через 1 мес. после воздействия HIFU на ЗПВ все 5 кроликов также оставались живы. В участке вены с сохранённым кровотоком эндотелий и базальная мембрана сохранены, медиа представлена 2 слоями гладких миоцитов без признаков нарушения. Коллагеновые волокна в адвентиции без видимых признаков дезорганизации. В участке вены с изолированным кровотоком через 1 мес. после воздействия HIFU, эндотелий и базальная мембрана также сохранены, структура гладких миоцитов меди нарушена: отсутствуют четкие границы клеток, ядра клеток не выявляются; коллагеновые волокна дезорганизованы, в некоторых зонах обнаруживается консолидация волокон. В адвентиции определяется незначительная дезорганизация коллагеновых волокон. В просвете этой части сосуда выявляются мелкие тромбы, неизмененные эритроциты. Несмотря на наличие признаков повреждения и спавшиеся стенки сосуда, облитерации вены не наблюдалось. Во всех случаях вокруг шовного материала выявляется периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация с гигантскими многоядерными клетками инородных тел.

Таким образом, в остром периоде после воздействия HIFU на заднюю полую вену кролика мы, как и другие авторы, наблюдали характерные структурные изменения во всех слоях стенки сосуда. Учитывая режим и параметры HIFU-воздействия, а также характер повреждения коллагена (дезорганизация и фрагментация коллагена, консолидация коллагеновых волокон) можно полагать, что в опытах доминировал термический эффект HIFU. Деструктивные изменения в интиме, меди и адвентиции были обратимы и через 1 и 4 нед. после облучения в той части вены, в которой сохранялся кровоток, признаки повреждения были минимальны, в то время, как в изолированном от кровотока участке вены они сохранились, хотя окклюзии не было. Особо следует отметить восстановление эндотелия. Отсутствие выраженного тромбоза, по-видимому, связано с включением физиологических механизмов тромболизиса.

Можно также предположить, что эффект HIFU-воздействия снижается в результате теплоотве-

дения по крови при сохраненном кровотоке. В связи с этим, вероятно, надо либо проводить воздействие на выключенном кровотоке, либо сдвигать точку максимальной температуры в сторону адвентиции.

Вопрос о том, может ли HIFU вызывать окклюзию вен в результате повреждения эндотелия остается открытым. В ряде экспериментальных исследований было показано, что изолированное повреждение эндотелия *in vivo* приводит к тромбозу только при наличии акустической кавитации и гиперкоагуляции. Более того, механическое повреждение эндотелия, индуцированное кавитацией, рассматривается рядом экспериментаторов как основной механизм окклюзии вен под действием HIFU [8, 11]. На наш взгляд, описанный выше, подход к объяснению окклюзирующего действия HIFU на вены не является исчерпывающим.



Участок вены с сохранённым кровотоком (А) и изолированным кровотоком (Б) через 1 нед. после воздействия на сосуд HIFU. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$.

А — 1 — эндотелий сохранён, 2 — гладкие миоциты меди не повреждены, 3 — адвентиция без признаков повреждения. Б — 1 — эндотелий местами отторгнут, местами сохранён; 2 — гладкие миоциты средней оболочки с одной стороны разрушены, с другой сохранены; 3 — определяется выраженная дезорганизация и консолидация коллагеновых пучков в адвентициальной оболочке; в просвете сосуда выявляются неповреждённые эритроциты.

Термическое действие HIFU на вены вызывает более стойкие изменения, чем только повреждение эндотелия и при определенных условиях, например при выключенном кровотоке, они являются малообратимыми. Именно эти изменения и присоединяющееся воспаление лежат в основе ремоделирования стенки вен, приводящего к окклюзии. Тромбообразование лишь способствует этому процессу. Сужение и уплотнение вены после воздействия HIFU может создать более благоприятные условия для функционирования венозных клапанов [5].

Задачи дальнейших исследований мы видим в оптимизации соотношения термического и механического эффектов HIFU для обеспечения эффективного воздействия на коллагеносодержащие структуры и эндотелий стенки вены.

Заключение

Сохранность кровотока влияет на степень выраженности структурных изменений в стенке вен после воздействия высокоинтенсивного фокусированного ультразвука. В изолированном от кровотока участке вены признаки повреждения миоцитов и дезорганизации коллагеновых волокон выявлялись через 4 нед. после облучения. Компрессия вен, по-видимому, необходима для развития облитерации при использовании HIFU-технологии.

References

1. Berkovich A.E., Bursian A.A., Senchik K.Yu., Petrishchev N.N., etc. The laboratory stand for a research of impact of the focused ultrasound of high intensity on vessels. *Meditsinskaya tekhnika*. 2016; 2: 16-9. (in Russian)
2. Petrishchev N.N.1, Tsibin A.U.1, Semenov D.U.1, Berkovich A.E.2, Yukina G.U.1, Blum N.M.1, Efimov A.N.1, Bursian A.A.2, Senchik K.U.2 Applying HIFU for the obliteration of the veins in the experiment. *Patologic-*

heskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. 2016; 60 (1): 89-93 (in Russian)

3. Angel Y.C, Pichardo S., Salomir R., Petrusca L. et al. Testing of a HIFU probe for the treatment of superficial venous insufficiency by using MRI. *Proceedings of the 28th IEEE EMBS Annual International Conference*. New York City. 2006; 1: 3533-6. (USA)

4. Delon-Martin C, Vogt C, Chignier E, et al. Venous thrombosis generation by means of high-intensity focused ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 1995; 21: 113-9.

5. Deepika Princess D., Mohan Jagannath, Biju Shalvin Y.J. Ultrasound Therapy for Varicose Vein. *International Research Journal of Medical Sciences*. 2013; 1(10): 22-5.

6. Fujiwara R, Sasaki K, Ishikawa T, et al. Arterial blood flow occlusion by high intensity focused ultrasound and histologic evaluation of its effect on arteries and surrounding tissues. *J. Med. Ultrasonics*. 2002; 29: 85-90.

7. Henderson PW, Lewis GK, Shaikh N, et al. A portable high-intensity focused ultrasound device for noninvasive venous ablation. *Journal of vascular surgery*. 2010; 51(3): 707-11.

8. Hwang JH, Zhou Y, Warren C, Brayman AA, Crum LA. Targeted venous occlusion using pulsed high-intensity focused ultrasound. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2010; 57: 37-40.

9. Hwang JH, Tu J, Brayman AA, Matula TJ, Crum LA. Correlation between inertial cavitation dose and endothelial cell damage in vivo. *Ultrasound Med. Biol.* 2006; 32: 1611-19. (doi:10.1016/j. ultrasmedbio.2006.07.016)

10. Petrusca L., Salomir R., Miller R., Pichot O., Rata M., Cotton F., Chapeon J.-Y. Experimental investigation of thermal effects in HIFU-based external valvuloplasty with a nonspherical transducer, using high-resolution MR thermometry. *Phys. Med. Biol.* 2009; 54: 5123 - 38.

11. Rivens IH, Rowland IJ, Denbow M, Fisk NM, ter Haar GR, Leach MO. Vascular occlusion using focused ultrasound surgery for use in fetal medicine. *Eur. J. Ultrasound*. 1999; 9: 89-97.

12. Schultz-Haakh H, Li JK, Welkowitz W, Rosenberg N. Ultrasonic treatment of varicose veins. *Angiology*. 1989; 40: 129- 37. (doi:10.1177/000331 978904000208)

13. Shaw C. J., G. R. ter Haar, I. H. Rivens, D. A. Giusani, C. C. Lees. Pathophysiological mechanisms of high-intensity focused ultrasound-mediated vascular occlusion and relevance to non-invasive fetal surgery. *J. R. Soc. Interface*. 2014; 11: 20140029. doi.org/10.1098/rsif.2014.0029.

Сведения об авторах:

Семенов Дмитрий Юрьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. общей хирургии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, e-mail: Semenov_du@mail.ru;

Цибин Андрей Юрьевич, канд. мед. наук, доцент каф. общей хирургии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, e-mail: autsibin@yandex.ru;

Юкина Галина Юрьевна, канд. мед. наук, зав. лаб. патоморфологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, e-mail: ripson@inbox.ru

Беркович Александр Ефимович, зав. лаб. «Медицинская ультразвуковая аппаратура» ФГАОУ ВО СПбПУ, e-mail: aeberkovich@yandex.ru;

Бурсиан Андрей Арнольдович, гл. конструктор лаб. «Медицинская ультразвуковая аппаратура» ФГАОУ ВО СПбПУ, e-mail: bursian@mail.ru;

Белянкин Андрей Борисович, гл. инженер лаб. «Медицинская ультразвуковая аппаратура» ФГАОУ ВО СПбПУ, e-mail: anbel@mail.ru;

Сенчик Константин Юрьевич, доктор мед. наук, проф., консультант лаб. «Медицинская ультразвуковая аппаратура» ФГАОУ ВО СПбПУ, e-mail: senchik_kyu@spbstu.ru

© Коллектив авторов, 2017

УДК 616.831-005.4 — 036.12:616.155.29:612.435.451

Баринов Э.Ф., Мамедалиева С.А., Твердохлеб Т.А., Балькина А.О.

Взаимодействие адреналина и АДФ в регуляции функциональной активности тромбоцитов при хронической ишемии мозга

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, 83003, г. Донецк, проспект Ильича, д. 16

Цель — установление роли АДФ в модуляции агрегации тромбоцитов индуцированной адреналином у пациентов с хронической ишемией головного мозга (ХИМ). **Методика.** Использована обогащенная тромбоцитами плазма, которую получали путем центрифугирования из периферической крови 55 пациентов с диагнозом ХИМ 1—2 стадии. Исследование агрегации тромбоцитов (АТц) проведено на агрегометре фирмы Chrono — Log (США). Для стимуляции тромбоцитов использовали адреналин и АДФ в эффективной концентрации (EC₅₀). **Результаты.** У 35 пациентов (1-я группа) при гиперреактивности тромбоцитов на АДФ (EC₅₀) реакция тромбоцитов на адреналин была гетерогенной: в 17 случаях (48,6%) регистрировался высокий ответ (более 50%) и в 18 случаях (51,4%) низкий ответ тромбоцитов на адреналин. У 20 пациентов (2-я группа) выявлена гипореактивность тромбоцитов при стимуляции обоими агонистами. Установлено, что низкий исходный ответ тромбоцитов на адреналин *in vitro* — может быть следствием сниженной секреции АДФ, т.е. лимитированной адаптационной реакции, поскольку введение субпороговой дозы АДФ обеспечивает повышение адренореактивности тромбоцитов. Если патохимические нарушения, лежащие в основе формирования дизадаптации тромбоцитов, являются обратимыми, то возможно восстановление реакции тромбоцитов на адреналин. **Заключение.** При снижении функционального ответа тромбоцитов на адреналин ключевым вопросом является установление обратимости нарушений адаптационной реакции тромбоцитов.

Ключевые слова: хроническая ишемия головного мозга, агрегация тромбоцитов, адреналин, АДФ.

Для цитирования: Баринов Э.Ф., Мамедалиева С.А., Твердохлеб Т.А., Балькина А.О. Взаимодействие адреналина и АДФ в регуляции функциональной активности тромбоцитов при хронической ишемии мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 51—55. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.51-55

Для корреспонденции: Баринов Эдуард Федорович, доктор мед. наук., проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ДонНМУ, e-mail: barinov.ef@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.07.2015

Barinov E.F., Mamedaliyeva S.A., Tverdokhleb T.A., Balykina A.O.

Interaction of epinephrine and ADP in regulation of platelet function in chronic cerebral ischemia

Donetsk National Medical University named after M. Gorky, 16 pr. Ilich, Donetsk, 83003.

The purpose is devoted to test of hypothesis that patients with chronic cerebral ischemia (CCI) have decreased secretion of platelet ADP as the reason of platelet aggregation restriction in response to stimulation of adrenaline. **Methods.** We used platelet-rich plasma which was separated by centrifugation from peripheral blood of 55 patients with a diagnosis of CCI of stage 1—2. Platelets aggregation was studied on aggregometer Chrono — Log (USA). ADP and Epinephrine were used for platelet stimulation at effective concentration (EC₅₀). Modulatory role of ADP subthreshold doses (0.5 μM) in platelet activation was analyzed with its addition to a suspension of platelets stimulated by agonists (EC₅₀). **Results.** In 35 patients (group 1) with platelet hyperreactivity to ADP (EC₅₀) response of platelets to Epinephrine was heterogeneous: in 17 cases (48.6%) there was high response (50%) and in 18 cases (51.4%) there was low platelet response to Epinephrine. 20 patients (group 2) had hyporesponsiveness of platelets upon stimulation by both agonists. It was established that the low initial response of platelets to Epinephrine *in vitro* might be due to reduced secretion of ADP, i.e. limited adaptive response since administration of ADP subthreshold doses enhances adrenoactivity of platelets. If pathochemical violations underlying the formation of platelet disadaptation are reversible, it is possible to recover the reaction of platelets to Epinephrine. **Conclusion.** In reducing the functional response of platelets to Epinephrine key issue is establishing the reversibility of violations of platelets adaptive response of platelets.

Keywords: chronic cerebral ischemia, platelet aggregation, Epinephrine, ADP.

For citation: Barinov E.F., Mamedaliyeva S.A., Tverdokhleba T.A., Balykina A.O. Interaction of epinephrine and ADP in regulation of platelet function in chronic cerebral ischemia *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (2): 51–55. (in Russ). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.51-55

For correspondence: Eduard F. Barinov, MD, Professor, Head of the Department Histology, Cytology and Embryology Donetsk National Medical University named after M. Gorky, 16 pr. Ilichea, Donetsk, 83003

Information about authors: Eduard Barinov: <http://orcid.org/0000-0002-8070-2242>

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

Received 12.07.2015

Введение

Ведущее место в структуре цереброваскулярных заболеваний занимает хроническая ишемия головного мозга (ХИМ) [1]. Основными факторами риска возникновения и прогрессирования ХИМ являются артериальная гипертензия, атеротромботические изменения сосудов, соматические нарушения, в т.ч. кардиальная патология. В настоящее время все большее внимание уделяется изучению тромбоцитов (Тц), учитывая: необходимость контроля за эффективностью антиагрегантной терапии [2]. Успешное применение двойной антитромбоцитарной терапии, направленной на ингибирование активности циклооксигеназы (ЦОГ-1) и блокаду пуриновых рецепторов, скорее свидетельствует о понимании механизмов тромбогенеза, чем механизмов, обеспечивающих индукцию и поддержание повышенной функциональной активности тромбоцитов. В этой связи имеет смысл вернуться к анализу секреции АДФ из α -гранул, поскольку этот аутокринный механизм стимуляции тромбоцитов можно рассматривать как адаптационную реакцию. Биологический смысл существования такой защитной реакции заключается в возможности амплификации внешнего слабого сигнала. По сути, АДФ секретируемый из Тц усиливает эффект первичной стимуляции агонистом и может инициировать тромбогенез. Можно предположить и обратное. В случае снижения секреции АДФ будет ограничиваться агрегация тромбоцитов в ответ на их стимуляцию экзогенным агонистом. Если данная гипотеза будет подтверждена, то при низкой функциональной активности Тц можно воспроизвести амплификацию экзогенного сигнала путем повышения в них концентрации АДФ. Исследования в данном направлении позволяют приблизиться к пониманию механизмов повышения/восстановления функциональной активности тромбоцитов при патологии сердечно-сосудистой системы, сопровождающейся вариабельностью уровня катехоламинов в циркулирующей крови.

Цель исследования — установление роли АДФ в модуляции агрегации тромбоцитов индуцированной Адреналином у пациентов с хронической ишемией головного мозга.

Методика

В исследование включены 55 пациентов с диагнозом хронической ишемии головного мозга 1—2-й стадии, из них — 25 мужчин и 30 женщин, в возрасте от 40 до 76 лет. Анализ функционального состояния тромбоцитов проводили *in vitro* на момент госпитализации пациентов до начала консервативной терапии. В исследование не включались пациенты, которые принимали антиагрегантные препараты и блокаторы α -адренорецепторов менее чем за 1 нед. до обследования. Из периферической крови путем центрифугирования выделяли обогащенную тромбоцитами плазму. В пробе содержание тромбоцитов в 1 мкл составляло $200\,000 \pm 20\,000$. Для стимуляции тромбоцитов использовали Адреналин и АДФ (Sigma, США) в эффективной концентрации (EC₅₀) — 5 мкМ, вызывающей у здоровых лиц (10 доноров) агрегацию тромбоцитов (АТц) на уровне $50 \pm 5\%$. Параллельно установили и субпороговую дозу АДФ — 0,5 мкМ, которая вызывала агрегацию тромбоцитов у здоровых лиц на уровне $9,0 \pm 1,2\%$. Модулирующую роль субпороговой дозы АДФ в активации тромбоцитов анализировали при ее добавлении в суспензию тромбоцитов стимулированных агонистами (EC₅₀). Исследование АТц проводили на агрегометре фирмы Chrono-Log (США). Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета Med Stat.

Результаты и обсуждение

Первоначально следует ответить на вопрос — отличается ли реакция тромбоцитов на АДФ и Адреналин?

Установлено, что АДФ в концентрации EC₅₀ вызывал более высокую агрегацию тромбоцитов, чем Адреналин (соответственно $57,0 \pm 4,2\%$, и $22,0 \pm 4,3\%$; межгрупповая разница $p < 0,001$). Наличие связи между индукцией агрегации тромбоцитов обоими агонистами (показатель ранговой корреляции Спирмена $R=0.713$; $p < 0,01$) объясняется общим механизмом амплификации сигнала — секрецией эндогенного АДФ из α -гранул. Привлечение спектрального анализа частоты встречаемости признака показа-

ло, что агрегация тромбоцитов в ответ на введение АДФ (ЕС₅₀) представлена двумя выборками показателей: 1-я группа — АТ_ц 50% и выше, и 2-я группа — АТ_ц ниже 50%. В каждой из этих групп определили количество случаев, когда АТ_ц-индуцированная Адреналином была больше и меньше 50%. Такой подход позволяет сопоставить альтернативную реакцию тромбоцитов на Адреналин в зависимости от выраженности реакции тромбоцитов на АДФ. Оказалось, что в 1-й группе (35 случаев) когда АДФ-индуцированная АТ_ц (ЕС₅₀) была выше 50% — в 17 случаях (подгруппа А, 48,6%) ответ тромбоцитов на Адреналин (ЕС₅₀) также был выше 50% и в 18 случаях (подгруппа Б, 51,4%) ответ тромбоцитов на Адреналин (ЕС₅₀) был ниже 50%.

В подгруппе А реакция тромбоцитов на АДФ и Адреналин укладывается в картину гиперреактивности в отношении двух и более агонистов. Подтверждением этого феномена могут быть данные АТ_ц представленные в I-м квартиле: для АДФ — 60% и более, для Адреналина — 55% и выше. АДФ-индуцированная АТ_ц ($66,0 \pm 4,7\%$) статистически значимо выше, чем АТ_ц стимулированная Адреналином ($57,0 \pm 4,4\%$; $p < 0,05$). В подгруппе Б реакция тромбоцитов на оба агониста отличалась полярностью ответов. Введение в суспензию тромбоцитов АДФ сопровождалось гиперреактивностью сопоставимой с подгруппой А ($61,0 \pm 3,8\%$). АТ_ц-индуцированная Адреналином была ниже реакции тромбоцитов на АДФ ($20,0 \pm 4,1\%$; $p < 0,05$), причем в I-м и III-м квартилях АТ_ц находилась в диапазоне 13% — 33%, т.е. имела место выраженная гипореактивность. Отсутствие статистически значимой корреляционной связи между АТ_ц стимулированной АДФ и Адреналином ($R_0 = -0,017$; $p > 0,05$) свидетельствует, что причины выявленных различий следует искать на «входе» в систему регуляции функции тромбоцитов. В частности, это может быть — низкая чувствительность α_2 -адренорецепторов, но не «поломка» сигнальной системы обеспечивающей секрецию АДФ из α -гранул. В противном случае альтерация сигнальной системы связанной с Gi-белком сопровождалась бы низким ответом тромбоцитов на АДФ [3].

Во 2-й группе (20 случаев), для которой характерна АДФ-индуцированная АТ_ц (ЕС₅₀) меньше 50%, во всех исследованиях (100%) ответ тромбоцитов на Адреналин (ЕС₅₀) также был ниже 50%. Обращает на себя внимание, что АДФ-индуцированная АТ_ц ($26,5 \pm 3,7\%$) находилась в диапазоне от 13% до 40%, тогда как стимуляция тромбоцитов Адреналином ($5,5 \pm 3,9\%$) воспроизводилась в диапазоне от 2% до 20%. Существующая корреляционная связь ($R_0 = 0,765$; $p < 0,01$) подтверждает взаимосвязь гипореактивности в отношении двух агонистов,

один из которых — АДФ. Возникает резонный вопрос, что общего в механизмах реализации ответа тромбоцитов (АТ_ц) на Адреналин и АДФ? Ключевым моментом может быть адаптационная реакция, обеспечивающая модуляцию экзогенного сигнала (агониста), которая основана на секреции биологически активных веществ, в том числе эндогенного АДФ из α -гранул. В качестве аргументов можно принять — что такая адаптационная реакция тромбоцита (а) связана с воздействием внешних сигналов агонистов, напряжением сдвига потока крови и т.д.; (б) в основе ее реализации лежат индивидуальные морфологические и биохимические особенности (наличие органелл; архитектура цитоскелета; содержание гранул и экспрессия белков обеспечивающих процесс причаливания и секреции гранул; активность окислительного фосфорилирования и анаэробного гликолиза и т.д.); (в) позволяет достигнуть оптимального (нового стационарного) функционального состояния тромбоцита направленного на поддержание локального гомеостаза (индукция и лимитирование тромбогенеза, инициации воспаления, репарации в стенке сосуда и окружающих его тканях) [4].

Действительно, результат стимуляции тромбоцитов Адреналином, будет складываться из первичной волны агрегатограммы связанной с повышением уровня Ca^{+2} (т.е. прямым эффектом Адреналина) и вторичной волны обусловленной активацией пуриновых рецепторов посредством связывания секретиремого АДФ [5]. Очевидно, что в случае нарушения (снижения/повышения) чувствительности α_2 -адренорецепторов — стимуляция тромбоцитов изменяется, при этом может изменяться и адаптационная реакция. Следуя этой логике, можно предположить, что повышение адаптационной реакции (в частности, синтез пуриновых нуклеотидов и секреция АДФ) должно предшествовать усилению/восстановлению реактивности тромбоцитов на стимулирующий агонист. А значит, если смоделировать повышение адаптационной реакции Т_ц (повысить концентрацию АДФ) при низкой реактивности Т_ц на Адреналин, то можно ожидать усиления их адренореактивности. Для проверки данной гипотезы можно воспользоваться добавлением субпороговой дозы АДФ (0,5 мкМ) в суспензию тромбоцитов стимулированных Адреналином (ЕС₅₀).

В анализ включены по 14 исследований с исходной гипoadренореактивностью тромбоцитов в подгруппах А и Б (таблица). В подгруппе А, где, как уже отмечалось, воспроизводилась высокая АДФ-индуцированная АТ_ц, субпороговая доза АДФ (0,5 мкМ) воспроизводила АТ_ц на уровне $11,36 \pm 0,74\%$ (для сравнения в контроле $10,1 \pm 1,5\%$). При инкубации тромбоцитов с АДФ

Таблица

Параметры индуцированной агрегации при гипoadренореактивности тромбоцитов

Условия инкубации тромбоцитов	Подгруппа А	Подгруппа Б
Адреналин (EC ₅₀ —5 мкМ)	18,0 ± 2,7 (95% ДИ 13-22%)	13,5 ± 4,6 (95% ДИ 4-20%)
АДФ (EC ₅₀ —5 мкМ)	61,0 ± 4,48 (95% ДИ 57-66%)	29,0 ± 4,3*** (95% ДИ 13-39%)
АДФ (0,5 мкМ)	11,36 ± 0,74 (95% ДИ 9,7- 13%)	6,50 ± 0,48*** (95% ДИ 5,5-7,5%)
Адреналин (5 мкМ) + АДФ (0,5 мкМ)	31,8 ± 2,1 (95% ДИ 27,3-36,3%)	20,5 ± 3,6* (95% ДИ 17-26%)
АДФ (5 мкМ) + АДФ (0,5 мкМ)	61,5 ± 4,2 (95% ДИ 57-66%)	37,3 ± 2,8*** (95% ДИ 31,3-43,3%)
Примечание. * — статистическая значимость отличий от значений в подгруппе А на уровне p<0,05; *** — p<0,001		

в концентрации EC₅₀, дополнительное введение субпороговой дозы АДФ не сопровождалось изменением АТ_ц, что подтверждает оптимальный уровень секреции АДФ, а в сущности адаптационной реакции тромбоцитов. Повышение АТ_ц при инкубации с Адреналином (EC₅₀) и субпороговой дозой АДФ на 76,6% (p<0,001 по сравнению со значениями только Адреналина (EC₅₀), вероятно, связано с эффектом суммации сигналов активирующих внутриклеточные каскады Gi-ассоциированной сигнальной системы [6].

Подгруппа Б характеризуется низким функциональным ответом тромбоцитов на EC₅₀ Адреналина и АДФ, т.е. имеет место гипореактивность тромбоцитов по отношению к двум агонистам. По сути, это может отражать снижение функционирования сигнальных систем пуриновых рецепторов ассоциированных с Gi- и Gq-белками, и быть основой ограничения адаптационной реакции в подгруппе Б. В этом случае, можно ожидать восстановления реакции тромбоцитов на Адреналин при повышении концентрации АДФ. Обращает на себя внимание, что субпороговая доза АДФ воспроизводила в подгруппе Б агрегацию значительно ниже, чем в контроле и подгруппе А. При инкубации тромбоцитов с Адреналином и субпороговой дозой АДФ агрегация повысилась на 51,8% (p<0,001 по сравнению с таковой при стимуляции одним Адреналином), а прирост АТ_ц в случае воздействия АДФ (EC₅₀) и субпороговой дозы АДФ составила 29,6% (p<0,05 относительно исходного уровня АТ_ц, т.е. без добавления субпороговой дозы АДФ).

Полученные результаты порождают новый вопрос. Почему эффект субпороговой дозы АДФ сильнее проявляется в случае стимуляции тромбоцитов Адреналином, а не АДФ? Если при введении субпороговой дозы АДФ моделируется одинаковая адаптационная реакция, то и прирост АТ_ц на EC₅₀ обоих агонистов должен быть примерно одинаковым. Однако такой результат не выявляется ни в подгруппе Б, ни в подгруппе А. Очевидно, что разница в ответе на агонисты может быть только в случае, если имеются

различия в функционировании соответствующих сигнальных систем. Можно предположить, что имеется исходная низкая чувствительность пуриновых рецепторов и α₂-адренорецепторов, тогда (а) субпороговая доза АДФ повышает секрецию эндогенного адреналина, что и активирует α₂-адренорецепторы; или (б) поскольку чувствительность α₂-адренорецепторов больше чувствительности пуриновых рецепторов, то субпороговая доза АДФ может усиливать сигнал Адреналина вследствие суммации эффектов двух агонистов. Подтверждением низкой чувствительности пуриновых рецепторов может быть факт, что АДФ-индуцированная АТ_ц не восстанавливается до уровня нормореактивности (50%) при дополнительном введении субпороговой дозы АДФ.

Тем не менее, можно констатировать, что низкий исходный ответ тромбоцитов на Адреналин — может быть следствием сниженной секреции АДФ, т.е. лимитированной адаптационной реакции, поскольку введение субпороговой дозы АДФ обеспечивает повышение адренореактивности тромбоцитов. Вероятно, если патохимические нарушения, лежащие в основе формирования дизадаптации тромбоцитов, являются обратимыми, то возможно восстановление реакции тромбоцитов на Адреналин. В этом контексте ключевым вопросом при снижении функционального ответа тромбоцитов на Адреналин является установление обратимости нарушений адаптационной реакции тромбоцитов.

References

1. Kisialiou A., Grella R., Carrizo A., Pelone G., Bartolo M., Zucchella C., Rozza F., Grillea G., Colonnese C., Formisano L., Lembo M., Puca A.A., Vecchione C. Risk factors and acute ischemic stroke subtypes. *J Neurol Sci.* 2014; 339(1-2): 41-6. doi: 10.1016/j.jns.2014.01.014.
2. Richard S., Toussaint-Hacquard M., Fay R., Lacoour J.C., Ducrocq X., Laboratory effect on platelet activity within 24 h of the first 300-mg oral dose of aspirin given in hospital during the acute phase of ischemic cerebral events. *Cerebrovasc Dis.* 2012; 33(6): 574-8. doi: 10.1159/000338291
3. Sagdilek E., Buyukcoskun N.I., Ozluk K. Evaluation of platelet function and lack of response to epinephrine in pregnant women. *Int J Lab Hematol.* 2007; 29(4): 302-9.

4. Canobbio I., Guidetti G.F., Oliviero B., Mangano D., Vara D., Torti M., Pula G. Amyloid β -peptide-dependent activation of human platelets: essential role for Ca^{2+} and ADP in aggregation and thrombus formation. *Biochem J.* 2014; 462(3): 513-23. doi: 10.1042/BJ20140307.

5. Kovacs E.G., Katona E., Bereczky Z., Homorodi N., Balogh L., Toth E., Peterfy H., Kiss R.G., Edes I., Muszbek L. Evaluation of laboratory methods routinely used to

detect the effect of aspirin against new reference methods. *Thromb Res.* 2014; 133(5): 811-6. doi: 10.1016/j.thromres.2013.10.008.

6. Alarayed N.A., Graham B.R., Prichard B.N., Smith C.C. The potentiation of adrenaline-induced in vitro platelet aggregation by ADP, collagen and serotonin and its inhibition by naftopidil and doxazosin in normal human subjects. *Br J clin Pharmac.* 1995; 39: 369-74.

Сведения об авторах:

Мамедалиева Севиндж Али, ассистент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ДонНМУ;

Твердохлеб Татьяна Александровна, аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ДонНМУ;

Балыкина Анастасия Олеговна, ассистент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ДонНМУ.

© Коллектив авторов, 2017
УДК 618.14-018-02-092-07-085

Оразов М.Р.¹, Радзинский В.Е.¹, Хамошина М.Б.¹,
Носенко Е.Н.², Токаева Э.С.¹, Барсегян Л.К.¹, Закирова Я.Р.¹

Нарушение обмена гистамина в патогенезе хронической тазовой боли у пациенток с наружным генитальным эндометриозом

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² «Одесский национальный медицинский университет» МОЗ Украины, 65082, Украина, Одесса, пер. Валиховский, д. 2

Цель исследования — изучение особенностей обмена гистамина при хронической тазовой боли у пациенток с наружным генитальным эндометриозом. **Методика.** В сыворотке крови 100 пациенток методом высокоточного (в нг/мл) иммуноферментного твердофазного анализа определяли концентрацию гистамина. Использованы реактивы «Histamine ELISA», аппарат BAE-1000 Гистамин (Labor Diagnostika Nord — LDN, Германия). Оценка выраженности болевого синдрома осуществлялась по шкале ВАШ, оценка качества жизни — на основании опросника для оценки качества жизни при эндометриозе (EHR-30), оценка тревожности — опросника Spielberger—Ханина. **Результаты.** Показано статистически значимое повышение уровня гистамина у пациенток с высокой интенсивностью болевого синдрома. Женщины с наружным генитальным эндометриозом, сопровождающимся интенсивным болевым синдромом в 100% случаев обнаруживали высокие уровни ситуативной и личностной тревожности, тогда как, лишь у 40% женщин (n = 16) контрольной группы выявлен умеренный уровень тревожности. Депрессивные расстройства выявлены у 58,3% женщин с хронической тазовой болью (n = 35), из них основную часть (n = 20) составили женщины с выраженной степенью болевого синдрома по ВАШ. **Заключение.** Психоземotionalное состояние женщин с тазовой болью, ассоциированной с наружным генитальным эндометриозом, характеризуется высокими уровнями депрессивных и тревожных расстройств, значительным снижением уровня качества жизни. Выявлена прямая связь между интенсивностью болевого синдрома и уровнем гистамина в периферической крови пациенток с наружным генитальным эндометриозом.

Ключевые слова: наружный генитальный эндометриоз, хроническая тазовая боль, патогенез, гистамин.

Для цитирования: Оразов М.Р., Радзинский В.Е., Хамошина М.Б., Носенко Е.Н., Токаева Э.С., Барсегян Л.К., Закирова Я.Р. Нарушение обмена гистамина в патогенезе хронической тазовой боли у пациенток с наружным генитальным эндометриозом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61 (2): 56—60.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.56-60

Для корреспонденции: Оразов Мекан Рахимбердыевич, доктор мед. наук, доцент каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: omekan@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Поступила 17.12.2016

Orazov M.R.¹, Radzinskiy V.Y.¹, Khamoshina M.B.¹,
Nosenko E.N.², Tokaeva E.S.¹, Barsegyan L.K.¹, Zakirova Y.R.¹

Histamine metabolism disorder in pathogenesis of chronic pelvic pain in patients with external genital endometriosis

¹ The Russian University of Peoples' Friendship, 117198, Moscow, str. Miklukho-Maklaya, 6

² Odessa National Medical University, Ukraine, 65082, Ukraine, Odessa, lane Valihovsky, 2

Objective. To study features of histamine metabolism in patients with chronic pelvic pain associated with external genital endometriosis. **Methods.** For quantitative assessment of histamine level in peripheral blood was taken from 100 patients which than was centrifuged. In blood serum histamine concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay method with reagents «Histamine ELISA» on the machine BAE-1000 Histamine (Labor Diagnostika Nord — LDN, Germany). A pain syndrome was assessed by Visual Analog Scale (VAS), quality of life assessment — by Endometriosis Health Profile Questionnaire (EHR-30), level of anxiety was determined by Spielberger—Khanin questionnaire. **The results.** Showed statistically higher histamine level in patients with severe pain according to VAS. After assessment of results obtained from Spielberger—Khanin questionnaire 100% experimental group's women with external genital endometriosis (n = 60) were noted to be have high level of state and trait anxiety, then 40% women of control group (n = 16) have moderate level of anxiety. The incidence of depression in women with chronic pelvic pain was 58.3% (n = 35) and the main part (n = 20) were women with severe stage of pelvic pain according to VAS.

Conclusions. Psycho emotional condition of women with external genital endometriosis associated pelvic pain characterized by higher depression and anxiety levels, with significant decrease quality of life. Direct relationship also was found between pain syndrome intensity and histamine level in peripheral blood in patients with external genital endometriosis.

Keywords: external genital endometriosis, chronic pelvic pain, pathogenesis, histamine.

For citation: Orazov M.R., Radzinskiy V. Y., Khamoshina M.B., Nosenko E.N., Tokaeva E.S., Barsegyan L.K., Zakirova Y.R. Histamine metabolism disorder in pathogenesis of chronic pelvic pain in patients with external genital endometriosis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(2): 56—60.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.56-60

For correspondence: Mekan R. Orazov, MD, associate Professor in the Department of obstetrics and gynecology with course of Perinatology of the Russian University of friendship of peoples; the branch of specialization is obstetrics and gynecology; address: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., h. 6, e-mail: omekan@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare that there is no potential conflict of interest.

Received 17.12.2016

Введение

Наиболее частым и специфичным симптомом наружного генитального эндометриоза (НГЭ) является боль [1—4]. По данным Chopin и соавт. [5], Laufer и соавт. [6] и Carter [7], эндометриоз встречается в 30—80% случаев среди женщин, которым была произведена лапароскопия по поводу хронической тазовой боли (ХТБ). Безболевого формы эндометриоза встречаются не более чем у 5% женщин с эндометриозом [8]. ХТБ при эндометриозе свойственно разнообразие [9, 10], которое гораздо больше зависит от локализации процесса, чем от степени его распространения. Боль при НГЭ может быть циклической (дисменорея) и постоянной, а также может быть связана с половым актом (диспареуния), иррадиировать в поясничную область, крестец, копчик, задний проход, промежность.

Патогенез ХТБ весьма неоднозначен и связан с формированием патологической алгической системы, являющейся морфофункциональной основой болевого поведения, характерного для пациентов с НГЭ. Ноцицептивные, невропатические и психогенные компоненты патофизиологических механизмов боли могут быть вовлечены в патогенез тазовой боли, связанной с НГЭ. Для эндометриоза характерны два потенцирующие друг друга процесса: усиление иннервации (нейрогенез) и васкуляризации (неоангиогенез). Ноцицептивная боль, возникающая вследствие иммунного воспаления, постепенно приводит к формированию невропатической боли, конечным этапом которой является центральная сенситизация, являющаяся самым важным механизмом ХТБ. Локальные воспалительные процессы приводят к развитию и персистенции периферического нейровоспаления, связанного с активацией клеток микроглии и астроцитов, называемых «иммуноцитами ЦНС» (центральное нейровоспаление). Данные исследовательской группы As-Sanie et al. продемонстрировали снижение объема серого вещества у пациенток с ХТБ связанной с эндометриозом, в отделах головного мозга, ответственных за восприя-

тие боли (левый таламус, левая поясная извилина, правый путамен, правая инсула). У пациенток с НГЭ, но без ХТБ изменений объема серого вещества обнаружено не было [11].

Несостоятельность эндогенных анальгетических систем является значимым фактором в формировании ХТБ. Нарушение центрального торможения ноцицептивных нейронов считается причиной наличия невропатической составляющей боли при НГЭ. Нисходящее супраспинальное торможение реализуется через норадреналин-, опиоид-, серотонин- и ГАМКергические нейротрансмиттерные системы [12, 13]. Основная из них, опиоидергическая система, образована нейронами, тело и отростки которых содержат опиоидные пептиды (бета-эндорфин, мет-энкефалин, лей-энкефалин, диноρφин) [14, 15]. Связываясь с определёнными группами специфических опиоидных рецепторов (мю-, дельта- и каппа- опиоидные рецепторы), 90% которых расположено в дорзальных рогах спинного мозга, они способствуют высвобождению различных химических веществ (гамма-аминомасляная кислота), тормозящих передачу болевых импульсов.

Нарушение обмена гистамина играет значительную роль в поддержании и формировании болевой доминанты в надсегментарных структурах ЦНС, а также в формировании психогенного компонента боли. Гистамин, являясь ноциогенным, провоцирующим боль соединением, высвобождаясь из тучных клеток и тромбоцитов, способен вызывать чувство боли, потенцируя в том числе и ноциальный эффект брадикинина. В настоящее время гистамину отводится важная роль в деятельности ноцицептивной системы, центральной регуляции болевой чувствительности [16—18].

У 77,2% пациенток с эндометриозом отмечаются психоэмоциональные нарушения [19], среди них неустойчивое настроение, раздражительность, эмоциональная лабильность (55,6%), тревожность, фобии, бессонница (12,3%), ипохондрия, истерия, депрессия (9,3%). Длительное существование симптомов эндо-

метриоза формирует психопатическую личность, для которой характерны такие расстройства, как аутизация, аффективная ригидность и интравертированность [20]. Психопатологические реакции при НГЭ, ассоциированном с ХТБ, расцениваются как вторичные, усугубляющие субъективное ощущение боли, сопровождающиеся вегетативной дисфункцией и приводящие к дезадаптации женщин [21, 22].

Цель исследования — определение уровня гистамина, оценка выраженности болевого и депрессивного синдромов у женщин с НГЭ, сопровождающимся ХТБ.

Методика

В исследование включено 100 пациенток репродуктивного возраста от 18 до 45 лет, с наружным генитальным эндометриозом. Из них основную группу составили 60 пациенток с тазовой болью, обусловленной наружным генитальным эндометриозом, в группу контроля было включено 40 женщин с наружным генитальным эндометриозом, без болевого синдрома. Диагноз *эндометриоз* в обеих группах был подтвержден лапароскопическим и морфологическим исследованием.

Количественное содержание медиатора ноцицептивной системы головного мозга гистамина в сыворотке крови определяли методом высокоточного (в нг/мл) иммуноферментного твердофазного анализа. У всех обследуемых утром в 08:00 натощак забиралась кровь из кубитальной вены в объеме 5,0 мл, после чего путем центрифугирования при 1000 оборотах в течение 10 мин получали сыворотку. Для определения концентрации гистамина в сыворотке крови использовали иммуноферментный набор реактивов фирмы «Histamine ELISA», аппарат ВАЕ-1000 Гистамин (Labor Diagnostika Nord — LDN, Германия).

Повышение концентрации гистамина в сыворотке крови в пределах 1,16—2,0 нг/мл характеризовал болевой синдром легкой степени, что соответствует интенсивности боли легкой степени (2—3 балла по международной визуальной аналоговой шкале «ВАШ»). Концентрация гистамина от 2,1 нг/мл до 3,0 нг/мл соответствовала умеренным болям средней степени интенсивности (4—6 баллов по ВАШ). Содержание гистамина выше 3,0 нг/мл характеризует боль высокой интенсивности (7—10 баллов по ВАШ). Концентрация гистамина 0—1 нг/мл указывала на отсутствие болевого синдрома.

Для характеристики болевого синдрома использовалась визуальная аналоговая шкала (Visual Analog Scale, VAS), ВАШ, оценка депрессивного синдрома осуществлялась на основании опросника для оценки качества жизни при эндометриозе (ЕНР-30), оценку тревожности проводили по опроснику Спилбергера—Ханина.

Интенсивность боли оценивалась в баллах (от 0 до 10) по методике субъективной оценки боли — визуальная аналоговая шкала (ВАШ) (Huskisson E.C., 1974), представляющая собой отрезок прямой линии длиной 10 см, на одном конце (слева) которого отмечена точка отсутствия боли (0 баллов), а на другом конце (справа) — трудно переносимая боль (10 баллов).

Для оценки качества жизни при эндометриозе использовался Опросник ЕНР-30, который включает 30 вопросов, отражающих жизненную активность, степень уверенности в себе, отношение к окружающим людям, социальное функционирование, самооценку.

Опросник Спилбергера—Ханина (Шкала тревоги Спилбергера (State-Trait Anxiety Inventory — STAI), разработан Ч.Д.Спилбергером (1976) и адаптирован Ю.Л.Ханиным (1978)). Единственная методика, которая позволяет дифференцировано измерять тревожность и как личностное свойство, и как состояние, связанное с текущей ситуацией. Тревожность ситуативная (СТ) возникает как реакция на стрессы, чаще всего социально-психологического плана (ожидание агрессивной реакции, угроза самоуважению и т.д.). Тревожность личностная (ЛТ) дает представление о подверженности личности воздействию тех или иных стрессоров по причине своих индивидуальных особенностей. Ситуативная и личностная тревожность связаны с видами темперамента. Так, высокий уровень ситуативной тревожности характерен для меланхоликов, средний — для флегматика, низкий — для холерика и сангвиника. Высокий уровень личностной тревожности, соответствующий высокой личностной активности, наблюдается у сангвиников и меланхоликов, низкая — флегматиков и холериков. Опросник состоит из 2 частей: I часть — шкала самооценки СТ, II часть — шкала самооценки ЛТ. Каждая часть состоит из 20 суждений. Обработка результатов проводилась при помощи ключа. При интерпретации показателей использовали следующие оценки тревожности: до 30 баллов — низкая, 31—44 балла — умеренная, 45 и более — высокая.

Средний возраст женщин составил $31,0 \pm 2,0$ года. Критерии включения в исследование — тазовая боль, обусловленная НГЭ, подтвержденном лапароскопическим и морфологическим исследованием. Критерии исключения — иные гинекологические и негинекологические заболевания, сопровождающиеся синдромом тазовой боли.

Статистическую обработку данных производили на персональном компьютере с использованием пакета программ Biostatistics (версия 4.03) для Windows. Вычисляли среднюю арифметическую (M) и среднюю ошибку средней арифметической (m). Различия

между группами устанавливали с учетом t-критерия Стьюдента. Статистический показатель считали значимым при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для оценки состояния антиноцицептивного фактора формирования и поддержания ХТБ было исследовано содержание гистамина в периферической крови больных НГЭ. В обеих клинических группах уровень гистамина периферической крови был статистически значимо повышен. Уровень гистамина у пациенток основной группы соответствовал показателям ХТБ слабой, умеренной и выраженной интенсивности (медианы равны $1,36 \pm 0,7$ нг/мл, $2,41 \pm 0,8$ нг/мл и $3,26 \pm 0,2$ нг/мл соответственно). В контрольной группе уровень гистамина составил $0,5 \pm 0,3$ нг/мл. Таким образом, у пациенток с НГЭ и обусловленной им ХТБ выявлено повышение содержания гистамина в сыворотке крови, относительно группы контроля. Гистамин является биогенным амином, содержащимся главным образом в базофильных лейкоцитах, тучных клетках и тромбоцитах, увеличение его содержания в плазме крови у женщин с эндометриозом также объясняется длительной сенсibilизацией к тканям эндометрия, запускающей механизм синтеза IgE, который фиксируется на поверхности базофилов периферической крови, тучных клетках. При контакте с находящимися в брюшной полости частичками эндометрия данные клетки дегранулируют с последующим высвобождением гистамина.

В обеих группах для оценки выраженности боли применялась визуальная аналоговая шкала (ВАШ). Анализ интенсивности боли по ВАШ выявил, что жалобы на боль предъявляли все женщины основной группы ($n = 60$). Из 60 женщин основной группы — 20 (33,3%) отмечали боль выраженной степени тяжести, 25 женщин (41,6%) — умеренной степени и 15 женщин (25,1%) — слабой степени тяжести. Большое значение в формировании болевого ощущения имеют особенности личности (тревожность, демонстративность, ипохондричность, мнительность), эмоциональное состояние (горе, радость, гнев, обида, вина, и т.д.), окружающая среда, особенности культуры. Следует отметить, что существуют ситуации, при которых выявляются соматические повреждения и нарушения структуры соматосенсорной нервной системы, однако интенсивность боли при этом значительно выше степени повреждения. Особенности личности, по данным многих исследователей, имеют большое значение в развитии и течении боли, определяют реакцию на боль и болевое поведение, эмоциональную окраску боли, способность переносить болевые стимулы и способность преодолевать боль. При оценке результатов, полученных по опросникам

Спилберга—Ханина, отмечено, что женщины с наружным генитальным эндометриозом имели высокие уровни ситуативной и личностной тревожности в 100% случаев в основной группе ($n = 60$), тогда как у женщин контрольной группы выявлены умеренные уровни тревожности лишь в 40% случаев ($n = 16$). Также нужно отметить, что в основной группе наибольшее количество баллов было у женщин с выраженной степенью болевого синдрома. Таким образом, реактивная тревожность и личностная тревожность у всех пациенток с ХТБ, обусловленной НГЭ, была повышена, а показатели качества жизни прогрессивно уменьшались в зависимости от интенсивности и характера течения болевого синдрома.

В настоящее время существует мнение о сочетании хронических болей с эмоциональными расстройствами (депрессия, тревожность). Депрессии являются наиболее частыми проявлениями психогенной боли, они могут возникать одновременно, или одно опережать проявление другого. Частота встречаемости депрессивных расстройств у женщин с ХТБ составило 58,3% ($n = 35$), из них основную часть ($n = 20$), составили женщины с выраженной степенью болевого синдрома по ВАШ.

Заключение

Хроническая тазовая боль — тяжелое страдание, которое приводит к социальной дезадаптации, существенно ухудшая качество жизни пациента. По данным ВОЗ, ХТБ страдают около 15% женщин репродуктивного возраста.

Учитывая тот факт, что гистамин представляется одним из наиболее значимых медиаторов психоэмоциональной системы головного мозга, следовательно, нарушение его обмена является важным биохимическим фактором в развитии эндометриоз-ассоциированной тазовой боли. Длительно существующая тазовая боль при НГЭ приводит к формированию психогенного компонента боли с нарушением психоэмоционального статуса, что существенно снижает качество жизни пациентов. В итоге, если иммунное воспаление инициирует и потенцирует ноцицептивный и невропатический компонент болевого синдрома, то гистамин активно участвует в формировании всех компонентов ХТБ.

Таким образом, результаты исследования показали, что психоэмоциональное состояние женщин с тазовой болью, ассоциированной с наружным генитальным эндометриозом, характеризуется высокими уровнями депрессивных и тревожных расстройств, значительным снижением уровня качества жизни. Выявлена прямая связь между интенсивностью болевого синдрома и уровнем гистамина в периферической крови пациенток с НГЭ.

References

1. Radzinskiy V.E., Orazov M.R., Nosenko O.M. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in uterine tissues as one of the mechanisms of algogenesis in adenomyosis, associated with chronic pelvic pain. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 1: 32-5.
2. Orazov M.R., Radzinskiy V.E., Nosenko O.M. The role of inflammatory and immune reactivity in developing pain in adenomyosis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 1: 40-4.
3. Adamyan L.V., Osipova A.A., Sonova M.M. Evolution of hormone therapy of endometriosis. *Problemy reproduktivnoy meditsiny*. 2006; 5: 11-6. (in Russian)
4. Adamyan L.V. Clinical and embryological features of endometriosis associated infertility (literature review). *Problemy reproduktivnoy meditsiny*. 2010; 5: 47-51. (in Russian)
5. Tsvelyov Yu.V., Abashin V.G., Shmidt A.A. Endometriosis: current judgments upon etiology, terminology and classification. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2007; 4: 42-7
6. Chopin N., Ballester M., Borghese B., Fauconnier A., Foulot H., Malartic C., Chapron C. Relation between severity of dysmenorrhea and endometrioma. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 2006; 85(11): 1375-80.
7. Laufer M.R., Goitein L., Bush M. Prevalence of endometriosis in adolescent girls with chronic pelvic pain not responding to conventional therapy. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 1997; 10(4): 199-202.
8. Carter J.E. Combined hysteroscopic and laparoscopic findings in patients with chronic pelvic pain. *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparoscop.* 1994; 2: 43-7.
9. Howard, F.M. Endometriosis and mechanisms of pelvic pain. *J. Minim. Invasive Gynecol.* 2009; 16(5): 540-50.
10. J. Leserman, D. Zolnoun, S. Meltzer-Brody. Identification of diagnostic subtypes of chronic pelvic pain and how subtypes differ in health status and trauma history. *Am. J. Obstet Gynecol.* 2006; 195(2): 554-60.
11. B.I. Karp, N. Sinaii, L.K. Nieman. Migraine in women with chronic pelvic pain with and without endometriosis. *Fertil. Steril.* 2011; 95(3): 895-9.
12. S. As-Sanie, R. E. Harris, V. Napadow. Changes in regional gray matter volume in women with chronic pelvic pain: a voxel-based morphometry study. 2012; 153(5): 1006-14.
13. Check J.H. Chronic pelvic pain syndromes — traditional and novel therapies: part I surgical therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2011; 38(1):10-3.
14. Danilov A.B., Davidov O.S. *Neuropathic pain. [Neuropaticheskaya bol]*. Moscow: Borges; 2007. (in Russian)
15. Strizhakov A.N., Podzolkova N.M., Glazkova O.L. Quality of life of patients with endometriosis and chronic pelvic pain syndrome at hormonal therapy: problems and perspectives. *Vestnik akusherstva i ginekologii*. 2000; № 1: 87-90.
16. Tchernishova I.V., Sandakova E.A., Shutov A.A. Serotonin-transport system condition at patients with genital endometriosis. *Uralskiy meditsinskiy journal*. 2013; №4: 70-75.
17. Karakulova Y.V., Batueva E.A. The role of antinociceptive serotonergic system in pathogenesis and treatment of the diabetic peripheral neuropathy. *Uralskiy meditsinskiy journal*. 2012; 5: 53-7.
18. Kogan E.A., Paramonova N.B., Nizyaeva N.V., Ezhova L.S., Phaizullina N.M. *Mechanism and pathways of generalization of endometriotic disease. Materialy VIII Mezhdunarodnogo kongressa po Reproduktivnoy Meditsine*. 2013; 326-8.
19. Kirmayer LJ, Groleau D, Looper KJ et al. Explaining medically unexplained symptoms. *Canadian Journal of Psychiatry*. 2004; 49, 663-71.
20. Weijenborg, P.T., Ter Kuile M.M., Stones W. A cognitive behavioural based assessment of women with chronic pelvic pain. *J. Psychosom. Obstet. Gynaecol.* 2009; 30(4): 262-8.
21. Herbert D.L., Lucke J.C., Dobson A.J. Depression: an emotional obstacle to seeking medical advice for infertility. *Fertil. Steril.* 2010; 94(5): 1817-21.
22. Champaneria R., Daniels J.P., Raza A. Psychological therapies for chronic pelvic pain: systematic review of randomized controlled trials. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 2012; 91(3): 281-6.

Сведения об авторах

Радзинский Виктор Евсеевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов; отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: radzinsky@mail.ru

Хамошина Марина Борисовна, д.м.н., профессор акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов; отрасль специализации — акушерство и гинекология, email: mbax999@yandex.ru

Носенко Елена Николаевна, д. мед. н., профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии Одесского национального медицинского университета, отрасль специализации — акушерство и гинекология; e-mail: nosenko.ole-na@gmail.com

Токаева Эльвира Сериковна, аспирант кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: tokaeva.e@yandex.ru

Барсемян Лилит Корюновна, аспирант кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: lilianna_91@mail.ru

Закирова Яна Рывхатевна, аспирант кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: bikmaeva90@mail.ru

© П.Н. Савилов, 2017
УДК 616.36-002.-072.7-092.9

Савилов П.Н.

Влияние частичной гепатэктомии на аммиакдетоксикационную функцию печени при хроническом тетрахлорметановом гепатите

ТОГБУЗ «Тамбовская ЦРБ», 393524, Тамбовская обл., Россия, Пригородное, ул. Полевая, д. 4

ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», 394000, г. Воронеж, Россия, ул. Студенческая, д. 10

Цель исследования — изучение влияния частичной гепатэктомии (ЧГЭ) на основные пути детоксикации аммиака в печени (синтез мочевины и глутамина) при хроническом тетрахлорметановом (CCl_4) гепатите. **Методика.** Опыты проведены на 165 беспородных белых крысах (самках) массой 180—220 г. Хронический CCl_4 -гепатит воспроизводили подкожной инъекцией 50% раствора CCl_4 на оливковом масле (0,1 мл/100 г массы тела, через сутки с 2 двухнедельными перерывами между 6—7 и 13—14 инъекциями). На 65-е (последние) сутки введения CCl_4 проводили ЧГЭ электроножом, удаляя часть левой доли печени (15—20% от массы органа). Печень животных исследовали на 3-и, 7-е и 14-е сут. после частичной гепатэктомии или лапаротомии («ложнооперированные» животные). В субклеточных фракциях печени исследовали активность фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ), глутаматдегидрогеназы (ГДГ), глутминсинтетазы (ГС), аргиназы. В ткани печени исследовали содержание аммиака, глутамина, глутамата и мочевины. **Результаты.** Установлено, что на 65-е сут. развития CCl_4 -гепатита в ткани печени снижалась концентрация аммиака, глутамина, глутамата, мочевины, а также активность ГС, ГДГ и аргиназы. Активность ФЗГ оставалась в пределах нормы. Применение ЧГЭ на фоне хронического CCl_4 -гепатита оказывает кратковременное (на 3-и сут.) стимулирующее влияние на активность ФЗГ, ГС и отсроченное (на 14-е сут.) ингибирующее влияние на активность ГДГ. Это сопровождалось увеличением концентрации в печени аммиака в течение 14-и сут. послеоперационного периода на фоне сохранения сниженных концентраций в ней глутамина и глутамата. Стимулирующее влияние ЧГЭ на активность аргиназы сохраняется к 14-м сут. послеоперационного периода, однако концентрация мочевины в печени оставалась ниже нормы. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что применение частичной гепатэктомии на фоне хронического гепатита усиливает патогенное влияние CCl_4 на аммиакобезвреживающую функцию печени.

Ключевые слова: гепатит; резекция печени; детоксикация аммиака; глутамин; мочевина.

Для цитирования: Савилов П.Н. Влияние частичной гепатэктомии на аммиакдетоксикационную функцию печени при хроническом тетрахлорметановом гепатите *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 61—66. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.61-66

Для корреспонденции: Савилов Павел Николаевич, доктор мед. наук, проф., врач анестезиолог-реаниматолог отделения «Операционный блок с палатой реаниматологии и интенсивной терапии» ТОГБУЗ «Тамбовская ЦРБ», e-mail: p_savilov@rambler.ru

Конфликт интересов. Материалы статьи нигде ранее не публиковались

Благодарность. Считаю своим долгом выразить глубокую признательность моему учителю заслуженному деятелю науки РФ, профессору Аполлиарию Николаевичу Леонову за возможность проведения, описанных в данной статье исследований в лаборатории его кафедры и ценные советы при обсуждении полученных результатов.

Поступила 04.05.2016

Savilov P.N.

Influence of partial hepatectomy on ammoniumdetoxications function of liver at chronic tetrachlorcarbon hepatitis

TRSIH «Tambovskaya CRH», Tambov region, v.P. Prigorodnoe, ul. Polevaya, 4 393524, Russia

SBEI HRE «Voronezh state medical University n. a. N.N. Burdenko», Voronezh, ul. Studencheskaya, 10, 39400, Russia

The purpose. To study the effect of partial hepatectomy (PH) on the main ways of ammonia detoxication in the liver (synthesis of urea and glutamine) in chronic tetrachlorcarbon (CCl_4) hepatitis. **Methods.** The experiments were performed on 165 white outbred rats (females) weighing 180—220 g. Chronic CCl_4 -hepatitis was reproduced by subcutaneous injection of 50% CCl_4 solution in olive oil (0.1 ml/100g of body weight, 65 days, through the day with two two-week breaks between 6—7 and 13—14 injections). PH conducted electrocautery, removing part of the left lobe of the liver (15—20% by

weight of the body) to 65th (and last) day of the introduction of the CCl_4 . Animals were studied after 65 days of development of CCl_4 -hepatitis on day 3, 7 and 14 days after laparotomy («falsely operated» animals) and partial hepatectomy. In subcellular fractions of the liver investigated the activity of phosphatdependent glutaminase (FDG), glutamatdehydrogenaze (GDG), glutaminsintetaze (GS), arginase. In the liver tissue investigated the content of ammonia, glutamine, glutamate and urea. **Results.** Found that on 65-th day of the development of CCl_4 in the liver decreases the concentration of ammonia, glutamine, glutamate, urea, and activity of GS, GDG and arginase. Activity FDG was not changed. The use of PH on the background of chronic CCl_4 -hepatitis has a short-term (3 days) a stimulating effect on the activity FDG, GS, postponed (14 days) the inhibitory effect on the activity of GDG. This was accompanied by an increase in the concentration in the liver of ammonia within 14 days of the postoperative period on the background of maintaining reduced concentrations of glutamine and glutamate it. The stimulatory effect of CHA on the activity of arginase is saved to the 14th day of the postoperative period, however, the concentration of urea in the liver remained below normal. **Conclusions.** The obtained results show that CGA on the background of chronic hepatitis increases the pathological impact of CCl_4 on amniocentesis liver function

Keywords: hepatitis, liver resection, detoxification of ammonia, glutamine, urea.

For citation: Savilov P.N. Influence of partial hepatectomie on ammoniumdetoxications function on liver at chronic tetraclorcarbon hepatitis. *Patologithcheskaya Physiologiya I Eksperimentalnaya Terapiya (Pathological physiology and experimental therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(2): 61—66. (in Russ.) DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.61-66

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

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship

Information about authors:

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

Введение

Одним из хирургических способов лечения хронических гепатитов и циррозов печени является частичная гепатэктомия (ЧГЭ) [1, 2], которая, стимулируя митотическую активность гепатоцитов [3], тормозит патологическое коллагенообразование в поражённом органе, одновременно активируя резорбцию новообразованной соединительной ткани [4]. Однако частое прогрессирование в послеоперационном периоде печёночной недостаточности [2] препятствует широкому внедрению данного метода лечения в клиническую практику.

Известно, что ведущим звеном в патогенезе печёночной недостаточности является нарушение аммиакобезвреживающей функции гепатоцитов [5], нарушение которой установлено как после удаления части здоровой печени [6], так и при хроническом токсическом гепатите [7]. В последнем случае она не восстанавливается в течение 14 сут. после прекращения введения гепатоксина в организм [7]. Между тем, состояние основных путей детоксикации аммиака в печени (образование глутамина и синтез мочевины) после ЧГЭ на фоне хронического гепатита не исследовано.

Цель исследования — изучение влияния ЧГЭ на основные пути детоксикации аммиака в печени (образование глутамина и синтез мочевины) при экспериментальном хроническом гепатите.

Методика

Опыты проведены на 163 беспородных белых крысах (самках) массой 180—220 г, разводимых в виварии Воронежской государственной медицинской академии от потомства, привезённого из питомника лабораторных животных РАМН «Белый Мох» (Московская обл., Павло-Посадский район. г.Электророгорск). Все животные находились в одинаковых стационарных условиях содержания при температуре 17—24°C и относительной влажности 50—70%. Питание проводили 2 раза в сутки натуральным кормом в соответствии с нормами для лабораторных животных (Приказ МЗ СССР N 163 от 10.03.66 «О нормах кормления лабораторных животных и продуцентов»). Состояние здоровья животных оценивали путём ежедневного наблюдения за пищевой и питьевой активностью, осмотра кожных покровов и слизистых. Для эксперимента отбирали животных, прошедших в условиях кафедрального вивария 10-суточный карантин. Хронический гепатит воспроизводили подкожным введением 50% раствора тетрахлорметана (CCl_4) на оливковом масле в дозе 0,1 мл/100 г массы тела в течение 65 сут. через день с 2 двухнедельными перерывами между 6—7-й и 13—14-й инъекциями. ЧГЭ осуществляли на 65-е сут. моделирования гепатита сразу после последней инъекции, удаляя электронжом часть левой

доли печени (15—20% от массы органа). Работа с экспериментальными животными проводилась с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР от 12.08.77 г. (N 755). Оперативные вмешательства (лапаротомия и частичная гепатэктомия) проводились под эфирным наркозом. Выведение животных из опыта осуществляли декапитацией под этиминаловым наркозом (40 мг этиминала—натрия/кг массы тела).

Животные были разделены на 8 серий. 1-я серия — интактные животные (норма); 2-я серия — животные, исследованные на 65-е сутки введения CCl_4 (конец затравки); 3-я, 4-я и 5-я серии — «ложнооперированные» животные с хроническим CCl_4 -гепатитом, исследованные соответственно на 3-и, 7-е и 14-е сутки отмены CCl_4 и лапаротомии. Эти серии служили контролем «чистого» эффекта влияния ЧГЭ на исследуемые показатели. 6-я, 7-я и 8-я серии — животные с хроническим CCl_4 -гепатитом, исследованные соответственно на 3-и, 7-е и 14-е сут. после ЧГЭ. Объектом исследования служила средняя (неоперируемая) доля печени. Для определения азотистых метаболитов печень предварительно перфузировали 0,145М раствором KCl , затем замораживали в жидком азоте и растирали до порошка, который использовали для приготовления 10% гомогената в 60% растворе трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Гомогенат экстрагировали на холоду в течение 30 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин, полученный супернатант использовали для определения содержания аммиака, глутамина, глутамата и мочевины. Содержание аммиака в пробах определяли микродиффузионным методом [8], глутамина — методом кислотного гидролиза [9], глутамата — ферментативным методом с глутаматдегидрогеназой (ГДГ) [10], мочевины — диацетилмоноксимвым методом [11]. Для определения активности ферментов печень предварительно перфузировали через портальную вену охлажденным раствором KCl (0,125 N) и гомогенизировали в растворе сахарозы (0,25 M) в соотно-

шении 1:9 с добавлением ЭДТА в конечной концентрации 1мМ. Субклеточные фракции гепатоцитов выделяли методом дифференциального центрифугирования [12] на центрифуге вакуумной рефрижераторной «ЦВР-1» при $t = +2-(+5)^\circ\text{C}$. Для этого первоначально надосадочную жидкость центрифугировали 10 мин при 1000g. После этого вновь полученную надосадочную жидкость (5 мл) подвергали повторному центрифугированию в течение 10 мин при 16000g для получения осадка, содержащего митохондриальную фракцию гепатоцитов. Надосадочную жидкость (5 мл), полученную после второго центрифугирования, использовали для выделения микросомальной фракции, подвергая её центрифугированию в течение 120 мин при 45000g. Осадок, содержащий митохондриальную фракцию гепатоцитов, очищали от примесей двухкратным ресуспензированием в 5 мл 0,25 M раствора сахарозы ($\text{pH} = 7,4$) и центрифугировали при 22000g течение 10 мин.

В митохондриальной фракции определяли активность фосфатзависимой глутамины (ФЗГ) [13] и ГДГ [14], в микросомальной фракции — активность глутаминсинтетазы (ГС) [15], в цитозольной фракции гепатоцитов — активность аргиназы (цАЭ) [16]. Содержание белка в субклеточных фракциях определяли по методу Лоури [17]. Содержание метаболитов выражали в ммоль/кг влажной ткани, активность ферментов в нмоль/мг белка /с. Статистический анализ результатов исследований проведен с использованием t-критерия Стьюдента после проверки выборок на нормальное распределение и с учетом коэффициента Ньюмана—Кейлса для множественных сравнений [18].

Результаты и обсуждение

На момент оперативного воздействия (65-е сут. развития хронического CCl_4 -гепатита) в печени обнаружено снижение концентрации глутамина и мочевины, соответственно, на 49% и 37% (табл. 1) и угнетение активности ГС на 65%, аргиназы на 58%

Таблица 1

Содержание аммиака, глутамина, глутамата, мочевины (ммоль/кг влажной ткани) в печени после частичной гепатэктомии на фоне хронического CCl_4 -гепатита, (M ± m)

Показатели	Норма (n = 10)	Конец затравки (n = 10)	Сутки после частичной гепатэктомии		
			3 (n = 10)	7 (n = 10)	14 (n = 10)
Аммиак	0,94 ± 0,04	0,6 ± 0,04*	1,55 ± 0,13*#	1,73 ± 0,12*#	1,82 ± 0,18*#
Глутамин	3,56 ± 0,16	1,83 ± 0,1*	2,44 ± 0,11*#	2,14 ± 0,14*	1,99 ± 0,23*
Глутамат	2,0 ± 0,09	1,7 ± 0,11*	1,5 ± 0,15*	2,12 ± 0,18#	1,55 ± 0,13*
Мочевина	4,64 ± 0,16	2,94 ± 0,14*	3,8 ± 0,3*#	3,52 ± 0,2*	3,84 ± 0,21*#

Примечание. * ($p < 0,05$) — статистическая значимость различий по сравнению с нормой; # — по сравнению с концом затравки (65-е сут. введения CCl_4); n — число животных в каждой серии опытов.

(табл. 2). Это указывает на нарушение к моменту оперативного вмешательства как обратимого (образование глутамина), так и необратимого (синтез мочевины) путей нейтрализации аммиака в гепатоцитах.

Несмотря на это, концентрация аммиака в печени на 65-е сут. развития СС14-гепатита не увеличивалась, а снижалась на 37% (табл. 3), хотя в данный период имело место развитие артериальной гипергаммониемии [19]. Одной из причин этого, следует рассматривать вазоконстрикцию артериальных капилляров и портальных венул, развивающуюся в ответ на введение СС14 [20]. Отмена гепатотоксина вызывала не только увеличение печёночного кровотока, но и накопление гепатоцитами аммиака [7].

Общеизвестно, что содержание аммиака в клетке определяется соотношением реакций образования и связывания. В гепатоцитах перипортальной зоны долики печени ведущей реакцией внутриклеточного амониогенеза является дезамидирование глутамината [21], поступающего из других органов. Данная реакция катализируется ФЗГ [22] и сопровождается образованием как аминокислоты, вовлекаемой в орнитинный цикл синтеза мочевины, так и глутамата. Обнаруженное на 65-е сут. развития СС14-гепатита снижение на 35% активности ФЗГ гепатоцитов (табл. 2) указывает на торможение дезамидирования гепатоцитами глутамината, объясняя один из механизмов снижения концентрации аммиака и глутамата в печени крыс в указанный период наблюдений (табл. 1).

В норме, образующийся в гепатоцитах при дезаминировании глутамината, глутамат подвергается дезаминированию с участием ГДГ. Высвободившаяся при этом аминокислота также вовлекается в орнитинный цикл синтеза мочевины [23]. В наших исследованиях, активность ГДГ в печени на 65-е сут. развития СС14-гепатита снижалась на 56% (табл. 2), тогда как концентрация глутамата только на 15% (табл. 1). Это несоответствие объясняется с одной стороны нарушением вовлечения глутамата в образование глутамината, протекающего, как известно [21,

22], в гепатоцитах перивенулярной зоны печёночной долики. С другой стороны, стимуляцией его образования в реакциях переаминирования, активируемых при данной патологии в гепатоцитах.

Применение ЧГЭ на 65-е сут. развития СС14-гепатита стимулировало накопление аммиака в оставшейся после резекции части органа (рисунок). В результате его концентрация на 3-и, 7-е и 14-е сут. послеоперационного периода превышала норму, соответственно, на 65%, 84% и 94% (табл. 1).

Между тем, концентрация глутамината в печени после ЧГЭ статистически значимо не отличалась от аналогичного показателя «ложнооперированных» животных (рисунок) и была ниже нормы на 3-и, 7-е и 14-е сут. послеоперационного периода соответственно на 31%, 40% и 44% (табл. 1).

Содержание глутамината в печени зависит от соотношения реакций его дезамидирования и образования, катализируемых соответственно ФЗГ и ГС [21]. Как видно из рисунка А, на 3-и сут. после ЧГЭ имело место увеличение их активности соответственно на 56% и 116% по сравнению с контрольной серией «ложнооперированных» животных. В результате активность ГС статистически значимо не отличалась от нормы, активность ФЗГ превышала её на 73% (табл. 2). Если учесть, что максимальная митотическая активность гепатоцитов наблюдается в первые трое суток после ЧГЭ [3], то есть все основания говорить о связи репаративной активности паренхиматозных клеток печени и стимуляции активности ключевых ферментов глутаминового цикла. Неслучайно на 7-е и 14-е сут. послеоперационного периода, когда повышенная митотическая активность гепатоцитов нормализуется, стимулирующее влияние ЧГЭ на активность ФЗГ и ГС исчезает (рисунок Б, В). В результате активность ФЗГ возвращается к норме, тогда как активность ГС становится ниже нормы соответственно на 42% и 53% (табл. 2).

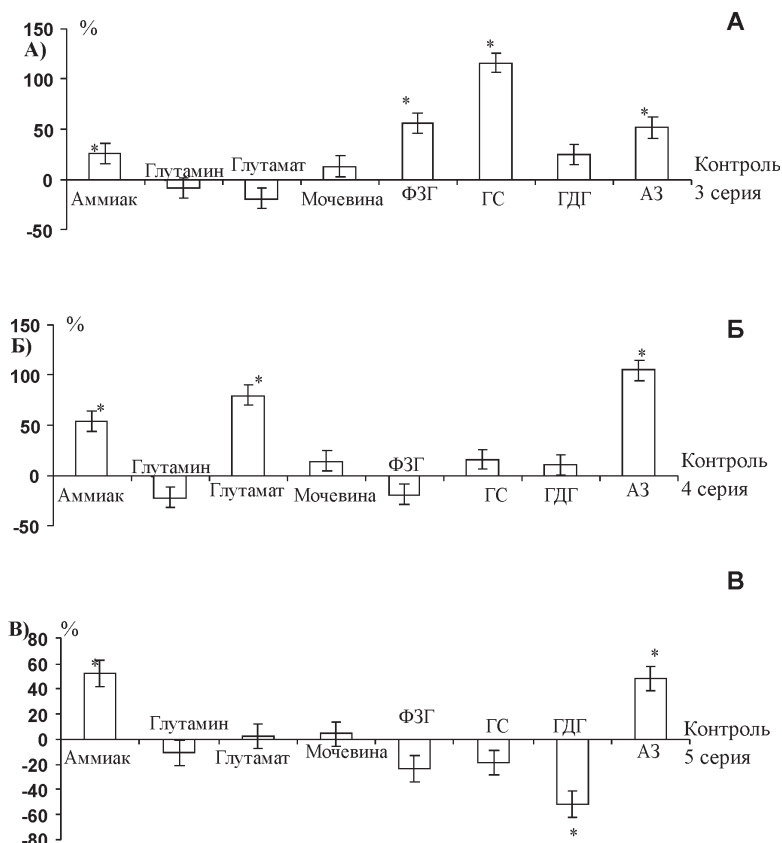
Таким образом, на протяжении всего исследуемого периода после ЧГЭ в оставшейся после резекции части печени имеет место преобладание дезамидирования глу-

Таблица 2

Активность фосфатзависимой глутаминазы, глутаматдегидрогеназы, глутаминсинтетазы и аргиназы (нмоль/мг белка/с) в печени после частичной гепатэктомии на фоне хронического СС14-гепатита, (M ± m)

Показатели	Норма (n = 10)	Конец затравки (n = 10)	Сутки после частичной гепатэктомии		
			3 (n = 10)	7 (n = 10)	14 (n = 10)
Фосфатзависимая глутаминаза	1,53 ± 0,08	1,29 ± 0,17	2,65 ± 0,14*#	1,61 ± 0,14#	1,79 ± 0,18#
Глутаматдегидрогеназа	2,54 ± 0,16	1,11 ± 0,11*	1,31 ± 0,25*	1,27 ± 0,15*	0,78 ± 0,09*
Глутаминсинтетаза	1,13 ± 0,09	0,4 ± 0,05*	0,90 ± 0,11#	0,86 ± 0,06*#	0,52 ± 0,1*
Аргиназа	116,6 ± 8,9	49,3 ± 6,4*	98,8 ± 9,27#	127,2 ± 12,6#	96,6 ± 7,63#

Примечание. * (p<0,05) — статистическая значимость различий по сравнению с нормой; # — по сравнению с концом затравки (65-е сут. введения СС14); n — число животных в каждой серии опытов.



Изменение содержания азотистых метаболитов и активности ферментов в печени животных с хроническим CCl_4 -гепатитом на 3-и (А), 7-е (Б) и 14-е (В) сутки после частичной гепатэктомии:

АЗ — аргиназа, ФЗГ — фосфатзависимая глутаминаза, ГДГ — глутаматдегидрогеназа, ГС — глутаминсинтетаза, * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем; контроль — животные с хроническим CCl_4 -гепатитом, исследованные соответственно на 3-и (А), 7-е (Б) и 14-е (В) сутки после отмены токсина и лапаротомии.

тамина над его образованием. Если в ранние сроки после ЧГЭ это обусловлено преимущественной стимуляцией дезамидирования глутамин, то в поздние сроки — торможением его образования. Это не только объясняет причину прогрессирующего накопления аммиака поражённой CCl_4 печенью после её резекции (рисунок), но и сохранение в ней дефицита глутамин (табл. 1).

Преобладание в печени дезамидирования глутамин над его образованием должно содействовать накоплению в ней глутамата, что не было обнаружено. Напротив, на 3-и и 14-е сут. после ЧГЭ содержание глутамата было ниже нормы, соответственно, на 25% и 22% (табл. 3). Увеличение на 80% относительно контрольной серии «ложнооперированных» крыс содержания глутамата на 7-е сут. после ЧГЭ (рисунок Б) видимо связано с активацией в гепатоцитах механизмов, определяющих кратковременную ликвидацию дефицита данного метаболита в оставшейся после резекции части печени в указанный период наблюдений. Одним из ферментов, определяющих наряду с ФЗГ и ГС, содержание глутамата в гепатоцитах является ГДГ. Наши исследования выявили отсроченное инги-

бирующее влияние ЧГЭ на активность ГДГ гепатоцитов при хроническом CCl_4 -гепатите. В результате на 14-е сут. послеоперационного периода активность была на 52% ниже соответствующего показателя контрольной серии «ложнооперированных» животных (рисунок В). Относительно нормы активность ГДГ оставалась сниженной на 3-и, 7-е и 14-е сут. после ЧГЭ, соответственно, на 48%, 50% и 69% (табл. 2). Это указывает на сохранение в гепатоцитах оставшейся после резекции части печени сниженного метаболизма глутамата в ГДГ-реакции.

Как видно из рисунка у животных с хроническим CCl_4 -гепатитом ЧГЭ стимулировала активность цАЗ гепатоцитов, в результате чего на 3-и, 7-е и 14-е сут. она превышала конец заправки, соответственно, на 102%, 159% и 97%. Поскольку активность аргиназы находится в прямой зависимости от количества молекул фермента в клетке [24], то есть все основания говорить о стимуляции ЧГЭ её образования в печени, поражённой CCl_4 . Между тем, стимулирующее влияние ЧГЭ на активность цАЗ гепатоцитов не сопровождалось увеличением концентрации в печени

мочевины (рисунок), которая на 3-и, 7-е и 14-е сут. после ЧГЭ оставалась ниже нормы, соответственно, на 19%, 25% и 17% (табл. 3). И это несмотря на то, что её содержание в артериальной крови в указанные сроки исследования превышало норму [25]. Следовательно, стимулирующего влияния ЧГЭ на активность цАЗ в гепатоцитах, оказывается недостаточно для ликвидации нарушения синтеза гепатоцитами мочевины при хроническом СС1₄-гепатите. С одной стороны, этому будет содействовать дефицит АТФ в гепатоцитах при данной патологии [26], который отразится на первой реакции цикла орнитинового цикла (образование карбамоилфосфата) протекающей, как известно [27], с участием данного макроэрга. С другой стороны, не исключается сохранение в регенерирующей печени сниженной активности орнитинкарбамоилтрансферазы, обнаруженное при СС1₄-гепатите [28].

Таким образом, ЧГЭ на фоне хронического СС1₄-гепатита стимулирует внутриклеточный аммиогенез в гепатоцитах, активируя дезамидирование в них, поступающего с кровью глутамина, на фоне торможения образования глутамина самим гепатоцитами. ЧГЭ не только не устраняет дефицит глутамата в регенерирующей печени, но создаёт условия для отсроченного (на 14-е сутки) дальнейшего угнетения его метаболизма в ГДГ-реакции. Восстановление после ЧГЭ сниженной при СС1₄-гепатите активности аргиназы гепатоцитов не сопровождается нормализацией содержания мочевины в оставшейся после резекции части печени, что указывает на нарушения работы орнитинового цикла в гепатоцитах.

References

1. Pyshkin S.A., Malyshev Yu.I., Dimov P.G. Indications for surgical treatment of chronic hepatitis and liver cirrhosis *Klinicheskaya khirurgiya* 1986; 9: 29-32. (in Russian)
2. Kamatsu T., Koyanagi N., Matsumoto H. Lack of Branched-chain Amino Acid Solution on Postoperative Hepatic Encephalopathy in Patients with Cirrhosis *Surgery* 1988; 104(3): 482-8.
3. Solopaev B.P. *Regeneration of normal and pathologically changed liver [Regeneratsiya normalnoy i patologicheskoy izmenyonnoy petcheni]*. Gorky: Verkhne-Voljskoye izdatelstvo, 1980. (in Russian)
4. Rivnyak V.I. Extracellular breakdown of collagen under the action of lysosomal enzymes during involution of liver cirrhosis *Bulleten Eksperimentalnoy Biologii i Meditsiny*. 1986; 12: 760-3. (in Russian)
5. Reshetnyak V.I. Liver cell failure. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2005; 1(3): 68-79. (in Russian)
6. Savilov P.N. Ammonia neutralization function hepatocytes after liver resection in experiment *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimentalnaya Terapiya*. 2002; 4: 11-3. (in Russian)
7. Savilov P.N. Ammonia neutralization function liver печени in chronic active hepatitis. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimentalnaya Terapiya* 2004; 1: 24-6. (in Russian)
8. Silakova A. I. Trubin, G. P., Yavlikova A.I. Micromethod determination of ammonia and glutamine in trichloroacetic tissue extracts. *Voprosy Meditsinskoy Khimii*. 1962; 8(5): 538-44. (in Russian)
9. Harris M. Studies regenerating a glutamine-like substance in blood and spinal fluid, including a method for its quantitative determination. *J. Clin. Invest.* 1943; 22(4): 569-76.
10. Bernt E., Bergmeyer H.U. *L-glutamatabestimmung mit GDH und NAD*. In: *Methoden der enzym. Analyse*. H.U. Bergmeyer, eds. Weinheim/Bergs Verlag. Chemie. 1974; 2: 749-1752.
11. Richterrich D. *Clinical. Chemistry* N.Y.: Academia Press, 1962.
12. Jonson D., Lardy I. *Methods in Enzymology* N.Y.1972; 10: 94 -102.
13. Beaton J.R., Ozava G. Activity of liver glutaminase in vitamin B₆-deficient rats *J. Biol. Chem.* 1955; 214(2): 685-91.
14. Schmidt E., Schmidt F.W. Glutamate dehydrogenase. In: H.U. Bergmeyer eds. *Methoden der enzym. Analyse* Weinheim/Bergs Verlag. Chemie. 1983; 3: 216-27.
15. Pushkin V.A., Evstigneeva Z.G., Kretovich V.L. Determination of the glutaminsintetases activity in extracts from pea seeds on the formation of orthophosphate *Prikladnaya Biokhimiya I Mikrobiologiya* 1972; 3(1): 96-0. (in Russian)
16. Trapeznikova S.S., Navasardyan A.G., Davtyan M.A. Multiple forms of arginase of rat liver *Biokhimiya*.1982; 47(12): 2022-7. (in Russian)
17. Hartree E.F. Determination of protein a modification of the Lorry method that gives a linear photometric response *Anal. Biochem.*1972; 43(2): 422-7.
18. Glantz St.A. *Primer of Biostatistics* N.Y.: McGraw-Hill Inc, 1994
19. Savilov P.N., Molchanov D.V. Kinetics of nitrogen metabolites in the kidneys in chronic hepatitis tetrachloro-carbon *Patologicheskaya Fyziologiya I Eksperimentalnaya Terapiya*. 2014; 2: 56-60. (in Russian)
20. Zimann D.S. The hepatic and its response to hepatic injury a working hypothesis. *J. Biol. And Med.*1977; 50(24): 497-506.
21. Haussinger D. Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. *Eur. J. Biochem.* 1983; 133: 269-75.
22. Savilov P.N. Glutamine cycle of the liver after resection *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy Khimii*. 2010; 7: 53-8. (in Russian)
23. Haussinger D. Die hepatische Ammoniumionentgiftung *Forsch. Med.* 1985;103(45):1051/41 — 1051/43.
24. Normal and pathological Cytology of the liver parenchyma [Normalnaya i patologicheskaya tsitologiya parenkhimi petcheni] (ed by. E.M. Kheysin) Leneigrad: Nauka; 1989. (in Russian)
25. Molchanov D.V. The kinetics of urea in the kidney after liver resection and hyperbaric oxygenation on the background of chronic hepatitis. *Bulleteny giperbaricheskoy Biologii i Meditsini* 2006;14(1-4):11-20. (in Russian)
26. Krahenbuhe S., Reichen J. Adaptation of mitochondrial metabolism in liver cirrhosis. Different Strategies to Maintain a vital function. *Scand. J. Gastroenterol.* 1992; 27(3): 90-6.
27. Lehninger A.L. *Principles of Biochemistry*, N.Y.:Worts Publishers, Inc, 1982.
28. Nolicic V., Klac A., Grubac L., Aliksic N. Klinika vudnost aktivnosti ornitin karbamilsintetase u serum (SOCT) u djagnostici abolenje jerte is zuchin puteva *Acta Med. Jugosl.*1975; 29(5): 421-9.

© Коллектив авторов, 2017
УДК 615.065

Копылова С.В.¹, Власова К.М.¹, Анашкина А.А.²

Воздействие токсической дозы адреналина на морфофункциональное состояние печени

¹ ФГАОУВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; 603950, г. Нижний Новгород, Россия, пр. Гагарина, д. 23

² ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России, 603005, г. Нижний Новгород, Россия, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1

Цель — изучение биохимических показателей крови, характеризующих функциональное состояние печени, и морфологического профиля органа после однократного воздействия токсической дозы адреналина. **Методика.** Исследования проводились на 60 половозрелых крысах (самках) массой 0,15—0,2 кг, которые были разделены на 2 группы: интактные животные и опыт — животные, которым однократно вводился адреналин гидрохлорид внутривенно в дозе 0,5 мг/кг. Забор всех видов биологического материала (кровь, ткань печени) осуществляли через 1 и 10 сут. после начала эксперимента. Степень влияния высокой дозы адреналина оценивали по показателям перекисного окисления липидов (ПОЛ) и белков (ПОБ) в гомогенатах проб печени, концентрации молекул средней массы (МСМ), активности АЛТ, АСТ, ЩФ, ЛДГ, концентрации общего белка, глюкозы и лактата в плазме крови. Определяли также протромбиновое время (ПТВ) с расчетом на его основе международного нормализованного отношения (МНО). Образцы печени исследовали гистологически. **Результаты.** Установлено, что на протяжении всего эксперимента наблюдалась повышенная концентрация продуктов ПОЛ и ПОБ в гомогенатах печени, наблюдалось увеличение концентрации МСМ в 1,7 раза. Через 1 сут. после введения токсической дозы адреналина наблюдалась гиперферментемия, что проявлялось увеличением активности АЛТ и АСТ, отмечалось повышение активности ЛДГ. Через 10 сут. после начала эксперимента выявлена гипоферментемия: активность АЛТ и АСТ уменьшилась, уровень активности ЛДГ оставался повышенным. Уровень общего белка превышал уровень такового в группе животных, у которых исследования проводились через 1 сут. после начала эксперимента, ПТВ также продолжало снижаться. Гистологическая картина свидетельствует о нарушении кровоснабжения, что проявлялось плазматизацией, как в центральных, так и в малых сосудах. Со стороны гепатоцитов как в центре, так и на периферии отмечались изменения по типу зернистой дистрофии, в отдельных участках — вакуольной дистрофии. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что адреналин в токсических дозах, провоцирует появление катоксического эффекта, характеризующегося активацией окислительного статуса в печени, что ведет к морфологическим изменениям ткани органа, сопровождающимися гиперферментемией, смещением метаболического гомеостаза в сторону катаболизма.

Ключевые слова: адреналин; печень; адреналовая интоксикация.

Для цитирования: Копылова С.В., Власова К.М., Анашкина А.А. Воздействие токсической дозы адреналина на морфофункциональное состояние печени. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 67–71. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.67-71

Для корреспонденции: Власова Ксения Матвеевна, аспирант каф. биохимии и физиологии Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского, e-mail: ksyuhavlasov@rambler.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.09.2016

Kopylova S.V.¹, Vlasova K.M.¹, Anashkina A.A.²

Exposure to toxic dose of adrenaline on the functional state of the liver

¹ FSAEI HPE National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23, pr. Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

² SBEI Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1, pl. Minin and Pozharsky, 603005, Russia

The purpose. The blood biochemical parameters characterizing the functional state of the liver, and the morphological profile of the body after a single exposure to a toxic dose of adrenaline were studied. **Methods.** Studies were conducted on 60 adult rats (female) weighing 0.15—0.2 kg, were divided into groups: intact animals; experience — animals, injected with epinephrine hydrochloride intraperitoneally in a dose of 0.5 mg/kg. All kinds of Biological material (blood, liver) were collected out through one and ten days after the start of the experiment. The degree of influence of high doses of epinephrine were evaluated in terms of lipid peroxidation (LPO) and protein (PSP) in liver homogenates, the concentration of average

weight molecules (MSM), the activity of ALT, AST, alkaline phosphatase, LDH, total protein concentration, glucose and lactate in the blood plasma, as well as the determination of the prothrombin time (PTT) with the counting on the basis thereof of international normalized ratio (INR). Histology of the liver was studied by light microscopy. **Results.** It was found that throughout the experiment, there was an increased concentration of lipid peroxidation products and protein in liver homogenates, there was an increase in the concentration of MSM 1.7. Twenty-four hours after the administration of a toxic dose of adrenaline observed hyperenzymemia that manifested an increase in the activity of ALT and AST, was an increase in LDH. After 10-day five after the start of the experiment established the presence hyperenzymemia activity decreased ALT and AST, LDH activity remained elevated. total protein level was higher than in the group of animals in which investigations were conducted one day after the start of the experiment, PTV also continued to decline. In histological sections of the development of a pathological condition characterized by circulatory disturbance — plasmation, both in central and in small vessels. From the hepatocytes both in the center and the periphery had changes granular dystrophy type, to some extent vacuolar.

Keywords: adrenaline; liver; adrenaline intoxication.

Conclusion. The results obtained testify that adrenaline in toxic doses, provokes the appearance catatonic effect, characterized by activation of the oxidative status in the liver, which leads to morphological changes in body tissue, hyperenzymemia, offset metabolic homeostasis towards catabolism.

For citation: Kopylova S.V., Vlasova K.M., Anashkina A.A. Exposure to toxic dose of adrenaline on the functional state of the liver. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(2): 67–71. (in Russian) DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.67-71

For correspondence: Kseniia M. Vlasova, Graduate student Department of Biochemistry and Physiology of the Institute of Biology and Biomedicine Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23, pr. Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation, e-mail: ksyuhavlasov@rambler.ru

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

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received 02.09.2016

Введение

Имеются многочисленные сведения о физиологических эффектах, вызываемых введением терапевтических доз адреналина. Однако, большое количество неотложных состояний в медицине (анафилактический шок, ангионевротический шок, астматический статус, асистолия) корректируется введением высоких доз гормона [1, 2]. Несмотря на это, сведений об ответных реакциях организма на высокие, граничащие с токсическими, дозы адреналина практически нет. Даже при однократном введении этого биологически активного вещества в высокой дозе может развиться адреналиновая интоксикация, одной из мишеней которой является печень [3, 4]. Широкие компенсаторные возможности печени маскируют нарушение функций и соответствующая клиническая манифестация возникает лишь после того как истощаются механизмы адаптации и компенсации. Вопрос понимания природы изменений в печени при адреналиновой интоксикации является актуальным.

Цель исследования — изучение биохимических показателей крови, характеризующих функциональное состояние печени, и морфологического профиля органа после однократного воздействия токсической дозы адреналина.

Методика

Исследования проводились на 60 половозрелых крысах (самках) массой 0,15—0,2 кг. Животные были получены из питомника лабораторных животных филиала «Андреевка» ФГБУН БМТ ФМБА России, Московская область.

Животных содержали в виварии, оборудованном согласно требованиям «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» №1045-73. Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных Приложение к Приказу МЗ СССР №775 от 12.08.77, Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» и ФЗ РФ «О защите животных от жестокого обращения».

Крысы находились в одинаковых пластиковых клетках с поилками, получали полноценный экструдированный комбикорм при свободном доступе к воде.

Животные были разделены на 2 группы: 1-я гр. — интактные; 2-я гр. — опыт — однократное введение адреналина гидрохлорида внутривенно

в дозе 0,5 мг/кг. По истечении сроков эксперимента животных декапитировали.

Забор всех видов биологического материала (кровь, ткань печени) осуществляли через 1 и 10 сут. после начала эксперимента. Степень влияния высокой дозы адреналина оценивали по показателям перекисного окисления: липидов (ПОЛ) и белков (ПОБ) гомогенатов печени, концентрации молекул средней массы (МСМ), активности АЛТ, АСТ, ЦФ, ЛДГ, концентрации общего белка, глюкозы и лактата в плазме крови. Определяли протромбиновое время (ПТВ) с расчетом на его основе международного нормализованного отношения (МНО).

Активность процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию в гомогенатах печени диеновых (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и оснований Шиффа (ОШ) [5]; окисленную модификацию белков оценивали по уровню карбонильных производных [6].

Плазму крови исследовали при помощи полуавтоматического биохимического анализатора Stat Fax 3300 в режиме проточной кюветы. При проведении тестов использовались диагностические реагенты компании SPINREACT (сертифицирована по стандартам ISO 9001-2000 и ISO 13485-2003). Концентрация молекул средней массы (МСМ) регистрировалась по М.Я. Малаховой [7]. Расчет протромбинового времени производился на анализаторе показателей гемостаза АПГ4-01 «Минилаб 704» изготовитель ООО «Эйлитон» г. Москва. МНО рассчитывали по формуле $MHO = (ПТВ_{пробы} / ПТВ_{норма})^{МНЧ}$.

Морфологические изменения в ткани печени оценивали методом световой микроскопии с помощью Biologi-

cal Microscope МТ 4200L, Meiji Techno Co. Ltd, Japan на срезах окрашенных гематоксилин-эозином.

Результаты обрабатывались статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

На протяжении всего эксперимента наблюдалась повышенная концентрация продуктов перекисного окисления липидов и белков в гомогенатах печени. Установлено, что концентрация ДК, ТК и ОШ увеличилась в 2,3, 1,7, 2,7 раза соответственно по сравнению с интактными животными; уровень нейтральных альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов возрастал при длинах волн 346 нм — на 51%, 370 нм — на 48%, основных при 430 нм — на 25% и при 530 нм — на 17,4% по отношению к группе «интактные животные» (рис. 1).

Было зарегистрировано также увеличение в 1,7 раза концентрации МСМ.

Через 1 сут. после введения токсической дозы адреналина наблюдалась гиперферментемия, что проявлялось увеличением активности АЛТ и АСТ на 34% и 97% соответственно, ЦФ — на 89% относительно группы «интактные животные». В условиях острого стресса возрастала активность ЛДГ в 4 раза, что стало причиной увеличения количества лактата в крови на 6% (таблица).

Под влиянием стрессирующего агента возникала гипергликемия (концентрация глюкозы повысилась на 56%) и гипопроteinемия (количество общего бел-

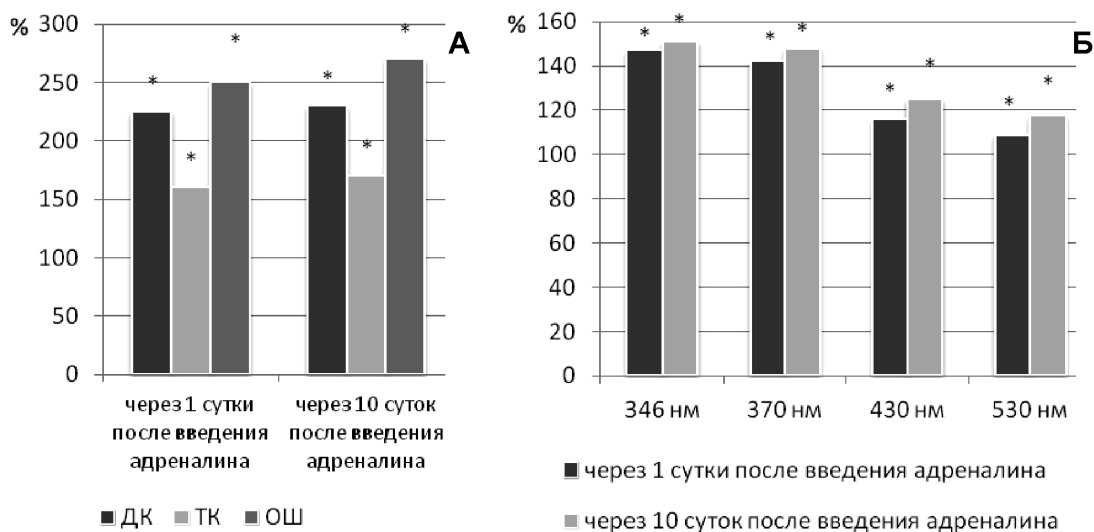


Рис. 1. Концентрация метаболитов перекисного окисления липидов (А) и белков (Б) мембран гепатоцитов крыс (уровень исследуемых показателей в группе «интактные животные» принят за 100%).

* — статистически значимые различия с показателями группы «интактные животные».

Содержание метаболитов и ферментов углеводно-энергетического обмена в плазме крови крыс при воздействии токсической дозы адреналина

Показатели	Интактные животные, n = 20	Опыт	
		через 1 сутки после введения адреналина, n=20	через 10 суток после введения адреналина, n=20
Общий белок, [г/л]	53,33 ± 18,02	42,33 ± 2,52*	50,02 ± 5,14
ПТВ, [с]	33,81 ± 0,45	28,37 ± 0,79*	26,13 ± 1,930*
МНО, [усл.ед]	5,28 ± 0,45	4,30 ± 0,45*	3,70 ± 0,45*
Глюкоза, [ммоль/л]	2,23 ± 0,30	3,48 ± 0,10*	1,11 ± 0,19*
Лактат, [ммоль/л]	5,46 ± 0,56	5,81 ± 0,34	5,10 ± 0,08
ЛДГ, [U/l при 30°C]	110,90 ± 9,49	409,50 ± 54,40*	123,40 ± 7,51
АЛТ, [U/l при 30°C]	50,50 ± 0,55	82,67 ± 2,31*	8,13 ± 1,04*
АСТ, [U/l при 30°C]	125,50 ± 10,08	247,30 ± 18,58*	20,43 ± 0,89*
ЩФ, [U/l при 30°C]	138,51 ± 11,08	262,70 ± 6,03*	131,84 ± 6,30*

Примечание. * p<0,05 — статистически значимые изменения показателей по сравнению с группой "интактные животные".

ка снижалось на 21%) по сравнению с показателем в группе «интактные животные». Уровень ПТВ стал меньше на 16%, рассчитанное на его основе международное нормализованное время составило 81% от показателя у интактных животных.

Через 10 сут. после начала эксперимента было установлено наличие гипоферментемии: активность АЛТ и АСТ уменьшилась на 84%, ЩФ — на 5% относительно группы «интактные животные». Уровень активности ЛДГ оставался повышенным по отношению к показателю у интактных животных, однако по отношению к данным через 1 сут. он снизился в 2 раза. Концентрация глюкозы и лактата составила 149,8% и 93,2% соответственно по сравнению с показателями в интактной группе (таблица).

Обращают на себя внимание изменения в белковом составе плазмы. Уровень общего белка стал выше, чем в группе животных, у которых исследования

проводились через 1 сут. после начала эксперимента на 18%, однако он не достигает значений, наблюдаемых в группе «интактные животные». ПТВ так же продолжило снижение и составило 77,28% от интактного значения. МНО рассчитанное по протромбиновому времени снизилось до 3,7.

Гистологические изменения проявлялись признаками нарушения кровоснабжения в виде плазматизации, как в центральных, так и в мелких сосудах. В гепатоцитах центральной зоны и по периферии печеночной дольки отмечались изменения по типу зернистой дистрофии, в некоторых участках — вакуольной дистрофии (рис. 2).

Анализ полученных результатов позволяет сделать заключение, что идентифицированное повреждение гепатоцитов обусловлены гипоксией, которую вызывает адреналин в токсических дозах. Что привело к активизации процессов перекисного окисления липидов и белков мембран гепатоцитов, с нарушением их целостности и повышением проницаемости.

Продукты интоксикации (МСМ), образующиеся при ПОБ, токсичны для печени, и повышение их концентрации в гомогенатах действует на ПОЛ и ПОБ по принципу положительной обратной связи. Последнее обуславливало повышение в сыворотке крови активности индикаторных ферментов (АЛТ, АСТ, ЩФ) с последующим снижением их активности к концу эксперимента. Это подтверждают результаты гистологического исследования, выявившие изменения воспалительно-дистрофического характера в печени и желчевыводящих путях.

Морфологические изменения печени в условиях острого стресса сопровождаются изменениями функциональных характеристик органа, что подтверждается снижением индексов ПТВ и МНО, которые являются

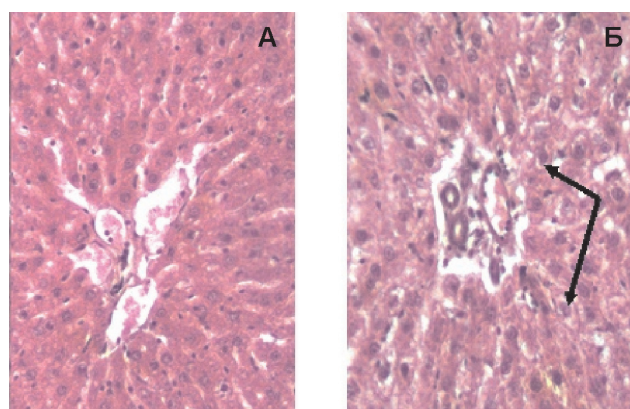


Рис. 2. Гистологические срезы печени (x60 гематоксилин-эозин). А — Интактная группа; Б — Адреналин — 10-е сут. эксперимента (стрелками указана вакуольная дистрофия).

не только показателями гемостаза, но и показателями, характеризующими функцию печени [8, 9]. Мы зарегистрировали смещение метаболического баланса в печени в сторону катаболизма, на что указывают повышение активности ЛДГ, концентрации глюкозы с последующим истощением углеводного пула.

Таким образом, вводимая внутривенно высокая (0,5 мг/кг) доза адреналина вызывает катоксический эффект характеризующийся активацией окислительного статуса в печени, что ведет к нарушению кровоснабжения органа и развитию дистрофии гепатоцитов, гиперферментемии, смещению метаболического гомеостаза в сторону катаболизма.

References

1. Latysheva T.V. Urgent conditions in allergy. *Tsitokiny i vospalenie*. 2005; (3): 115-21. (in Russian)
2. Usenko L.V., Tsarev A.V., Kobelyatskiy Ju.Ju. Features conduct of cardiopulmonary and cerebral resuscitation in age aspect, and in special clinical situations. *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy*. 2013; (6): 174-82. (in Russian)

3. Goryacheva A.A., Morozov V.N., Pal'tseva E.M., Nardartsev A.A., Hetagurova A.K. Systemic effects of exogenous adrenaline. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2007; (3): 2-35. (in Russian)

4. Oleynikova O.N., Makarova L.M., Pogorelyy V.E., Novikova N.A. Experimental Study of the antitoxic activity taurine in model of chronic adrenaline intoxication. *Dostizheniya v eksperimental'noy meditsine i biologii*. 2015; (803): 545-52. (in Russian)

5. Vladimirov Ju.A., Archakov I. *Lipid peroxidation in biological membranes. [Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranakh]*. Moscow: Nauka; 1972. (in Russian)

6. Dubinina E.E., Pustygina A.V. Oxidative modification of proteins, its role in pathological conditions. *Ukrainskiy biokhimicheskiy zhurnal*. 2008; 80(6): 5-18. (in Russian)

7. Malakhova M.Ya. *The method of registration of endogenous intoxication. Manual for physicians. [Metod registratsii endogennoy intoksikatsii. Posobie dlya vrachey]*. St. Petersburg: MAPO, 1995. (in Russian)

8. Minushkin O.N., Maslovskiy L.V., Frolova A.A., Shaposhnikova O.F. Experience with the drug metadoxil in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 21(19). (in Russian)

9. Morozov Ju.A., Mulikov R.V. Violations of system of a hemostasis in liver pathology and their dynamics. *Gemorragicheskie diatezy, trombozy, trombofilii*. 2014; (1). (in Russian)

Сведения об авторах:

Копылова Светлана Вячеславовна, канд. биол. наук, доцент каф. биохимии и физиологии ННГУ им. Н. И. Лобачевского

Анашкина Анастасия Александровна, канд. биол. наук, ст. преподаватель каф. биохимии им. Г.Я. Городисской НижГМА

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Масляков В.В., Суханова О.А., Барсуков В.Г., Куркин К.Г., Суханов С.А.

Возможности коррекции реологических свойств крови при колото-резаных ранениях груди (краткое сообщение)

Филиал частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» в городе Саратов Министерства образования и науки РФ, 410012, Саратов, Россия, ул. Верхний рынок, корпус 10, Россия

Цель — изучение влияния электромагнитных колебаний миллиметрового диапазона на реологические свойства крови у пациентов с колото-резаными ранениями груди с целью их коррекции. **Методика.** Изменение реологических свойств крови изучено у 22 пациентов с проникающими колото-резаными ранениями груди без повреждения внутренних органов в течение ближайшего послеоперационного периода. Всем больным были выполнены первичная хирургическая обработка и дренирование плевральной полости. У всех пациентов объем кровопотери составил 200—500 мл. Критериями включения были: наличие проникающего ранения грудной клетки, наличие малого гемоторакса. Критериями исключения: наличие кровопотери более 500 мл, наличие сочетанных и множественных повреждений. Основная группа разделена на 2 подгруппы, в 1-ю вошли 12 пациентов с применением электромагнитных колебаний миллиметрового диапазона, во 2-ю — 10 человек без применения данного воздействия. Группу сравнения составили 15 относительно здоровых доноров-добровольцев сопоставимых по возрасту и полу. Всем пациентам не проводилась гемотрансфузия, объем инфузионной терапии был сопоставим в обеих группах. Изменения реологии крови выявлялись с помощью учета вязкости крови, изменения индекса деформации и агрегации эритроцитов. **Заключение.** Установлено, что применение электромагнитного колебания миллиметрового диапазона у пациентов с колото-резаными ранениями груди предотвращает развитие изменений реологических свойств крови, при этом пациенты хорошо переносят данную процедуру, что проявляется отсутствием побочных эффектов.

Ключевые слова: колото-резаные ранения груди; реология крови; ближайший послеоперационный период; электромагнитные колебания миллиметрового диапазона.

Для цитирования: Масляков В.В., Суханова О.А., Барсуков В.Г., Куркин К.Г., Суханов С.А. Возможности коррекции реологических свойств крови при колото-резаных ранениях груди. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 72—75. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.72-75

Для корреспонденции: Масляков Владимир Владимирович, доктор мед. наук, проф., проректор по научной работе и связям с общественностью, зав. каф. клинической медицины Филиала частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» в городе Саратов, e-mail: maslyakov@inbox.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.12.2015

Masljakov V.V., Suhanova O.A., Barsukov V.G., Kurkin K.G., Suhanov S.A.

Possibilities of correction rheological blood svoytv at chipped and cut wounds of the breast

Branch of private institution of the educational organization of the higher education «Medical university «Reaviz» in the city of Saratov of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation 410012, Saratov, st. Upper market, case 10, Russia

The purpose: research objective: to study influence of electromagnetic oscillations of millimetric range on rheological properties of blood at patients with chipped and cut wounds of a breast for the purpose of their correction. **Methods.** For the solution of a research objective we have carried out studying of changes of rheological properties of blood at the 22nd patient with the getting chipped and cut wounds of a breast without internal injury during the next postoperative period. All patient has executed primary surgical processing and drainage of a pleural cavity. At all patients the volume of blood loss has made 200—500 ml. Criteria of inclusion were: existence of the getting wound of a thorax, existence of a small gemotoraks. Criteria of an exception: blood loss existence more than 500 ml, existence of the combined and multiple damages. The main group is divided into two subgroups, in the first 12 patients with application of electromagnetic oscillations of millimetric range, have entered the second 10 people without application of electromagnetic oscillations of millimetric range. The group of comparison was made by 15 rather healthy donor volunteers of the same age and a floor. To all patients the

hemotransfusion wasn't carried out, the volume of infusional therapy was comparable in both groups. Changes of a rheology of blood came to light by means of the accounting of viscosity of blood, change of an index of deformation and aggregation of erythrocytes. **Conclusion.** As a result of the conducted research it is established that application of electromagnetic oscillation of millimetric range for patients with chipped and cut wounds of a breast prevents development of changes of rheological properties of blood, at the same time patients well transfer this procedure that is shown by lack of side effects.

Keywords: chipped and cut wounds of a breast, blood rheology, the next postoperative period, electromagnetic oscillations of millimetric range.

For citation: Maslyakov V.V., Suhanova O.A., Barsukov V.G., Kurkin K.G., Suhanov S.A. Possibilities of correction rheological blood svoystv at chipped and cut wounds of the breast. Hypolipidemic activity of N-cholinergic antagonist Benzohexonium in the experiments. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2017; 61 (2): 72—75. (in Russ). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.72-75

For correspondence: Vladimir V. Maslyakov, Doctor of Medical Sciences Professor, «Medical university «Reaviz» in the city of Saratov; st. Upper market, case 10, 410012, Russian Federation, e-mail: maslyakov@inbox.ru

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

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received 27.12.2015

Введение

В настоящее время травматические повреждения являются основной причиной смерти, а также временной и стойкой нетрудоспособности у лиц моложе 40 лет. В структуре травматических повреждений ранения груди составляют 35—50%. Проникающие колото-резаные и огнестрельные ранения встречаются в 12% случаев. Ранения грудной клетки сопровождаются большим количеством осложнений, для них до сих пор характерны высокая летальность на месте происшествия и в лечебных учреждениях и не всегда удовлетворительные результаты лечения [1—3]. Известно, что в развитии осложнений немаловажная роль отводится изменениям реологических свойств крови [4]. С целью коррекции подобных изменений в настоящее время предложено применение электромагнитных колебаний миллиметрового диапазона (КВЧ) [5]. Вместе с тем, в доступной литературе для коррекции реологических свойств крови при колото-резаных ранениях груди мы не встречали.

Цель — изучение влияния электромагнитных колебаний миллиметрового диапазона на реологические свойства крови у пациентов с колото-резаными ранениями груди с целью их коррекции.

Методика

Реологические свойства крови изучены у 22 пациентов с проникающими колото-резаными ранениями груди без повреждения внутренних органов. Исследование проводилось в ближайшем послеоперационном периоде. Все пациенты находились на лечении в хирургическом стационаре городской больницы № 9 г. Грозного Чеченской республики. Согласно шкале тяжести состояния APACHE II сумма баллов по-

страдавших составляла от 12 до 19. Всем больным были выполнены первичная хирургическая обработка (ПХО) и дренирование плевральной полости. У всех пациентов объем кровопотери составил 200—500 мл. Критериями включения были: наличие проникающего ранения грудной клетки, наличие малого гемоторакса (скопление крови в плевральном синусе 200—500 мл). Критерии исключения: наличие кровопотери более 500 мл, наличие сочетанных и множественных повреждений. Основная группа была разделена на две подгруппы, в 1-ю вошли 12 пациентов с применением КВЧ-терапии, во 2-ю — 10 человек без применения КВЧ-терапии. Группу сравнения составили 15 относительно здоровых доноров-добровольцев сопоставимых по полу и возрасту. При определении степени кровопотери учитывались следующие факторы: артериальное давление (АД), центральное венозное давление (ЦВД), которое определяли с помощью прямого способа измерения венозного давления по Moritz и Tabora, пульс, диурез, количество гемоглобина, дефицит объема циркулирующей крови (ОЦК). Дефицит ОЦК определяли по методу предложенному Moore [6], объем кровопотери вычисляется по формуле: $V = OЦК_{дх} (H_{тд} - H_{тф}) / H_{тд}$, где V — объем кровопотери (мл), $OЦК$ — должный ОЦК (мл), $H_{тд}$ — должный H_t , $H_{тф}$ — фактический H_t . ОЦК вычислялся из расчета: 60—65 мл на 1 кг массы тела у женщин и 70—75 мл на 1 кг массы тела у мужчин. Всем пациентам не проводилась гемотрансфузия, объем инфузионной терапии был сопоставим в обеих группах.

Для оценки реологических свойств крови оценивали вязкость крови, индекс деформации и агрегации эритроцитов. Вязкость крови определяли при помощи ротационного вискозиметра АКР-2 при скоростях сдвига: 200; 100; 150; 50 и 20 c^{-1} . Забор крови осу-

ществляли в условиях стационара из кубитальной вены с добавлением 3,8% раствора цитрата натрия в соотношении 9:1 на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е и 10-е сут. послеоперационного периода, объем крови — 2—3 мл. Исследование реологических свойств крови осуществляли не позднее 2,5 ч от момента взятия образца крови у больного, измерение начинали при скорости сдвига 200 с^{-1} . Образцы исследуемого материала в объеме 0,85 мл заливали в пластмассовую ячейку, термостатировали в течение 5 мин в специализированных ячейках анализатора, после чего в ячейку, заполненную кровью, опускали металлический цилиндр под углом 45° . Основным критерием правильного заполнения измерительной камеры считали способность цилиндра свободно плавать в образце при отсутствии пузырей воздуха в зазоре между цилиндром и стенкой измерительной ячейки. Общее время исследования образца цельной крови не превышало 10—15 мин. Измерения проводились в условиях постоянной температуры 37°C в измерительной ячейке, что обеспечивало более высокую точность измерения. Рассчитывали индекс деформации и индекс агрегации эритроцитов [7]. Агрегация эритроцитов (образование линейных агрегатов — монетных столбиков) — один из основных показателей вязкости крови, поэтому определение ее вклада в изменения вязкостных характеристик весьма важно. Индекс агрегации эритроцитов (ИАЭ) рассчитывали как частное от деления величины вязкости крови, измеренной при скорости сдвига 20 с^{-1} , на величину вязкости крови, измеренной при скорости сдвига 100 с^{-1} . Деформируемость эритроцитов является одним из важнейших феноменов, позволяющих эритроцитам проходить через сосуды, диаметр которых соизмерим с размерами эритроцитов. Индекс деформируемости эритроцитов (ИДЭ) рассчитывали как отношение величины вязкости крови, измеренной при скорости сдвига 100 с^{-1} , к значению вязкости крови, измеренной при скорости сдвига 200 с^{-1} [7]. Гематокритный показатель определялся центрифугированием в капилляре стабилизированной гепарином крови [8]. Эффективность доставки кислорода к тканям определяли по величине отношения гематокритного числа к вязкости крови при 200 с^{-1} [9]. Исследования проводили в момент поступления, на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е и 10-е сут. послеоперационного периода.

Облучение пациентов проводили электромагнитными волнами на частотах молекулярного спектра оксида азота 150,176—150,664 ГГц и атмосферного кислорода 129,0 ГГц на участок кожи площадью 3 см^2 над областью разреза. Излучатель электромагнитных волн располагался на расстоянии 1,5 см над поверхностью тела. В случае использования излучателя «НО» мощность излучения составляла 0,7 мВт,

а плотность мощности, падающей на участок кожи размером 3 см^2 , составляла $0,2 \text{ мВт/см}^2$. Доза облучения определялась плотностью мощности, падающей на кожу, и заданным временем облучения. Продолжительность облучения составляла 15 минут за один сеанс в течение 5 дней. Для облучения использовали переносной медицинский аппарат терагерцевой терапии «Орбита», разработанный в ОАО «Центральный научно-исследовательский институт измерительной аппаратуры» (г. Саратов) (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05497, лицензия № 99-03-002043 от 7 июня 2010).

Статистическую обработку проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0.473.0». При описании общих свойств полученных результатов использовались медиана (Me), доверительный интервал (ДИ). Результаты исследования, подчиняющиеся нормальному закону распределения, представлены как M (средняя арифметическая) \pm границы 95% ДИ средних значений изучаемых величин (95% ДИ). Значимость различий двух совокупностей оценивали с использованием критериев Стьюдента—Фишера, Манна—Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У пациентов с колото-резаными ранениями, сопровождавшимися кровопотерей средней степени, в 1-е послеоперационные сутки отмечалось статистически значимое увеличение всех исследуемых показателей по сравнению с группой сравнения.

В группе пациентов с колото-резаными ранениями груди без применения КВЧ-терапии на 3-и послеоперационные сутки отмечалось незначительное, но статистически значимое увеличение показателей вязкости крови при всех скоростях сдвига. Возрастали ИДЭ, ИАЭ, снижался показатель гематокрита и показатель эффективности доставки кислорода к тканям. При этом в группе пациентов с применением КВЧ-терапии значимых изменений вязкостных свойств крови не отмечено, все исследуемые показатели не изменялись и соответствовали данным первых послеоперационных суток и показателям групп сравнения.

На 5-е послеоперационные сутки существенных изменений показателей в исследуемых группах не отмечено — все результаты соответствовали данным 3-х послеоперационных суток.

На 7-е послеоперационные сутки в группе пациентов с колото-резаными ранениями груди без использования КВЧ-терапии отмечается частичное восстановление показателей реологических свойств крови: показатели вязкости крови при скоростях сдвига

200 с⁻¹ и 150 с⁻¹ соответствовали данным, полученным в группе сравнения. Отмечается восстановление показателя гематокрита и показателя эффективности доставки кислорода к тканям. В то же время изменения показателей вязкости при остальных скоростях сдвига не отмечено — они оставались повышенными. При этом изменений реологических свойств крови в группе пациентов с применением КВЧ-терапии не обнаружено, все результаты соответствовали физиологической норме.

На 10-е послеоперационные сутки в группе пациентов с колото-резаными ранениями груди даже без применения КВЧ-терапии отмечается полное восстановление показателей реологических свойств крови: все показатели при всех скоростях сдвига стали соответствовать данным группы сравнения.

При проведении клинического анализа установлено, что побочных действий при применении данного аппарата не обнаружено, все пациенты переносили процедуру удовлетворительно, отмечалось как субъективное, так и объективное улучшение, что проявлялось уменьшением болевого синдрома, уменьшением гиперемии и отека в области травмы, уменьшением кашлевого рефлекса.

Таким образом, представленное исследование показывает, что применение КВЧ-терапии у пациентов с колото-резаными ранениями груди способствует более быстрому восстановлению реологических свойств крови, при этом пациенты хорошо переносят данную

процедуру, что проявляется отсутствием побочных эффектов, и данный метод может быть рекомендован для комплексного лечения таких больных.

References

1. Abakumov M.M., Isfahani A.K. Surgical tactics at knife left-side the torakoabdominalnykh wounds. *Vestnik khirurgii*. 1997; 1: 86-90. (in Russian)
2. Brjusov P.G., Shalaev S., Chepcheruk G.S. Surgical tactics at the gunshot getting wounds of a breast. *Khirurgiya*. 1993; 4: 43-8 (in Russian).
3. Vagner E.A. *Surgery of injuries of a breast [Hirurgija povrezhdenij grudi]*. Moscow: Meditsina, 1981. (in Russian)
4. Kolesov A.P., Bisenkov L.N. *Surgical treatment of fire injuries of a breast. [Hirurgicheskoe lechenie ognestrel'nyh povrezhdenij grudi]* Leningrad: Meditsina, 1986. (in Russian)
5. Masljakov V.V., Kirichuk V.F., Barsukov V.G. Value of changes of rheological properties of blood in development of complications in the next postoperative period at patients with heavy blood loss after a splenektomiya. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2011; 12: 20-3. (in Russian)
6. Brjusov P.G. Determination of size of blood loss in urgent surgery. *Vestnik khirurgii*. 1986; 6: 122-7. (in Russian)
7. Parfenov A.S., Peshkov A.V., Dobrovolskiy N.A. *Blood analyzer rheological AKP-2. Determination of rheological properties of blood. [Analizator krovi reologicheskij AKR-2. Opredelenie reologicheskikh svoystv krovi]*. Metodicheskie Rekomendatsii Moscow: 1994. (in Russian)
8. Todorov I. *Clinical laboratory trials in pediatrics. [Klinicheskie laboratornye issledovaniya v pediatrii]*. Sofiya, 1961. (in Russian)

Сведения об авторах:

Барсуков Виталий Геннадьевич, канд. мед. наук, доцент каф. хирургических болезней Филиала частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» г. Саратов

Куркин Константин Геннадьевич, аспирант каф. хирургических болезней Филиала частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» г. Саратов

Суханова Ольга Александровна аспирантка каф. хирургических болезней Филиала частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» г. Саратов

Суханов Сергей Александрович аспирант каф. хирургических болезней Филиала частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз», г. Саратов

ОБЗОРЫ

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.151.5(048)

Гузовская Е.В., Серебренникова С.Н.

Патогенетические особенности синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови различной этиологии

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

ДВС-синдром — тяжелое осложнение, часто приводящее к полиорганной недостаточности и нередко к летальному исходу. Как и любой синдром, он полиэтиологичен, что закономерно приводит к различным механизмам его формирования. Основные проявления синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови — тромбообразование и кровоточивость. Следствием массивного тромбообразования в микроциркуляторном русле внутренних органов является развитие дистрофических изменений и органной недостаточности. Кровотечения, в свою очередь, приводят к уменьшению объема циркулирующей крови, артериальной гипотензии и гемической гипоксии, а в наиболее тяжелых случаях — и к летальному исходу. Однако механизмы развития и степень выраженности вышеуказанных нарушений далеко не всегда одинаковы. Поскольку данный синдром может быть обусловлен большим количеством причин (в настоящее время описано более 150 заболеваний, при которых может развиваться синдром), то наибольшим разнообразием отличаются именно инициальные его звенья. Основными пусковыми механизмами ДВС-синдрома могут быть: активация форменных элементов крови и усиление процесса их микровезикуляции, активация коагуляционного гемостаза по внешнему и внутреннему путям, недостаточность антикоагулянтов и избыточная активность фибринолитической системы. Разные этиологические факторы (сепсис, акушерская патология, лейкозы и другие злокачественные опухоли, травмы и т.д.) неодинаково влияют на функцию компонентов системы гемостаза. В зависимости от степени выраженности нарушений вышеуказанных механизмов может развиваться ДВС-синдром с преобладанием коагуляции или с преобладанием фибринолиза либо с их сбалансированной активацией. Клинические проявления этих форм ДВС-синдрома, а также продолжительность и выраженность стадий (гиперкоагуляция, коагулопатия потребления с компенсаторной активацией фибринолиза, дефибринация крови и гиперактивация фибринолиза) также будут отличаться. Следовательно, знание преобладающего нарушения в системе гемостаза при наличии заболевания, потенциально опасного в плане развития ДВС-синдрома, позволит подобрать наиболее оптимальные способы его профилактики, диагностики и лечения.

Ключевые слова: ДВС-синдром; патогенез; гиперкоагуляция; фибринолиз.

Для цитирования: Гузовская Е.В., Серебренникова С.Н. Патогенетические особенности синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови различной этиологии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 76—81. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.76-81

Для корреспонденции: Гузовская Евгения Владимировна, канд. мед. наук, доцент, каф. патологической физиологии с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО ИГМУ, e-mail: prokopyewa@rambler.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.06.2016

Guzovskaya E.V., Serebrennikova S.N.

Pathogenic peculiarities of disseminated intravascular coagulation of various ethiology

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education Irkutsk State Medical University of Ministry of Public Health, Russia

DIC is a severe complication, often resulting in multi-organ failure and fatal outcome. As any syndrome, it is polyethiologic, while a big number of its causes logically leads to various mechanisms of its forming. Main manifestations of the disseminated intravascular blood coagulation syndrome are clottage and haemorrhage. A result of a massive clottage in microcirculatory bed of internal organs is development of dystrophic changes in them and organ failure. Haemorrhage in its turn, results in decreased volume of circulating blood, arterial hypotension and hemic hypoxia, in most severe cases leading to the fatal outcome. Although, development mechanisms and manifestation degree of the disorder mentioned above are not always the same. As the syndrome may result from a great number of causes (currently, over 150 diseases have been described with which it can de-

velop), namely its initial stages are different to the greatest extent. Main triggering mechanisms of the DIC may be: blood formed element activation and increased process of their microvesiculation, activation of coagulative hemostasis in intrinsic and extrinsic pathways, lack of anticoagulants and excessive activity of fibrinolytic system. Various etiologic factors (sepsis, obstetrical pathology, leucosis and other malignant tumours, traumas, etc) have different effect on function of hemostasis system components. Depending on the degree of the above mentioned disorders mechanisms manifestation, the DIC may develop with prevailing coagulation, with prevailing fibrinolysis or with their balanced activation. Clinical manifestations of these DIC forms, as well as duration and manifestation degree of its stages (hypercoagulation, coagulopathy of consumption with compensatory activation of fibrinolysis, defibrination of the blood and excessive activation of fibrinolysis) will be different as well. Consequently, knowing the prevailing disorder in hemostasis system during a disease that is potentially dangerous in terms of the DIC development offers to find optimal methods of its prevention, diagnosing and treatment.

Keywords: disseminated intravascular coagulation; pathogenesis; hypercoagulation; fibrinolysis.

For citation: Guzovskaya E.V., Serebrennikova S.N. Pathogenic peculiarities of disseminated intravascular coagulation of various etiology. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(2): 76–81. (in Russian) DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.76-81

For correspondence: Evgeniya V. Guzovskaya, Candidate of Medical Sciences, Docent of Pathophysiology Department of Federal State Budget Educational Institution of Higher Education Irkutsk State Medical University of Ministry of Public Health; 1, ul. Krasnogo Vosstaniya, Irkutsk, 664003, Russian Federation, e-mail: prokopyewa@rambler.ru

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

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Guzovskaya E.V., <http://orcid.org/0000-0002-9005-1578>

Serebrennikova S.N., <http://orcid.org/0000-0003-3328-4727>

Received 22.06.2016

Введение

ДВС-синдром (диссеминированное внутрисосудистое свертывание) долгое время рассматривался как протекающий стадийно процесс с универсальной схемой патогенеза, а именно — с обязательной сменой периода гиперкоагуляции и рассеянного тромбообразования на массивные, трудноостанавливаемые кровотечения. Такой подход отражен и в одном из его названий — тромбгеморрагический синдром. Автором данного термина является М.С. Мачабели, долгое время занимавшаяся вопросами патогенеза нарушений гемостаза. Исходя из концепции непрерывного процесса свертывания крови было предложено называть его гипергипокоагуляционным синдромом [1-3]. А учитывая, что нарушения системы гемостаза затрагивают не только кровь, но также лимфу и тканевую жидкость предложен еще один термин — «синдром интравазальной и экстравазальной коагуляции» [4].

На данный момент Комитет научной стандартизации Международного общества по изучению тромбоза и гемостаза определяет ДВС-синдром как приобретенный синдром, характеризующийся внутрисосудистым свертыванием крови в мелких сосудах, без определенной локализации, возникающий под действием различных причин. Это приводит к блокаде микроциркуляторного русла и, в тяжелых случаях, к органной недостаточности. По мере прогрессирования ДВС-синдрома происходит потребление факторов свертывания и тромбоцитов, что приводит к раз-

витию гипокоагуляции (т.н. коагулопатии потребления) и кровотечений. Параллельно этим процессам усиливается и фибринолиз, но степень его активации, в зависимости от причины вызвавшей развитие ДВС-синдрома, может быть различной. Полиэтиологичность синдрома ДВС предполагает существование особенностей его развития при различных патологиях.

С патогенетической точки зрения можно выделить 3 формы ДВС-синдрома [5] (см. Схему). С учетом особенностей патогенеза описаны возможные варианты клинических проявлений ДВС-синдрома [6, 7].

1. ДВС с преобладанием полиорганной недостаточности. Формируется при преобладании явлений свертывания крови над фибринолизом. Наиболее типичные причины — сепсис, синдром Труссо.

2. Асимптоматический или малосимптомный тип ДВС-синдрома. Формируется при незначительной и сбалансированной активации процессов коагуляции и фибринолиза. Характерен для солидных опухолей и большинства лейкозов (за исключением острого промиелоцитарного).

3. Геморрагический тип ДВС-синдрома. В его основе лежит преобладание фибринолиза над свертыванием крови. Наблюдается при остром промиелоцитарном лейкозе.

4. ДВС с массивными кровотечениями. Является следствием сбалансированной гиперактивации процессов свертывания и фибринолиза. Примером может

Сравнительная характеристика патогенетических вариантов ДВС-синдрома

Классификация	Коагуляция (↑ТАТ) Фибринолиз (↑РІС)	Преобладающие признаки	D-димеры	ИАП	Типичные причины
ДВС с подавлением фибринолиза		Органическая недостаточность	Незначительно повышены	Значительно повышен	Сепсис
ДВС при сбалансированных процессах коагуляции и фибринолиза		Кровотечения	Повышены	Слегка повышен	Злокачественные новообразования
ДВС с гиперфибринолизом					

3 формы ДВС-синдрома [5]:

ТАТ – thrombin-antithrombin complex (тромбин-антитромбиновый комплекс), РІС – plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex (плазмин-антиплазминовый комплекс), ИАП – ингибитор активатора плазминогена, ОПМЛ – острый промиелоцитарный лейкоз.

служить ДВС при отслойке плаценты. Явления полиорганной недостаточности редко бывают выражены, так как блокада микроциркуляторного кровотока быстро устраняется благодаря активации фибринолиза. Развитие кровотечений обусловлено коагулопатией потребления в сочетании с высокой фибринолитической активностью плазмы крови.

Однако следует учитывать тот факт, что в некоторых случаях вызванный одним и тем же фактором ДВС-синдром у разных пациентов может протекать по-разному. Продолжительность и выраженность традиционно выделяемых в патогенезе ДВС-синдрома 4 стадий [8], может значительно отличаться, и вклад нарушений того или иного звена системы гемостаза при этом будет также неодинаков. Более того, не все стадии могут проявляться клинически, протекая в скрытой форме. Все это затрудняет своевременное выявление, диагностику и лечение синдрома ДВС.

Какие же звенья гемостаза оказываются максимально нарушенными при этиологически и патогенетически различных вариантах ДВС-синдрома?

1 стадия — гиперкоагуляция. Будучи инициальным звеном ДВС-синдрома любой этиологии, данная стадия является основной и обуславливает главные проявления ДВС-синдрома в первую очередь на фоне септических состояний. Несмотря на то, что ее основным механизмом является активация коагуляционного гемостаза по внешнему или внутреннему механизмам [6], развитие данной стадии может осуществляться с участием практически всех звеньев системы гемостаза:

— Активация форменных элементов крови и усиление микровезикуляции. Значительная активация тромбоцитов показана у больных со стафилококковыми и стрептококковыми инфекциями. При этом наблюдается усиление как процессов адгезии тромбоцитов (через взаимодействие с фактором Виллебранда), так и их агрегации (например, через связывание фибриногена и усиления его взаимодействия с IIb-IIIa гликопротеиновыми рецепторами тромбоцитов). Некоторые белки стрептококков усиливают процессы адгезии и агрегации напрямую, связываясь с гликопротеиновыми рецепторами тромбоцитов, Toll-подобными рецепторами и рецепторами к компонентам системы комплемента [9]. Грам-отрицательные микроорганизмы содержат эндотоксин, который стимулирует выделение макрофагами тканевого фактора, а тромбоцитами — фактора активации тромбоцитов [2]. Одним из механизмов активации тромбоцитарно-сосудистого гемостаза при грам-отрицательных инфекциях является повреждение эндотелия. Так, при эндотоксинемии выявлено значительное увеличение в крови циркулирующих десквамированных эндотелиальных клеток, усиление вазоконстрикторных реакций в ответ на норадреналин, увеличение активности процессов перекисного окисления липидов [10]. Опухолевые микроэмболы вызывают агрегацию тромбоцитов [11]. Повышение агрегационной способности тромбоцитов наблюдается и при беременности [12]. Усиление агрегационной активности тромбоцитов может быть обусловлено избытком гомоцистеина в крови. В качестве наиболее вероятного механизма авторы предполагают изменения в тиол-дисульфидном обмене с поверхностными белками тромбоцитов [13]. Активация тромбоцитов сопровождается многократным усилением

нием образования микровезикул (МВ), содержащих прокоагулянты и проагреганты, вплоть до полного распада кровяных пластинок под действием тромбина [14]. Эндотелиальная микровезикуляция усилена у больных с антифосфолипидным синдромом, что опосредует его тромботические осложнения [15]. Значение микровезикуляции тромбоцитов и эндотелия в развитии гиперкоагуляции известно достаточно давно [16, 17]. Но до сих пор это явление, так же как и роль лейкоцитов и эритроцитов порой недостаточно учитывается при рассмотрении нарушений гемостаза. А она не так уж и мала. В лейкоцитах содержатся вещества, по своим свойствам аналогичные 3-му и 4-му факторам тромбоцитов. Имея больший размер, чем тромбоциты и эритроциты, лейкоциты медленнее движутся в микрососудах и интенсивнее адгезируют к эндотелию, особенно в посткапиллярных венах, что само по себе уже способствует нарушениям кровотока. Так, анализируя истории болезни больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения, Б.И. Кузник и соавт. пришли к выводу, что чем выше была выраженность лейкоцитоза у них, тем больше наблюдалось летальных исходов. Количество лейкоцитов закономерно увеличивается при инфекциях и лейкозах. Лейкоциты при лейкозах образуют больше Р-селектина, вследствие чего усиливается их агрегация с тромбоцитами. При различных патологических процессах можно наблюдать образование лимфоцитарно-тромбоцитарных, нейтрофильно-тромбоцитарных и эритроцитарно-тромбоцитарных агрегатов [2, 18]. Активированные лейкоциты, как и тромбоциты, образуют МВ. Микровезикуляция усилена у больных с острыми лейкозами и другими злокачественными опухолями, инфекционными заболеваниями. Эритроциты, не являясь основными участниками гемостаза, тем не менее причастны к его регуляции. Показано, что эритроцитарные МВ здоровых доноров снижают скорость и степень агрегации тромбоцитов. При ожоговой болезни эта их функция выражена в меньшей степени, и, несмотря на то, что количество МВ увеличивается, наблюдается усиление коагуляционного потенциала. Усиление микровезикуляции, судя по всему, обусловлено усилением гликирования гемоглобина и дестабилизацией липидов мембран эритроцитов. При этом повышается вязкость гемоглобина и снижается деформируемость эритроцитов, что закономерно приводит к усилению их агрегационной способности [19, 20].

— *Усиление образования тромбина под действием тканевого фактора (тканевого тромбопластина).* Поступление избытка тканевого фактора в кровоток характерно для акушерской патологии (эмболия околоплодными водами, отслойка плаценты), что на фоне физиологической гестационной гиперкоагуляции сопровождается быстрым тромбообразованием. При воспалении (особенно при септических состояниях), опухолевом росте цитокины стимулируют экспрессию ткане-

вого фактора клетками эндотелия [5]. В макрофагах синтез тканевого фактора усиливается под действием тромбина, церулоплазмينا, ангиотензина II, содержание которых может быть повышено при различных заболеваниях [2]. У пациентов со злокачественными новообразованиями также увеличено образование прокоагулянтных липидов. Опухолевые прокоагулянты являются прямыми активаторами фактора X. Сам тканевой фактор экспрессируется на поверхности опухолевых клеток, а также активно освобождается ими в кровоток в виде микропузырьков диаметром 0,1—1 мкм [11].

— *Контактная активация системы гемостаза.* Исходя из современной концепции свертывания крови [21], внутренний путь активации системы коагуляции в физиологических условиях практически не функционирует. Сомнение в важности внутреннего пути для свертывания крови было высказано более 50 лет назад Д.М. Зубаировым, когда им было обнаружено, что фактор Хагемана может активироваться не только при контакте с субэндотелием, но и на различных поверхностях, которые заряжены отрицательно, а также под действием некоторых веществ [22]. С другой стороны, при некоторых заболеваниях и патологических процессах может наблюдаться аномальная гиперактивация контактного комплекса. Например, при инфекциях в очаге воспаления наблюдается аккумуляция нейтрофилов. Относительно недавно было выяснено, что одним из механизмов бактерицидной активности нейтрофилов является формирование т.н. нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps — NET). При этом из лейкоцитов высвобождаются ДНК, РНК, гистоны, миелопероксидаза и другие вещества, которые формируют «ловушку», обладающую полианионной поверхностью. Аналогичной поверхностью обладают и клетки злокачественных опухолей, в цитоплазматической мембране которых повышено содержание анионных фосфолипидов [11]. В результате этого процесса и происходит контактная активация XII фактора свертывания крови [23-25]. Также свободная ДНК и другие клеточные компоненты обнаруживаются в крови больных со злокачественными опухолями, что тоже является предпосылкой к усилению тромбообразования [26].

— *Недостаточность антикоагулянтов (анти-тромбин III, протеины С и S).* Усиленное разрушение антикоагулянтов, например, под действием лейкоцитарных ферментов, наблюдается при различных воспалительных процессах. Физиологический дефицит антитромбина III формируется при беременности. При бактериальных инфекциях описан дефицит ингибитора тканевого фактора (TFPI — tissue factor pathway inhibitor), что ассоциируется с тяжелым течением пневмоний и создает возможность развития ДВС-синдрома, в то время как применение рекомбинантного TFPI продемонстрировало хороший терапевтический эффект при внебольнич-

ных пневмониях [27]. Наиболее вероятно, что это связано с его противовоспалительной активностью. При злокачественных опухолях TFR1 разрушается ферментом гепаринойазой, что тоже сопровождается избыточной активностью тканевого фактора [11].

— *Недостаточность фибринолиза.* При бактериемии и эндотоксинемии под действием цитокинов (фактора некроза опухоли и интерлейкина-1) повышается синтез ингибитора активатора плазминогена, что сопровождается гиперкоагуляцией. Интерлейкин-2 также ингибирует фибринолиз [2]. С одной стороны, это изменение имеет и защитное значение. Например, показано, что у мышей, имеющих дефицит фибриногена, тромбин-активируемого ингибитора фибринолиза или ингибитора активатора плазминогена инфекции, вызванные *Y. enterocolitica* и некоторыми другими возбудителями, протекают намного тяжелее, а у плазминоген-дефицитных мышей повышена устойчивость к *Y. pestis* [28]. Снижение фибринолитической активности крови было обнаружено у беременных с метаболическим синдромом [12].

Разобрав подробно ведущие к гиперкоагуляции нарушения системы гемостаза, нельзя не упомянуть о том, что одна из основоположников учения о ДВС-синдроме М.С. Мачабели считает, что инициальным моментом гиперкоагуляции является уменьшение отрицательного заряда клеток и свертывание их цитоплазмы, и лишь затем начинается свертывание плазмы крови. Разделяя эти идеи, Б.И. Кузник тем не менее отмечает, что данные о наличии факторов свертывания в различных структурах клеток пока еще недостаточны, тем более что в цитоплазме клеток тканевой фактор находится в растворимой форме, практически не обладающей прокоагулянтной активностью [2, 29].

2 стадия — **нарастающая коагулопатия потребления с компенсаторным усилением фибринолиза.** Механизм развития гипокреотации наглядно отражен в ее названии — тромбоциты, фибриноген (как основные составляющие компоненты тромбов) и другие факторы свертывания расходуются в процессе тромбообразования. Поскольку процессы гемостаза и антигемостаза функционируют параллельно друг другу, снижается количество антитромбина III и других антикоагулянтов. Также может уменьшаться и их синтез, например, вследствие нарушения функции печени при недостаточном кровотоке в ней (характерно для ДВС с преобладанием полиорганной недостаточности). Компенсаторное усиление фибринолиза, в случае незначительной его активации, имеет защитное значение, снижение тромбообразования предотвращает или уменьшает степень дистрофических изменений внутренних органов. При значительном повышении активности фибринолиза наступает следующая стадия.

3 стадия — **дефибринация крови и гиперактивация фибринолиза.** Повышение активности фибринолиза в сочетании со снижением агрегационной способности тромбоцитов показано у больных хроническим миелолейкозом, но ввиду сбалансированности активности фибринолиза и коагуляции кровотока не наблюдаются [30]. Неотъемлемым и наиболее значимым элементом ДВС-синдрома данная стадия становится при преждевременной отслойке плаценты, остром промиелоцитарном лейкозе, раке простаты, некоторых гемангиомах. В частности, при остром промиелоцитарном лейкозе гиперактивация фибринолиза обусловлена экспрессией аннексина II, являющегося корцептором плазминогена и тканевого активатора плазминогена [11]. Эту стадию ДВС-синдрома (равно как и ДВС с преобладанием фибринолиза) надо дифференцировать от коагулопатии, индуцированной травмой и шоком (СОТ-АСОТС) [31]. Если в основе ДВС-синдрома фибринолитического типа лежит активация фибринолиза, то СОТ-АСОТС возникает как результат блокады свертывания крови посредством усиления синтеза эндотелием тромбомодулина, образующего комплекс с тромбином и активирующего протеин С, который, в свою очередь, ингибирует V и VIII факторы свертывания крови, а также может нейтрализовывать ингибитор активатора плазминогена.

В результате фибринолиза в крови повышается содержание продуктов деградации фибрина (ПДФ), которые нарушают переход фибриногена в фибрин, поэтому свертывание крови прекращается, несмотря на наличие остальных активных факторов свертывания. В дальнейшем под действием фибринолизина происходит разрушение большинства факторов свертывания крови, тромбоцитарных гликопротеинов, что еще больше нарушает процесс свертывания. Более того, фибринолизин может повреждать компоненты стенки микрососудов, что сопровождается увеличением их проницаемости и развитием диффузной кровоточивости (легочные, желудочно-кишечные, маточные, почечные кровотечения).

4 стадия — **восстановительная.** Характеризуется явлениями органной недостаточности, обусловленной нарушениями кровотока в предыдущие стадии. Происходит постепенное восстановление нормального гемокоагуляционного потенциала.

Таким образом, складывающаяся картина патогенеза различных форм ДВС-синдрома позволяет предположить, что при диагностике и подборе наиболее оптимального его лечения необходимо руководствоваться не столько стадией, сколько ведущими механизмами, участвующими в развитии именно этой этиологической разновидности ДВС-синдрома. При наличии у пациента заболе-

вания, часто ассоциирующегося с развитием ДВС-синдрома, можно подобрать необходимые лабораторные тесты, выявляющие те или иные нарушения системы гемостаза, что особенно важно на самых начальных стадиях развития синдрома или при малосимптомном его течении и вовремя эти нарушения скорректировать.

References

- Zubairov D.M. Current evidence for the concept of continuous blood coagulation. *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2010; 1: 17-21. (In Russian)
- Kuznik B.I. *Cellular and molecular mechanisms of hemostasis system regulation in physiologic and pathological conditions. [Kletochnye i molekulyarnye mekhanizmy regulyatsii sistemy gemostaza v norme i patologii]*. Chita: Ekspres-izdatel'stvo; 2010. (In Russian)
- Machabeli M.S. Thrombohemorrhagic Theory of General Pathology. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 1986; 2: 56-82. (In Russian)
- Kuznik B.I. Coagulation and fibrinolytic activity of lymph in various pathological conditions (review of own and literature data). *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya*. 2013; 1: 99-109. (In Russian)
- Asakura H. Classifying types of disseminated intravascular coagulation: clinical and animal models. *J. of Intensive Care*. 2014; 2(1). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4267600/> (Accepted: 19 February 2014 Published: 6 March 2014)
- Makacarija A.D., Panfilova O.Ju. On the issue of DIC-syndrome in obstetrics: New on the old one. *Prakticheskaya meditsina*. 2010; 4 (43): 25-37. (in Russian)
- Wada H., Matsumoto T., Yamashita Y. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *J. of Intensive Care*. 2014; 2(1). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4267589/> (Accepted: 10 February 2014 Published: 20 February 2014)
- Alekseeva L.A., Ragimov A.A. *DIC: guideline. [DVS-sindrom: rukovodstvo]* Moscow: GJeOTAR-Media; 2010. (in Russian)
- Cox D., Kerrigan S.W., Watson S.P. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J. of Thrombosis and Haemostasis*. 2011; 9 (6): 1097-107.
- Milosh T.S., Maksimovich N.Ye. The endothelium of the vessels and prooxidative-antioxidative balans in pregnancy rats with endothoxinaemia. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59 (1): 59-63. (In Russian)
- Falanga A., Marchetti M., Vignoli A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. *J. of Thrombosis and Haemostasis*. 2013; 11 (2): 223-33.
- Mochalov A.A., Sokolov E.I., Manuhin I.B., Nevzorov O.B. Coagulation disorders in pregnant women with metabolic syndrome and their correction. *Lechashhiy vrach*. 2011; 3. Available at: <http://www.lvrach.ru/2011/03/15435147> (Accessed 28 March 2011). (in Russian)
- Rotkina A.S., Romanova E.P., Moskovtsev A.A., Kybatiev A.A. Dynamics of changes of ADP-, thrombin-induced platelet aggregation activity in the presence of an excess of homocysteine in vitro. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya*. 2012; 4: 80-8. (In Russian)

- Ponomareva A.A., Nevzorova T.A., Mordakhanova E.R., Andrianova I.A., Litvinov R.I. Structural characterization of platelets and platelet-derived microvesicles. *Tsitologiya*. 2016; 58(2): 105-14. (In Russian)
- Zubairova L.D., Zubairov D.M. Developing conceptions of antiphospholipid syndrome and their meaning for neurology. *Nevrologicheskii vestnik*. 2010; XLII (1): 95-101. (In Russian)
- Kuznik B. I. Development of D.M. Zubairov ideas by the Chita School of Hemostasis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 96 (5): 709-15. (In Russian)
- Zubairov D.M., Andrushko A.A., Storozhev A.L. Role of vascular and thrombocytic membranes in hypercoagulation states. *Kardiologiya*. 1974; 11: 75-80. (In Russian)
- Vitkovsky Yu.A., Kuznick B.I., Solpov A.V. Pathogenetic significance of lymphocyte-to-platelet adherence. *Meditsinskaya immunologiya*. 2006; 8 (5-6): 745-53. (In Russian)
- Levin G.Ya., Sukhareva E.G. The influence of erythrocyte-derived microvesicles on aggregation of platelets in burn injury. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59 (3): 62-8. (In Russian)
- Levin G.Ya., Sukhareva E.G., Egorihina M.N. The role of erythrocyte microvesiculation and hemoglobin glycation in hemorheological disorders during burn injury. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59 (4): 21-5. (In Russian)
- Hoffman M., Monroe III Dougald M. A Cell-based Model of Hemostasis. *J. of Thrombosis and Haemostasis*. 2001; 85 (6): 958-65.
- Timerbaev V.N., Kiselev S.V. The development of the blood clotting initiation conceptions: from A.A. Schmidt to D.M. Zubairov. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 94 (5): 755-60. (In Russian)
- Dolgushin I.I., Andreeva Ju.S., Ryzhkova A.I. Neutrophil extracellular traps. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2009; XVI (2): 14-6. (In Russian)
- Schmaier A.H. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *J. of Thrombosis and Haemostasis*. 2016; 14 (1): 28-39.
- Zawrotniak M., Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) — formation and implications. *Acta biochimica Polonica*. 2013; 60 (3): 277-84.
- Gould T. J., Lysov Z., Liaw P. C. Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. *J. of Thrombosis and Haemostasis*. 2015; 13 (IS S1): S82-91.
- Maroney S.A., Mast A.E. Tissue factor pathway inhibitor and bacterial infection. *J. of Thrombosis and Haemostasis*. 2011; 9 (1): 119-21.
- Korhonen T.K. Fibrinolytic and procoagulant activities of *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica*. *J. of Thrombosis and Haemostasis*. 2015; 13 (Suppl. 1): S.115-20.
- Machabeli M.S., Poleskij V.A., Hvatov B.V., Tihonov V.P. et al. *General Electrocoagulology [Obshchaya elektrokoagulologiya]*. Moscow: 1995. (in Russian)
- Saraeva N.O., Andreeva E.O. Hemostasis and anemia in patients with multiple myeloma and chronic myeloid leukemia. *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2005; 22 (2): 30-4. (in Russian)
- Gando S., Wada H., Thachil J. Differentiating disseminated intravascular coagulation (DIC) with the fibrinolytic phenotype from coagulopathy of trauma and acute coagulopathy of trauma-shock (COT/ACOTS). *J. of Thrombosis and Haemostasis*. 2013; 11 (5): 826-35.

Сведения об авторах:

Серебренникова Светлана Николаевна, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии с курсом клинической иммунологии.

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.831-06.328-091

Бывальцев В.А.^{1,2,3,4}, Степанов И.А.¹, Белых Е.Г.¹, Яруллина А.И.¹

Молекулярная биология менингиом головного мозга

¹ ФГБОУ «Иркутский государственный медицинский университет», Курс нейрохирургии,

664003, Иркутск, Россия, ул. Красного Восстания, д. 1

² НУЗ «Дорожная клиническая больница на станции Иркутск-Пассажирский», 664082, Иркутск, Россия, ул. Боткина, д. 10

³ ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», научно-клинический отдел нейрохирургии и травматологии, 664003, Иркутск, Россия, ул. Борцов Революции, д. 1

⁴ ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования», 604049, Иркутск, Россия, мкр. Юбилейный, д. 100

Цель обзора — анализ современных данных литературы о нарушении внутриклеточных сигнальных путей, играющих ведущую роль в развитии менингиом, генетических и молекулярных профилях данной группы опухолей. К настоящему времени изучено множество aberrantных сигнальных внутриклеточных путей, которые играют важнейшую роль в развитии менингиом головного мозга. Четкое понимание поврежденных внутриклеточных каскадов поможет изучить влияние генетических мутаций и их эффектов на менингиомогенез. Подробное исследование генетического и молекулярного профиля менингиом позволит сделать первый уверенный шаг в разработке более эффективных методов лечения данной группы интракраниальных опухолей. Хромосомы 1, 10, 14, 22 и связанные с ними генные мутации ответственны за рост и прогрессию менингиом. Предполагается, что только через понимание данных генетических повреждений будут реализованы новейшие эффективные методы лечения. Будущая терапия будет включать в себя комбинации таргетных молекулярных агентов, в том числе генную терапию, малые интерферирующие РНК, протонную терапию и другие методы воздействия, как результат дальнейшего изучения генетических и биологических изменений, характерных для менингеальных опухолей.

Ключевые слова: менингиомы головного мозга, туморогенез, молекулярная биология, ген NF2, мерлин.

Для цитирования: Бывальцев В.А., Степанов И.А., Белых Е.Г., Яруллина А.И. Молекулярная биология менингиом головного мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(2): 82—91. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.82-91

Для корреспонденции: Бывальцев Вадим Анатольевич, доктор мед. наук, проф., зав. курсом нейрохирургии ФГБОУ ВО «Иркутского государственного медицинского университета», гл. нейрохирург Департамента здравоохранения ОАО «РЖД», зав. научно-клиническим отделом нейрохирургии и ортопедии Иркутского научного центра хирургии и травматологии, проф. каф. травматологии, ортопедии и нейрохирургии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования e-mail: byval75vadim@yandex.ru

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 14-32-00006).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.10.2016

Byvaltsev V.A.^{1,2,3}, Stepanov I.A.¹, Belykh E.G.¹, Yarullina A.I.¹

Molecular biology of brain meningiomas

¹ Irkutsk State Medical University, Ministry of Health, 1, Krasnoe Vosstanie str., Irkutsk, 664003, Russia

² Railway Clinical Hospital on the station Irkutsk-Passazhirskiy of Russian Railways Ltd., 10, Botkina str., Irkutsk, 664082, Russia

³ Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, 1, Bortsov Revolutsii str., Irkutsk, 664003, Russia

⁴ Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, 100, Yubileyniy Microdistrict, Irkutsk, Russia, 604043

Meningiomas are by far the most common tumors arising from the meninges. A myriad of aberrant signaling pathways involved with meningioma tumorigenesis, have been discovered. Understanding these disrupted pathways will aid in deciphering the relationship between various genetic changes and their downstream effects on meningioma pathogenesis. An understanding of the genetic and molecular profile of meningioma would provide a valuable first step towards developing more effective treatments for this intracranial tumor. Chromosomes 1, 10, 14, 22, their associated genes, have been linked to meningioma proliferation and progression. It is presumed that through an understanding of these genetic factors, more educated meningioma treatment techniques can be implemented. Future therapies will include combinations of targeted molecular agents including gene therapy, si-RNA mediation, proton therapy, and other approaches as a result of continued progress in the understanding of genetic and biological changes associated with meningiomas.

Keywords: brain meningiomas, tumorigenesis, molecular biology, NF2 gene, merlin.

For citation: Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Belykh E.G., Yarullina A.I. Molecular biology of brain meningiomas. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(2): 82–91. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.82-91

For correspondence: Vadim A. Byvaltsev, Doctor of Medical Sciences, The Head of Neurosurgery Course of Irkutsk State Medical University, 1, Krasnoe Vosstanie str., Irkutsk, 664003, Russian Federation, e-mail: byval75vadim@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

Acknowledgement. The study was supported by the Russian scientific fund (№ 14-32-00006).

Information about authors:

Byvaltsev V.A., <http://orcid.org/0000-0003-4349-7101>

Stepanov I.A., <http://orcid.org/0000-0001-9039-9147>

Belykh E.G., <http://orcid.org/0000-0003-2060-5739>

Yarullina A.I., <http://orcid.org/0000-0002-2085-5869>

Received 11.10.2016

Введение

Менингиомы — это доброкачественные опухоли, происходящие из клеток менинготелия (арахноэндотелия), который выстилает поверхности твердой и паутинной оболочек мозга, а также участки сосудистых сплетений желудочков [1]. Заболеваемость внутричерепными менингиомами составляет в зависимости от возраста пациента в среднем от 3 до 8 случаев на 100 000 населения в год [2], занимая второе место после глиом по распространенности. Развитие менингиом иногда сопровождается инвазией мозга, твердой мозговой оболочки прилежащей кости с образованием гиперостозов и экстракраниальных узлов, особенно при локализации менингиом в области ольфакторной ямки, крыльев основной кости и основания средней черепной ямки. Из-за частого вовлечения в опухолевый процесс синусов твердой мозговой оболочки и магистральных сосудов мозга частота инвазивного роста менингиом составляет 45% [3, 4].

Цитогенетическим источником менингиом являются трансформированные менинготелиальные клетки паутинной оболочки, среди которых важная роль отводится наследственным факторам. Так мутация, потеря или инактивация супрессора опухолевого роста — гена NF2 наблюдается более чем в половине случаев менингиом у пациентов с нейрофиброматозом II типа [5, 6]. Установлена связь с ионизирующим излучением, в результате дозозависимого воздействия которого менингиомы образуются с латентным периодом в несколько десятков лет [7, 8]. Обсуждается роль гормональных факторов [9], влияние магнитных полей высокой силы (промышленные установки, магнитно-резонансные томографы).

Вероятность рецидива менингиом определяется полнотой резекции опухоли [10] и ее гистологическим вариантом [11] (таблица).

Цель настоящего обзора — анализ современных данных литературы о работе нарушенных внутриклеточных сигнальных путей, играющих ведущую роль в развитии менингиом, а также генетических и молекулярных профилях данной группы опухолей. Подробное изучение этих проблем позволит разработать новые таргетные терапевтические препараты, которые уже в ближайшем будущем могут быть транслированы в нейроонкологическую практику.

Генетика менингиом

Несмотря на открытие различных хромосомных аномалий, aberrантных сигнал-трансдукторных систем и клеточных факторов роста, ассоциированных с развитием менингиом, по-прежнему многое в патогенезе данной группы опухолей остается неясным [12]. Именно активное развитие методов молекулярной генетики позволило максимально приблизиться к ключевым основам менингиомогенеза. Некоторые гены были определены, как мишени для активации или торможения опухолевого роста [13]. Обнаружены дополнительные участки хромосом в клетках менингиом, которые могут подвергаться делеции или амплификации, а следовательно иметь потенциальную туморсупрессорную или, напротив, протоонкогенную функцию [14, 15]. Подробно рассмотрена генетика менингиом различной степени злокачественности (рис. 1).

Молекулярная генетика типических менингиом (M I). Развитие менингиом является следствием генетических мутаций и aberrаций генома. Так, большинство менингеальных опухолей I степени злокачественности (50—60%) содержат мутацию гена NF2, расположенного на 22 хромосоме (локализация q12.2) [16]. Мутации, локализованные в данном участке хромосомы способны приводить к развитию нейрофибро-

Таблица

Гистологическая классификация менингиом (WHO, 2007)

Тип менингиомы	Степень злокачественности
Менингиомы с низким риском рецидивирования и агрессивного поведения	
Менинготелиоматозная	G = 1
Фиброзная	
Переходная	
Псаммоматозная	
Ангиоматозная	
Микрокистозная	
Секреторная	
С обилием лимфоцитов	
Метапластическая	
Менингиомы с высокой вероятностью рецидивирования и агрессивного поведения	
Атипическая	G = 2
Хордоидная	
Светлоклеточная	
Анапластическая	G = 3
Рабдоидная	
Папиллярная	

матоза II типа, основным проявлением которого является формирование опухолей ЦНС (чаще шванном и менингиом) [17].

Ген NF2 кодирует синтез белка мерлина, который является мощным туморсупрессорным агентом для многих типов клеток. Продукт гена NF2 принадлежит семейству структурных белков 4.1, которые связаны с интегральными мембранными белками клеточного цитоскелета [18]. Свое название белок мерлин получил за поразительное структурное сходство с ERM-протеинами (moesin, ezrin and radixin-like protein). Доказано, что для различных гистологических типов менингиом уровень потери мерлина значительно отличается. Так, для менинготелиоматозных ме-

нингиом характерен низкий уровень утраты белка мерлина, в отличие от опухолей фибробластического и смешанного типов [19].

Мерлин через процессы фосфорилирования взаимодействует с концевыми аминокислотными доменами его эффекторных белков. Мерлин располагается в тех участках цитоплазматической мембраны, которые ответственны за обеспечение клеточных контактов и миграцию. К настоящему времени обнаружены несколько классов мерлинзависимых белков [20]. Класс 1-й представлен белками клеточной мембраны, которые взаимодействуют с FERM-протеинами (CD44 и β1-интегрин). Белки, участвующие в перестройке клеточного цитоскелета (β2-спектрин, актин, паксиллин, синтенин) — относятся ко 2-му классу мерлинзависимых белков. И, наконец, последней группой мерлинопосредованных белков являются протеиновые комплексы, обеспечивающие ионный транспорт и эндоцитоз [21].

Мутация в гене NF2 приводит к снижению синтеза белка мерлина. В ответ на это менинготелиоциты начинают активно продуцировать YAP-протеин (yes-associated protein), что приводит к неконтролируемой клеточной пролиферации. Доказано, что в клетках менингеальных опухолей гиперэкспрессия YAP ассоциирована с потерей мерлина (мутация NF2). Мерлин контролирует уровень экспрессии YAP-протеина и тем самым регулирует пролиферацию и непреднамеренный вход клетки в S-фазу клеточного цикла. В недавнем исследовании показано,



Рис. 1. Ключевые механизмы патогенеза различных типов менингиом [по Winwand C. et al. 2011].

что в развитии менингиом головного мозга играют роль и другие белки семейства 4.1 [22]. К примеру, утрата белка 4.1B (DAL-1) является еще одним важным признаком типических менингиом. Утрата как DAL-1, так и мерлина обнаруживается в 50% случаев доброкачественных менингиом. Делеция гена TSLC-1 (ген супрессор опухоли рака легких-1), ответственный за синтез белка, который взаимодействует с DAL-1 обнаруживается в 30-85% случаев спорадических менингиом. Кроме того, в патогенезе менингиом отводится особая роль клеточным факторам роста (эпидермальный, инсулиноподобный, фибробластический и β -тромбоцитарный факторы) [23], которые избыточно синтезируются в опухолевых клетках и способствуют активному росту менингиом за счет неоваскуляризации и развитию перифокального отека.

Молекулярная генетика злокачественных менингиом (М II/III)

Около 60% менингиом II степени злокачественности имеют точечные хромосомные мутации (чаще делеции). Более того, 75-90% менингиом III степени злокачественности также имеют схожие точечные хромосомные aberrации [24]. Мутации в 1p и 14q участках хромосом (где расположены туморсупрессорные гены) ассоциируются с неблагоприятным клиническим прогнозом [25]. Повреждения хромосомы 1 не являются общим генетическим признаком для всех типических менингиом, они могут играть определенную роль в прогрессировании злокачественных форм менингеальных опухолей [25].

Ген PTEN, расположенный рядом с участком p23.3 хромосомы 10 оказывает мощный антионкогенный эффект [26, 27]. Продуктом гена PTEN является белок фосфотидилинозитолфосфат. В нормальных клетках данный белок тормозит АКТ/РКВ-внутриклеточный сигнальный путь, который имеет ключевое значение в развитии не только менингиом, но и других первичных опухолей ЦНС [28]. АКТ/РКВ-путь активизирует пролиферацию клеток в ЦНС, особенно глиальных клеток, эпендимы и клеток менингеотелия [29]. Несмотря на то, что ген PTEN играет роль в патогенезе многих опухолей ЦНС, его влияние на опухолевый рост менингиом сильно отличается. Так, для доброкачественных менингиом (М I) ген PTEN имеет лишь второстепенное значение, однако, в развитии и прогрессировании злокачественных форм менингеальных опухолей он играет первоочередную роль. Делеции в хромосомах 10 и 14 характерны для менингиом высокой степени злокачественности. Делеции в указанных хромосомах приводят к экспрессии генов, активирующих онкоген-

ные внутриклеточные каскады, такие как Wnt-путь (CTNNB1, CDK5R1, ENC1, CCND1) и IGF-опосредованные пути (IGF2, IGFBP3, АКТ3) [30]. Кроме того, мутации гена SUFU, расположенного на 10 хромосоме (локус 10q24) также присущи атипическим менингиомам [31]

Не-NF2 мутации онкогенов также обнаружены в менингиомах различных степеней злокачественности [31]. Мутация Glu17Lys в домене гена АКТ-1 (локализация 14q32.32) является единственной в популяции опухолевых клеток, не имеющих генетических повреждений в гене NF2. Такая мутация приводит к активации протеинкиназы В (АКТ-киназы), которая чрезмерно фосфорилирует факторы АКТ/РКВ-пути и включает его в работу. Следствием этого является усиленный синтез YAP, который подавляет активность проапоптотических генов, активируемых после повреждения клеточной ДНК [31]. Повреждения гена GADD45A когда-то считались важным этапом патогенеза менингиом и других опухолей ЦНС. Однако, в настоящее время никаких убедительных доказательств этого не обнаружено. Особое внимание уделяется гену IMP3, белковый продукт которого является биомаркером агрессивности опухоли [32]. Мутации хромосомы 9 главным образом связаны с инвазивным ростом менингиом высокой степени злокачественности (М III) [33, 34]. Утрата короткого плеча 9-й хромосомы обнаруживается в 5% типических менингиом, в 18% атипических и в 38% случаев анапластических менингиом [35]. Потери CDKN2A (p16), p14 (ARF), и CDKN2B (p15) представляют собой основные повреждения короткого плеча 9-й хромосомы (локус 9p21), которые характерны для анапластических менингиом [36-39]. Гены p16, p14 и p15, регулируют апоптоз через модуляцию (p14) и прогрессию клеточного цикла через G1 к S фазе (p15 и p16) [40, 41], p14 регулирует активность опухолевого белка-супрессора p53 путем связывания с MDM2 и его ингибирования. Роль регуляторов G1/S-фазового перехода выполняют p53, p15 и p16, путем ингибирования активности циклин-зависимых киназ CDK4 и CDK6 [41]. Говоря об активности теломеразы, стоит отметить, что в 95% случаев атипических и анапластических форм менингиом отмечается ее активность, но механизмы активации последней до сих пор не известны [42].

Внутриклеточные сигнальные пути в менингиомах

К настоящему времени изучено большое количество внутриклеточных сигнал-трансдукторных систем (рис. 2), которые активируются различными генетическими факторами и приводят к развитию первич-

ных опухолей ЦНС, в том числе и менингиом. Например, $pRb/p53$ -сигнальный путь отвечает за рост опухолевого узла и переход доброкачественных форм менингиом в атипические и/или анапластические. Гены $p16$ (INK4a), $p15$ (INK4b), и $p14$ (ARF), как уже было сказано, являются модуляторами сигнальных путей и обеспечивают прочную связь белка Rb (pRb) с транскрипционным фактором E2F [43]. При мутациях в указанных генах, фактор E2F освобождается от ингибирующего влияния pRb , что сопровождается переходом клеточного цикла в G1/S-фазу [44]. Ген $p53$ обладает выраженной антионкогенной активностью за счет нескольких механизмов: торможения клеточного цикла, репарации клеточной ДНК, индукции апоптоза, а также за счет ингибирующего влияния на $pRb/p53$ -сигнальный путь. После того, как повышается регуляция экспрессии циклина D (например, при митогенной стимуляции) он связывается с CDK4 или CDK6 и фосфорилирует pRb , что индуцирует высвобождение активного E2F фактора, и в конечном итоге приводит к транскрипции генов, которые имеют решающее значение для перехода из G1/S-фазу. Гены $p16$ и $p15$ предотвращают переход в S-фазу путем ингибирования CDK4/циклин D комплекса [45]. В свою очередь, $p53$ путь действует как ингибитор обратной связи $pRb/p53$ -пути, индуцируя торможение клеточного цикла, восстановление ДНК и апоптоз в случае аномальной активации $pRb/p53$ -пути. Путь $pRb/p53$ работает через $p14$. Высвобождение фактора транскрипции E2F, следующего за pRb фосфорилированием, также индуцирует транскрипцию $p14$, что способствует активности $p53$ за счет отрицательной регуляции MDM2 (murine double minute 2 protein) протоонкогенов. Дисрегуляция этих двух путей в менингиомах высокой степени злокачественности часто ассоциируется с потерей $p16$, $p15$ и $p14$, усилением пролиферации клеток и прогрессирования опухоли [46].

Немаловажным клеточным сигнальным путем является Hh-путь (hedgehog), имеющий в своем арсенале большое количество генов. Гены Hh-пути отвечают за такие важнейшие клеточные процессы, как рост и пролиферация, ангиогенез, матричное ремоделирование и поддержание гомеостаза. Работа Hh-пути выглядит следующим образом. Hh-гены экспрессируют белки, подавляющие активность гена PTCH. В свою очередь ген PTCH активизирует работу трансмембранного SMO-белка, что приводит к реализации клеточного сигнала и синтезу GLI-транскрипционных факторов (GLI1, GLI2 и GLI3) [47]. Notch-внутриклеточный каскад представляет собой основной путь передачи сигналов от цитоплазматической мембраны к клеточному ядру с помощью целого ряда белков (Notch1-4) [41]. Экспрессия HES1 об-

наружена практически во всех типах менингеальных опухолей и часто сопряжена с коэкспрессией Jagged-лиганда, Notch1 и Notch2 [40]. TLE2/TLE3-сигнальный путь обладает активирующим влиянием на Split-группу корепрессоров, которые модулируют HES1. Последние исследования убедительно доказали, что данный сигнальный путь играет существенную роль в развитии менингиом высокой степени злокачественности [48]. Laurendeau и соавт. [49] проанализировали экспрессию мРНК менингиом в 32 образцах генов, относящихся к Hh-пути и обнаружили повышенные уровни 16 генов, участвующих в активации Hh-пути (такие, как GLI1, GLI2, SMO, FOXM1, IGF2 и SPP1) и росте клеток, а также уменьшении экспрессии 7 генов, участвующих в ингибировании Hh-пути. Для некоторых генов характерны различные профили экспрессии при опухолях различного гистологического типа. Многие авторы предполагают, что резко измененные профили на ранних стадиях онкогенеза способствуют прогрессии и трансформации в более злокачественные формы.

PI3K/Akt (фосфатидилинозитол-3-киназа) и MAPK (митогенактивированная протеинкиназа) внутриклеточные сигнальные пути — это два сложных каскада, которые активны во многих гистологических формах менингиом. Именно через данные пути осуществляется рост и прогрессия опухолевой ткани, за счет действия клеточных факторов роста. Активация PI3K-каскада ведет к Akt фосфорилированию, что сопровождается включением mTOR-сигнального пути регулирующего многие процессы в опухолевых клетках млекопитающих. Стоит отметить, что высокие уровни фосфорилированного Akt характерны для злокачественных форм менингеальных опухолей (M II/III) [50]. Снижение активности MAPK в менингиомах ассоциировано с высоким риском их рецидивирования, а рост опухолевого узла больше связан с PI3K/Akt-клеточным каскадом. PI3K представляют собой семейство внутриклеточных сигнал-преобразовательных ферментов, которые фосфорилируют инозитфосфолипиды. В результате включения в работу PI3K происходит фосфорилирование и активация PKB/Akt и впоследствии $p70^{S6K}$, которые являются ключевыми факторами стимуляции клеточного роста [51, 52]. Недавние исследования показали, что активированные мутации AKT также имеют место в подгруппе менингиом. MAPK являются внутриклеточными серин/треонин-специфическими протеинкиназами, которые активируются внеклеточными стимулами, что приводит к последовательной активации киназного каскада, иницированного Ras-, Raf-1-, MEK-1-, MAPK- и ERK-путями, которые в последствии активируют факторы транскрипции в ядре [53].

WNT/ β -катенин — внутриклеточный путь, которому также придается важное значение в патогенезе менингиом. В белках данного внутриклеточного каскада обнаружены мутации гена APC (adenomatous polyposis coli) и E-кадгерина. Показано, что для доброкачественных форм менингиом, в отличие от злокачественных, характерна делеция APC [54]. Однако, утрата гена CDH1, кодирующего синтез мембранного белка E-кадгерина — характерна для большинства злокачественных форм менингеальных опухолей [54]. Данный факт объясняется тем, что ген CDH1 имеет потенциальную супрессорную роль в клеточной инвазии, так как E-кадгерин выполняет функцию контроля регуляции межклеточной адгезии и подвижности. При делеции гена CDH1, нарушается синтез белка E-кадгерина и как следствие клетка утрачивает способность к межклеточной адгезии. При злокачественных опухолях, в том числе и при менингиомах II-III степени этот механизм является ключевым в диффузном росте и метастазировании опухолевой ткани [55]. Ген APC в клетке регулирует активность WNT/ β -катенинового каскада и тем самым выполняет туморсупрессорную функцию, а E-кадгерин в свою очередь значительно снижает опухолевую инвазию и рост [56].

Факторы клеточного роста занимают особое место в развитии менингиом. В настоящее время большое внимание уделяется фактору роста эндотелия сосудов A (VEGF A), который также называется фактором сосудистой проницаемости. Доказано, что mРНК VEGF A экспрессируется клетками менингиомы [57]. Считается, что VEGF A является ключевым регулятором ангиогенеза и формирования перитуморозного отека [57]. Исследования показали, что экспрессия mРНК VEGF A может коррелировать с васкуляризацией менингиомы. Однако, при определении белковых уровней VEGF A в сравнительно большом числе менингиом не удалось подтвердить связи со степенью васкуляризации, которая, в отличие от глиом не коррелирует со степенью злокачественности. Тем не менее, уровни VEGF A были повышены в атипичических менингиомах при сравнении с доброкачественными. Недавнее исследование показало корреляцию между экспрессией белка VEGF A и рецидивами доброкачественных менингиом [58]. Анализируются и другие факторы роста, включая VEGF B, плацентарный фактор роста, фактор роста гепатоцитов и фактор роста фибробластов 2. Однако, до сих пор не было установлено четкой корреляции между каким-либо из этих факторов и ангиогенезом или степенью злокачественности менингиомы. Роль других факторов роста (эпидермального, трансформирующего, инсулиноподобного и др.) противоречива и мало изучена. Однако известно, что рецепторы эпидерма-

льного фактора роста (EGFR) участвуют в злокачественной трансформации менинготелиоцитов, экспрессия трансформирующего фактора роста- β в клетках менингиомы ассоциирована с ее прогрессированием [59].

Современные возможности таргетной терапии менингиом

Многие исследования пролили свет на понимание молекулярной биологии и патогенеза различных злокачественных опухолей ЦНС, в частности глиом высокой степени злокачественности, в то время как о молекулярных механизмах развития менингиом известно немного. Высокий уровень экспрессии различных клеточных факторов роста, их рецепторов, а также активация ряда внутриклеточных сигнальных путей в опухолевых клетках — играют значительную роль в развитии менингиом. Для большей части пациентов с типическими и атипическими менингиомами, хирургия, радиотерапия и стереотаксическая радиохирurgia являются весьма эффективными методами лечения [60]. Однако, для пациентов с анапластическими формами менингиом характерен высокий процент рецидива, что связано с неблагоприятным прогнозом. А потому поиск альтернативных методов лечения для данной группы пациентов является актуальной проблемой [60, 61].

На сегодняшний день химиотерапевтическое лечение при менингиомах носит ограниченный характер. Данные мультицентровых клинических исследований указывают на то, что большинство химиотерапевтических препаратов имеют минимальную противоопухолевую активность в отношении менингиом. Ряд ис-



Рис. 2. Основные внутриклеточные сигнальные пути, связанные с развитием менингиом [по Arabinda et al., 2014].

следований отмечают различные по длительности периоды стабилизации опухолевого роста [62]. Однако сложно расценить это как улучшение, так как доброкачественные формы менингиом растут годами и могут быть стабильными в течение длительного периода времени.

Такие препараты, как дакарбазин и адриамицин, обладающие противоопухолевой активностью в отношении ряда опухолей мягких тканей не показали удовлетворительных результатов у больных с менингиомами [63]. Препараты гидроксимочевины, останавливающие рост клеток в S-фазе клеточного цикла и вызывающие апоптоз, обеспечили уменьшение размеров опухоли у пациентов с рецидивирующими доброкачественными менингиомами. Наблюдался один случай безрецидивного периода в течение 24 мес. у больного с полностью резецированной злокачественной менингиомой. Более поздние исследования показали, что гидроксимочевина обладает умеренной активностью с редкими ответами на терапию, но у некоторых пациентов происходит стабилизация роста менингиомы [64]. Темозоламид — алкилирующий агент, влияющий на рост злокачественных глиом, не оказывает значительного эффекта на менингиомы. При исследовании ингибитора топоизомеразы — иринотекана, выявлены токсические эффекты у 16 пациентов с доброкачественными менингиомами, но активность в отношении роста менингиом отсутствовала [65, 66]. Проводятся испытания целого ряда цитотоксических препаратов в отношении сарком и других системных опухолей, возможно, что некоторые из них окажутся эффективными и в отношении менингиом.

Предполагается, что препарат иматиниб мезилат обладает противоопухолевым действием в отношении рецидивирующих менингиом. Так, в исследовании NABTC 01-08 из 19 пациентов, ответ которых можно было оценить, у 10 был отмечен рецидив, в остальных 9 случаях рост опухоли стабилизировался. Рентгенографических ответов не наблюдалось. Интерес также представляет возможная комбинация данного препарата с препаратами гидроксимочевины [67].

Ингибиторы ангиогенеза оказывают прямое противоопухолевое воздействие, обеспечивают радиосенсибилизацию эндотелиальных клеток и повреждение сосудистой сети опухоли. За счет редукции сосудистого русла опухолевого узла происходит снижение интерстициального давления и улучшение оксигенации окружающего вещества головного мозга [68, 69]. Специфическими ингибиторами ангиогенеза с потенциальным радиосенсибилизирующим эффектом являются вандетиниб — ингибитор VEGFR и EGFR; ваталаниб — ингибитор VEGFR и PDGFR;

энзастаурин — ингибитор PKC- β 2 и PI3K/Akt; и бевацизумаб — моноклональное антитело против VEGF [70]. Ретроспективный анализ использования бевацизумаба у пациентов с рецидивирующими/прогрессирующими менингиомами, проведенный на базе Университетского медицинского центра Дьюка (США), показал, что бевацизумаб, используемый в качестве монотерапии или в комбинации с химиотерапевтическими препаратами, обладает выраженной противоопухолевой активностью и безопасен для пациентов [71]. Тем не менее, результаты данного исследования ограничены небольшим числом пациентов и ретроспективным характером анализа.

Как уже было отмечено ранее, дефекты в механизмах программированной клеточной смерти имеют большое значение в опухолевом патогенезе и устойчивости к противоопухолевой терапии. Модуляция апоптоза может происходить за счет ингибирования таких сигнальных путей, как Akt и MAPK, или за счет индукции апоптоза. Эффективность таких препаратов, как моноклональные антитела к TRAIL-рецепторам — оцениваются в качестве монотерапии и в комбинации с химиотерапевтическими препаратами [72]. В разработке находятся эндогенные супрессоры апоптоза — они представляют собой перспективный класс препаратов с противоопухолевой активностью и могут стать дополнением не только к стандартной цитотоксической терапии, но и к другим таргетным молекулярным препаратам [73].

Заключение

Таким образом, для менингиом присущ широкий спектр молекулярно-генетических повреждений, которые проявляются потерей или приобретением генетического материала с последующим развитием опухолевого процесса. В процессе опухолевой прогрессии активируются различные клеточные сигнальные пути. Прежде всего, для менингиом характерно нарушение работы pRb/p53-, Hh- и WNT/ β -катенин сигнальных путей, отвечающих за регуляцию клеточного цикла и апоптоз. Кроме того, в патогенез менингиом вовлечены каскады, связанные с рецепторами различных факторов роста (VEGF A, EGF, TGF, IGF и др.). Они вызывают многочисленные эффекты, направленные на усиление пролиферации, инвазии и неоваскуляризации. Использование новейшей технологии Cre-рекомбиназы позволит открыть возможности для исследования менингеальных опухолей. Генотипирование пациентов с менингиомами может так же иметь значение в дифференцированном подборе пациентов для участия в клинических испытаниях таргетных препаратов. Биологические аспекты развития менингиом являются приоритетным направлением

в изучении механизмов патогенеза данной группы и поиске мишеней для таргетной терапии с учетом молекулярно-генетических повреждений. Значительный прогресс в данном направлении приближает нас ко времени, когда таргетное воздействие на молекулярные звенья развития не только менингиом, но и других первичных опухолей ЦНС позволят добиться существенного увеличения выживаемости пациентов.

References

1. Byvaltsev V.A., Sorokovikov V.A., Borisov E.B., Stepanov I.A. Peritumoral edema at brain meningiomas. *Bulleten Vostochno-Sibirskogo Nauchnogo. Tsentra.* 2016; 110(1): 7-22. (In Russian)
2. Byvaltsev V.A., Sorokovikov V.A., Stepanov I.A., Antipina S.L. Histological and immunohistochemical characteristics of brain meningiomas. *Bulleten Vostochno-Sibirskogo Nauchnogo. Tsentra.* 2016; 110(4): 7-22. (In Russian)
3. Claus E.B., Bondy M.L., Schildkraut J.M., Wiemels J.L., Wrensch M., Black P.M. Epidemiology of intracranial meningioma. *Neurosurgery.* 2005; 57: 1088-95.
4. Longstreth W.T. jr., Dennis L.K., McGuire V.M., Drangsholt M.T., Koepsell T.D. Epidemiology of intracranial meningioma. *Cancer.* 2011; 72: 639-48.
5. Hansson C.M., Buckley P.G., Grigelioniene G., Piotrowski A., Hellstrom A.R., Mantripragada K. et al. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics.* 2007; 8: 16-24.
6. Shen Y., Nunes F., Stemmer-Rachamimov A., James M., Mohapatra G., Plotkin S., Betensky R.A., Engler D.A., Roy J., et al. Genomic profiling distinguishes familial multiple and sporadic multiple meningiomas. *BMC Med. Genomics.* 2009; 2: 42-8.
7. Rubinstein A.B., Shalit M.N., Cohen M.L., Zandbank U., Reichenthal E. Radiation-induced cerebral meningioma: a recognizable entity. *J. Neurosurg.* 2010; 61(3): 966-71.
8. Ryan P., Lee M.W., North B., McMichael A.J.: Radiation induced intracranial meningiomas. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.* 2009 ;28(5): 91-5.
9. Maxwell M., Galanopoulos T., Neville-Golden J., Antoniadis H.N. Expression of androgen and progesterone receptors in primary human meningiomas. *J. Neurosurg.* 2007; 78(2): 456-62.
10. Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatr.* 1957; 20(6): 22-39.
11. Commins D., Atkinson R., Burnett M. Review of meningioma histopathology. *Neurosurg Focus.* 2007; 2 3(2): 113-21.
12. Meester-Smoor M.A., Vermeij M., van Helmond M.J., Molijn A.C., van Wely K.H., et al. Targeted disruption of the *mn1* oncogene results in severe defects in development of membranous bones of the cranial skeleton. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25(4): 4229-36.
13. Perry B.T., Jensen R.L. Aberrant signaling pathways in meningiomas. *J Neurooncol.* 2010; 99(2): 315-24.
14. Wrobel G., Roerig P., Kokocinski F., Neben K., Hahn M. Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical, and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int J Cancer.* 2005; 114(2): 249-56.
15. Maier H., Ofner D., Hittmair A., Kitz K., Budka H. Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *J. Neurosurg.* 1992; 77: 616-23.
16. Newton H. Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. part 2: Pi3k/akt/pten, mtor, shh/ptch and angiogenesis. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2004; 4: 105-28.
17. Kim W.Y., Lee H.Y. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: mechanism and therapeutic intervention in brain tumors. *FEBS J.* 2009; 276: 4653-64.
18. Wellenreuther R., Kraus J.A., Lenartz D., Menon A.G., Schramm J., et al. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol.* 1995; 146(4): 827-32.
19. Mawrin C., Perry A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol.* 2010; 99(2): 379-91.
20. Pavelin S., Becic K., Forempoher G., Tomic S., Capkun V. The Significance of Immunohistochemical Expression of Merlin, Ki-67, and p53 in Meningiomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2014; 22(6): 46-9.
21. Saraf S., McCarthy B.J., Villano J.L. Update on meningiomas. *Oncologist.* 2011; 16(4): 1604-13.
22. Striedinger K., VandenBerg S.R., Baia G.S., McDermott M.W., Gutmann D.H. The neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, regulates human meningioma cell growth by signaling through YAP. *Neoplasia.* 2008; 10(5): 1204-12.
23. Dickinson P.J., Surace E.I., Ca Leutenegger C.M. Expression of the tumor suppressor genes *nf2*, *4.1b*, and *tscl1* in canine meningiomas. *Vet. Pathol.* 2009; 46(1): 84-92.
24. Wernicke A.G., Dicker A.P., Whiton M., Ivanidze J., Hyslop T. Assessment of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human meningioma. *Radiat. Oncol.* 2010; 56(1): 137-45.
25. Brastianos P.K., Horowitz P.M., Santagata S., Jones R.T., McKenna A. Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenes and *akt1* mutations. *Nat. Genet.* 2013; 45(2): 285-9.
26. Liaw D., Marsh D.J., Li J., Dahia P.L., Wang S.I. Germ line mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet.* 2013; 6: 64-7.
27. Peters N., Wellenreuther R., Rollbrocker B., Hayashi Y., Meyer-Puttitz B. Analysis of the *pten* gene in human meningiomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2002; 24(2): 3-8.
28. Lino M.M., Merlo A. PI3Kinase signaling in glioblastoma. *J Neurooncol.* 2011; 103: 417-27.
29. Basu S., Totty N.F., Irwin M.S., Sudol M., Downward J. Akt phosphorylates the yes-associated protein, yap, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol. Cell.* 2003; 11(3): 11-23.
30. Heinrich B., Hartmann C., Stemmer-Rachamimov A.O., Louis D.N., MacCollin M. Multiple meningiomas: Investigating the molecular basis of sporadic and familial forms. *Int. J. Cancer.* 2003; 103(3): 483-8.
31. Taberero M., Jara-Acevedo M., Nieto A., Caballero A., Otero B. Association between mutation of the NF2 gene and monosomy 22 in menopausal women with sporadic meningiomas. *BMC Med. Genet.* 2013; 14(6): 114-9.

32. Hao S., Smith T.W., Chu P.G., Liu Q., Ok C.Y. The oncofetal protein imp3: A novel molecular marker to predict aggressive meningioma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2011; 135(8): 1032-6.
33. Choy W., Kim W., Nagasawa D., Stramotas S., Yew A. The molecular genetics and tumor pathogenesis of meningiomas and the future directions of meningioma treatments. *Neurosurg. Focus.* 2011; 30(5): 6-16.
34. Lou E., Sumrall A.L., Turner S., Peters K.B., Desjardins A. Bevacizumab therapy for adults with recurrent/progressive meningioma: a retrospective series. *J. Neurooncol.* 2012; 109(9): 63-70.
35. Lamszus K. Meningioma pathology, genetics, and biology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63(6): 275-86.
36. Bostrum J., Meyer-Puttitz B., Wolter M., Blaschke B., Ruthild G., Weber T. Alterations of the Tumor Suppressor Genes CDKN2A (p16INK4a), p14ARF, CDKN2B (p15INK4b), and CDKN2C (p18INK4c) in Atypical and Anaplastic Meningiomas. *Am. J. Pathol.* 2001; 159(3): 661-9.
37. Van Wely K.H., Molijn A.C., Buijs A., Meester-Smoor M.A., Aarnoudse A.J. The MN1 oncoprotein synergizes with coactivators RAC3 and p300 in RAR-RXR-mediated transcription. *Oncogene.* 2003; 22(2): 699-709.
38. Proetzel G., Pawlowski S.A., Wiles M.V., Yin M., Boivin G.P. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat. Genet.* 1995; 11: 409-14.
39. Gutmann D.H., Haipek C.A., Hoang L.K. Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein, merlin, forms two functionally important intramolecular associations. *J. Neurosci. Res.* 1999; 58(5): 706-16.
40. Shaw R.J., McClatchey A.I., Jacks T. Regulation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor protein, merlin, by adhesion and growth arrest stimuli. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(6):7757-64.
41. Lee Y., Liu J., Patel S., Cloughesy T., Lai A. Genomic landscape of meningiomas. *Brain Pathol.* 2010;20(5):751-62.
42. Langford L.A., Piatyszek M.A., Xu R. Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Hum. Pathol.* 2007;28(6): 416-420.
43. Xing E.P., Nie Y., Song Y., Yang G.Y., Cai Y.C. Mechanisms of inactivation of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2009;5: 2704-13.
44. Amatya V.J., Takeshima Y., Inai K. Methylation of p14(ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. *Mod. Pathol.* 2004;17(2):705-70.
45. Choy W., Kim W., Nagasawa D., Stramotas S., Yew A., Gopen Q., Parsa A.T., Yang I. The molecular genetics and tumor pathogenesis of meningiomas and the future directions of meningioma treatments. *Neurosurg. Focus.* 2011;30(1):16-23.
46. Goutagny S., Yang H.W., Zucman-Rossi J., Chan J., Dreyfuss J.M., Park P.J., Black P.M., Giovannini M., Carroll R.S., Kalamirides M. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of meningioma malignant progression dependent on the underlying NF2 status. *Clin. Cancer Res.* 2010;16(6):4155-41.
47. Fernandez-Valle C., Tang Y., Ricard J., Rodeñas-Ruano A., Taylor A. Paxillin binds schwannomin and regulates its density-dependent localization and effect on cell morphology. *Nat. Genet.* 2002;31(3):354-62.
48. Cuevas I.C., Slocum A.L., Jun P., Costello J.F., Bollen A.W. Meningioma transcript profiles reveal deregulated notch signaling pathway. *Cancer Res.* 2005;65(4):5070-5.
49. Laurendeau I. Gene expression profiling of the hedgehog signaling pathway in human meningiomas. *Mol. Med.* 2010;16(4):262-70.
50. Santarius T., Kirsch M., Nikas D.C., Imitola J., Black P.M. Molecular analysis of alterations of the p18INK4c gene in human meningiomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2000;26(4):67-75.
51. Cai S.L., Tee A.R., Short J.D., Bergeron J.M., Kim J. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J. Cell Biol.* 2006;173(4):279-89.
52. Vander Haar E., Lee S.I., Bandhakavi S., Griffin T.J., Kim D.H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* 2007;9(5):316-23.
53. Xie J., Johnson R.L., Zhang X., Bare J.W., Waldman F.M. Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracranial tumors. *Cancer Res.* 2007; 57(6):23690-72.
54. Saydam O., Shen Y., Wьrdinger T., Senol O., Boke E. Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing Ecadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 2009;29(4):5923-40.
55. Zhou L., Ercolano E., Ammoun S., Schmid M.C., Barczyk M.A. Merlin-deficient human tumors show loss of contact inhibition and activation of Wnt/ β -catenin signaling linked to the PDGFR/Src and Rac/PAK pathways. *Neoplasia.* 2011;13(3):1101-12.
56. Wen P.Y., Quant E., Drappatz J., Beroukhir R., Norden A.D. The Relationship between APC-gen expression and tumor progression. *J. Neurooncol.* 2010;99(5):365-78.
57. Philippon J., Foncin J.F., Grob R., Srouf A., Poisson M., Pertuiset B.F. Cerebral edema associated with meningiomas: possible role of a secretory-excretory phenomenon. *Neurosurgery.* 2002; 14(1): 295-301.
58. Provias J., Claffey K., delAguila L., Lau N., Feldkamp M., Guha A. Meningiomas: role of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in angiogenesis and peritumoral edema. *Neurosurgery.* 2007; 40(1): 1016-26.
59. Lamszus K., Lengler U., Schmidt N.O. Vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor, basic fibroblast growth factor, and placenta growth factor in human meningiomas and their relation to angiogenesis and malignancy. *Neurosurgery.* 2000;46(4): 938-47.
60. Chamberlain M.C. Adjuvant combined modality therapy for malignant meningiomas. *J. Neurosurg.* 2009;84(5): 33-736.
61. Chamberlain M.C. Intracerebral meningiomas. *Curr. Treat. Options Neurol.* 2004;6: 297-305.
62. Zeidman L.A., Ankenbrandt W.J., Paleologos N., Vick N.A. Analysis of growth rate in non-operated meningiomas. *Neurology.* 2006;66(1): 400-12.
63. Chamberlain M.C., Blumenthal D.T. Intracranial meningiomas: diagnosis and treatment. *Expert Rev. Neurother.* 2004;4:641-648.
64. Schrell U.M., Rittig M.G., Anders M., Koch U.H., Marschalek R., Kiesewetter F. Hydroxyurea for treatment of unresectable and recurrent meningiomas. II. Decrease in the size of meningiomas in patients treated with hydroxyurea. *J. Neurosurg.* 2007;86(3):840-4.
65. Chamberlain M.C., Tsao-Wei D.D., Groshen S. Temozolomide for treatment-resistant recurrent meningioma. *Neurology.* 2004;62(5):1210-2.
66. Chamberlain M.C., Tsao-Wei D.D., Groshen S. Salvage chemotherapy with CPT-11 for recurrent meningioma. *J. Neurooncol.* 2006;78(6): 271-6.

67. Wen PY, Yung WKA, Lamborn KR, Cloughesy TF, DeAngelis LM, Fine HA, et al: Phase II study of imatinib mesylate (ST1571) for patients with recurrent meningiomas (NABTC 01-08). 2006; presented at *Society for Neuro-Oncology Annual Meeting*.

68. Lamszus K., Lengler U., Schmidt N.O., Stavrou D., Ergun S., Westphal M. Vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor, basic fibroblast growth factor, and placenta growth factor in human meningiomas and their relation to angiogenesis and malignancy. *Neurosurgery*. 2011;46:938-48.

69. Folkman J. Angiogenesis. *Annu. Rev. Med.* 2006;57(2):1-18.

70. Jain R.K., Duda D.G., Clark J.W., Loeffler J.S. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2006;3:24-40.

71. Provias J., Claffey K., delAguila L., Lau N., Feldkamp M., Guha A. Meningiomas: role of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in angiogenesis and peritumoral edema. *Neurosurgery*. 2011;40(5):1016-26.

72. Camphausen K., Tofilon P.J. Combining radiation and molecular targeting in cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* 2014;3:247-50.

73. Graner M.W., Bigner D.D. Therapeutic aspects of chaperones/heatshock proteins in neuro-oncology. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010;6:679-95.

Сведения об авторах:

Степанов Иван Андреевич, аспирант курса нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: edmoilers@mail.ru;

Белых Евгений Георгиевич, ассистент курса нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: e.belykh@yandex.ru;

Яруллина Анна Исмагиловна, аспирантка курса нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета, e-mail: ayarullina@yandex.ru.

© Коллектив авторов, 2017
УДК 575.133

Синёв В.В.¹, Сазонова М.А.^{1,2}, Карагодин В.П.², Рыжкова А.И.^{2,4}, Галицына Е.В.^{2,5},
Мельниченко А.А.^{2,5}, Демакова Н.А.⁵, Шкурат Т.П.⁵, Собенин И.А.^{1,2}, Орехов А.Н.^{2,3}

Изучение митохондриальной дисфункции с помощью цитоплазматических гибридов

¹ ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, 121500, г. Москва, Россия, Черепковская 3-я ул., д. 15-а

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

³ Научно-исследовательский институт атеросклероза Инновационный центр Сколково, 121609, Московская обл., Россия, Сколково, ул. Новая, д. 100

⁴ ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», 109472, г. Москва, Россия, ул. Академика Скрябина, д. 23

⁵ Южный федеральный университет, 344006, г. Ростов-на-Дону, Россия, ул. Большая Садовая, д. 105/42

Цель. В обзоре рассмотрены источники литературы, посвященные изучению митохондриальной дисфункции с помощью цитоплазматических гибридов (цибридов). Представленные исследования проводились на гибридных культурах клеточных линий HL60, MOL T-4, A549, 143B, HeLa, Aре-19, HEK-293, SH-SY5Y и NT2. Согласно анализу научной мировой литературы, одними из наиболее перспективных моделей для изучения дисфункции митохондрий являются безмитохондриальные (rho0) культуры клеток и цитоплазматические гибриды, содержащие одну или несколько мутаций митохондриального генома. В обзоре рассмотрены работы по изучению биохимических и молекулярно-клеточных патологических процессов в гибридных клетках при различных заболеваниях человека, таких, как болезнь Альцгеймера и умеренные когнитивные нарушения, синдромы MERRF и MELAS, атрофия зрительного нерва Лебера и болезнь Паркинсона. Отдельно представлен материал, посвященный гибридам, как потенциальным моделям для исследования возможностей терапии. **Заключение.** Проанализированные в обзоре rho0-клеточные культуры и гибридные линии, содержащие мутации мтДНК, могут служить моделями для изучения дисфункции митохондриального генома, биохимических и молекулярно-клеточных основ патологических процессов. Следует отметить, что в различных культурах клеток наблюдаются схожие тенденции в изменениях функциональной активности rho0-клеток и гибридов при сравнении с нативными клеточными линиями. Например, такие тенденции, как снижение уровня потребления кислорода, морфологические изменения структуры митохондрий, устойчивость к апоптозу, снижение уровня потребления АТФ, повышение потребления глюкозы, ухудшение активности некоторых комплексов дыхательной цепи.

Ключевые слова: гибриды; митохондриальная дисфункция; rho0-клетки; мутация; митохондриальный геном, клеточная линия, мтДНК.

Для цитирования: Синёв В.В., Сазонова М.А., Карагодин В.П., Рыжкова А.И., Галицына Е.В., Мельниченко А.А., Демакова Н.А., Шкурат Т.П., Собенин И.А., Орехов А.Н. Изучение митохондриальной дисфункции с помощью цитоплазматических гибридов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 92—97.
DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.92-97

Для корреспонденции: Синёв Василий Владимирович, мл. науч. сотр. лаб. медицинской генетики отдела сердечно-сосудистой патологии РКНПК МЗ РФ, e-mail: centaureaceanus@mail.ru

Финансирование. Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 14-14-01038.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.12.2016

Sinyov V.V.¹, Sazonova M.A.^{1,2}, Karagodin V.P.², Ryzhkova A.I.^{2,4}, Galitsyna E.V.^{2,5},
Melnichenko A.A.^{2,5}, Demakova N.A.⁵, Shkurat T.P.⁵, Sobenin I.A.^{1,2}, Orekhov A.N.^{2,3}

Study of mitochondrial dysfunction using cytoplasmic hybrid

¹ FSBI «Russian Cardiology Research and Production Complex», Moscow, Russian Federation, 121552, Moscow, Cherepkovskaya 3rd street, 15-a

² FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8

³ Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, 121609, Moscow Region, Skolkovo, Novaya street, 100

⁴ Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology by K.I. Skryabin, 109472, Moscow, Academica Skryabina street, 23

⁵ Southern Federal University, 344006, Rostov-on-Don, Bolshaya Sadovaya street, 105/42.

Aim. This review article describes literature sources devoted to the investigation of mitochondrial dysfunction using cytoplasmic hybrids (cybrids). The presented studies were carried out on cultures of hybrid cell lines HL60, MOL T-4, A549,

143B, HeLa, Arpe-19, HEK-293, SH-SY5Y and NT2. According to the analysis of scientific world literature, some of the most promising models for studying mitochondrial dysfunction are cell cultures without mitochondria (rho0) and cytoplasmic hybrids containing one or several mutations of mitochondrial genome. In the review scientific researches on studying biochemical and molecular cellular pathological processes in cybrid cells in various human diseases such as Alzheimer's disease and mild cognitive impairment, MERRF and MELAS syndromes, Leber's optic atrophy and Parkinson's disease were considered. Material dedicated to cybrids as potential models for the study of treatment possibilities was presented separately. **Conclusion.** The analyzed in the review rho0-cell cultures and cybrid lines containing mtDNA mutations may be models for the study of mitochondrial genome dysfunctions, biochemical and molecular cellular pathological processes. It is worth noting that in various cell cultures, similar tendencies are observed in functional activity changes of rho0-cell and cybrids compared with native cell lines. For example, such tendencies as reduction of oxygen consumption level, morphological changes of mitochondrial structure, resistance to apoptosis, reduction of ATP consumption level, increase in glucose consumption, activity deterioration of some respiratory chain complexes.

Keywords: cybrids; mitochondrial dysfunction; rho0-cells; mutation; mitochondrial genome; cell line; mtDNA.

For citation: Sinyov V.V., Sazonova M.A., Karagodin V.P., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Melnichenko A.A., Demakova N.A., Shkurat T.P., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Study of mitochondrial dysfunction using cytoplasmic hybrid. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(2): 92–97. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.92-97

For correspondence: Vasilij V. Sinyov, Junior Research Scientist, Laboratory of Medical Genetics, Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russian Federation, 121552, Moscow, Cherepkovskaya 3rd street, 15-a, e-mail: centaureaceanus@mail.ru

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

Acknowledgement. This work was supported by the Russian Scientific Foundation (Grant # 14-14-01038).

Information about authors:

Sinyov V.V., <http://orcid.org/0000-0001-5105-5763>

Sazonova M.A., <http://orcid.org/0000-0001-7382-7197>

Karagodin V.P., <http://orcid.org/0000-0003-0501-8499>

Ryzhkova A.I., <http://orcid.org/0000-0002-8838-7750>

Galitsyna E.V., <http://orcid.org/0000-0003-2305-4936>

Melnichenko A.A., <http://orcid.org/0000-0002-4989-7600>

Demakova N.A., <http://orcid.org/0000-0002-2896-3859>

Shkurat T.P., <http://orcid.org/0000-0001-6197-7374>

Sobenin I.A., <http://orcid.org/0000-0003-0978-6444>

Orekhov A.N., <http://orcid.org/0000-0002-6495-1628>

Received 30.12.2016

Введение

Цитоплазматические гибриды (цибриды) в настоящее время являются одними из наиболее перспективных моделей для изучения митохондриальной дисфункции клеток, и, в частности, роли мутаций митохондриального генома в развитии патологического процесса.

Цибриды — это клеточные линии, полученные с помощью слияния rho0-клеток (безмитохондриальных) с клетками-донорами цитоплазмы, содержащей митохондрии. Для создания морфологически однородных и устойчивых к многократному пересеванию цибридных линий преимущественно используют постоянные клеточные линии, т.е. те клетки, которые прошли этап дедифференцировки. В большинстве экспериментов ученые из различных стран используют линии 143B [1—8]; реже — HEK293 [9,10], HeLa [11,12] и HL60 [13].

Для создания rho0-клеточных линий, в основном, используют стандартную методику М. Кинга и Г. Атгарди, которая основана на применении ингибиторов репликации митохондриальной ДНК (мтДНК), таких, как ДНК-интеркалирующий краситель этидиум бромид (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид). Низкие концентрации этидиум бромида (от 0,1 до 2 мкг/мл) частично или полностью ингибируют репликацию митохондриального генома, но не оказывают никакого влияния на репликацию ядерной ДНК [14].

В качестве клеток-доноров митохондрий некоторые исследователи используют энуклеированные цитопласты, которые сливаются с rho0-клетками под воздействием постоянного электрического тока (электрослияние) [15]. Но чаще всего в качестве клеток-доноров митохондрий успешно применяются

тромбоциты, которые под действием полиэтиленгликоля 1500 сливаются с $\rho\text{ho}0$ -клетками (ПЭГ-слияние) [16, 17].

Модели $\rho\text{ho}0$ -клеток для исследования дисфункции митохондрий

Исследователи из Новой Зеландии проанализировали эффективность воздействия транс-ретиноевой кислоты и триозида мышьяка на дифференцировку и выживаемость клеток в человеческих лейкозных клеточных линиях HL60 и безмитохондриальных HL60 $\rho\text{ho}0$. В результате клетки HL60 $\rho\text{ho}0$ обладали меньшей способностью к дифференцировке, но большей дыхательной активностью, чем родительские HL60 клетки. HL60 $\rho\text{ho}0$ клетки были также значительно более устойчивы к апоптозу [13].

Американские исследователи провели сравнительный анализ уровня потребления кислорода в культурах человеческих лимфобластов MOLT-4 дикого типа и $\rho\text{ho}0$. Темпы потребления кислорода в безмитохондриальной культуре были значительно ниже по сравнению с нативной культурой (в 7 раз). Уровень потребления кислорода одинаково изменялся в нативной и безмитохондриальной клеточной линии MOLT-4 как при ингибировании данного уровня пара-хлоромеркуробензоатом (PCMB), так и при стимуляции менадионом бисульфита натрия (MSB). В то же время, цианистый калий снижал, а карбонил цианид *m*-хлорфенилгидразон (CCCP) повышал норму потребления кислорода только в нативной культуре MOLT-4. Авторы работы предполагают, что это может быть связано с отсутствием важных белковых субъединиц ферментов, кодирующихся генами митохондриального генома. Возникающая при этом дисфункция ферментов митохондрий, в свою очередь, приводит к нарушению переноса электронов в дыхательной цепи [18].

Ученые из США сравнили ультраструктурную морфологию митохондрий человеческой эпителиальной клеточной линии A549 дикого типа и $\rho\text{ho}0$ -клеток. Безмитохондриальная культура содержала митохондрии неправильной формы с полупрозрачным матриксом, в отличие от нативной клеточной линии. Кроме того, морфология митохондриальных крист $\rho\text{ho}0$ -клеток была более разнообразной: встречались, например, короткие и круговые выросты внутренней мембраны митохондрий. Также авторы анализировали воздействие на данные клеточные культуры блеомицина, который является противоопухолевым агентом и в клиническом применении приводит к повреждению легких, а у 1—2% пациентов к тяжелому прогрессирующему легочному фиброзу. Было показано, что $\rho\text{ho}0$ -клетки линии A549 устойчивы к действию

блеомицина, что, по мнению авторов, может быть связано с ухудшением митохондриально-зависимого апоптоза [19].

Циридные модели для изучения митохондриальной дисфункции

1. *Изучение связи мутаций мтДНК с митохондриальной дисфункцией.* Исследователи из Португалии продемонстрировали изменения в окислительном фосфорилировании (OXPHOS) при сравнении двух циридных линий, полученных на основе клеточной линии 143B: дикого типа и несущей мутацию *m.3243A>T* в митохондриальном геноме. Полученные результаты свидетельствуют, что цириды с мутацией в позиции 3243 имели низкую скорость поглощения кислорода по сравнению с диким типом. Также в циридных клетках с однонуклеотидной заменой *m.3243A>T* наблюдался более высокий уровень потребления глюкозы и лактата. Ингибирование комплекса V олигомицином значительно снижало скорость потребления кислорода в клетках дикого типа, но в клетках с мутацией мтДНК такая скорость оставалась на прежнем уровне. Помимо дисфункции митохондрий, исследователи обнаружили, что в культуре *in vitro* циридные клетки с мутантным аллелем имели более низкие темпы роста по сравнению с диким типом. Однако, при введении данных культур «голым» мышам, циридная линия с *m.3243A>T* инициировала развитие более крупной опухоли, а также имела более высокий метастатический потенциал, чем у циридной линии дикого типа [20].

Ученые из Китая провели исследование циридных клеточных культур, несущих мутацию *m.10003T>C* (мутация ассоциирована с сахарным диабетом 2 типа). Безмитохондриальная культура ($\rho\text{ho}0$) была получена из клеточной линии HeLa. Было обнаружено, что количество tRNAGly по сравнению с контролем было снижено на 97%. Установлено, что базовая скорость клеточного дыхания, митохондриальный мембранный потенциал, количество копий мтДНК и скорость потребления кислорода в циридных клетках были значительно ниже по сравнению с контрольной группой [21].

Японские исследователи проанализировали влияние крупной делеции митохондриального генома на функцию ферментов циридной культуры, полученной на основе клеток HeLa. Наличие делеции более чем в 60% мтДНК приводило к ингибированию цитохром C-оксидазы [12].

2. *Исследование влияния гаплогрупп митохондриального генома на митохондриальную дисфункцию.* Американские ученые изучали митохондриальную дисфункцию в эпителиальных клетках цирид-

ных линий, созданных на основе культуры Агре-19, несущих гаплогруппу L (распространенную у лиц африканского происхождения) или H (распространенную у европеоидов). Обнаружено, что гибриды с гаплогруппой L имели более высокий уровень экспрессии 9 генов комплексов дыхательной цепи, снижение расхода АТФ и более низкий уровень производства активных форм кислорода. Тромбоциты, используемые в качестве клеток-доноров митохондрий, были взяты от 3 добровольцев с гаплогруппой H и от 3 добровольцев с гаплогруппой L [22].

Исследователи из Австрии оценивали коэффициент выживаемости клеточной линии НЕК-293. Из данной культуры клеток получали гибриды, несущие, в одном случае, гаплогруппу T, а в другом — гаплогруппу H. При обработке перекисью водорода гибриды с гаплогруппой T имели более высокий коэффициент выживаемости по сравнению с другой клеточной линией [9].

Гибридные модели для изучения биохимических и молекулярно-клеточных патологических процессов при заболеваниях человека

1. *Болезнь Альцгеймера и умеренные когнитивные нарушения.* Группой ученых из Португалии и США была изучена биоэнергетическая дисфункция митохондрий и клеток культуры SH-SY5Y при болезни Альцгеймера и умеренных когнитивных нарушениях, а также клинических синдромах, предшествующих болезни Альцгеймера. Клетками-донорами мтДНК выступали тромбоциты пациентов. Выявлено, что в гибридах с «болезнью Альцгеймера» и с «умеренными когнитивными нарушениями» были более высокие соотношение АДФ/АТФ и более низкое НАД/НАДН по сравнению с гибридными клетками, в которых донором мтДНК выступала контрольная группа здоровых людей. Относительно контрольных клеток были также показаны изменения в потреблении кислорода и потреблении глюкозы [23].

Китайские и американские исследователи использовали в своей работе доноров с умеренными когнитивными нарушениями (7 пациентов с нарушениями и 7 здоровых). Клетками-донорами мтДНК выступали тромбоциты индивидов. Исходная клеточная линия — SH-SY5Y. Было показано, что митохондриальная плотность в гибридах с «умеренными когнитивными нарушениями» была ниже по сравнению с контрольными клетками. Длина митохондрий в гибридных клетках с «умеренными когнитивными нарушениями» была в 1,4 раза больше. При сравнении процесса клеточного дыхания в данных культурах клеток было установлено, что в гибридах с «умеренными когнитивными нарушениями» активность комплекса

I (НАДН-убихинон-редуктаза), III (убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза) и IV (цитохром с-оксидаза) снизилась в 1,6; 1,5 и 1,3 раза (соответственно), по сравнению с контрольной группой гибридных клеток. Уровень АТФ в гибридных клеточных культурах с «умеренными когнитивными нарушениями» был статистически значимо ниже, чем в контроле. Кроме того, выявлен повышенный уровень окислительного стресса в гибридных клетках с «умеренными когнитивными нарушениями». Далее исследователи попытались оценить влияние антиоксидантной обработки на исследуемые гибридные линии. Было показано, что при воздействии на клетки препаратом «пробукол» у них прекращается производство активных форм кислорода, нормализуется мембранный потенциал митохондрий и активность комплекса I, а также восстанавливается уровень АТФ. Кроме того, пробукол способствовал укорочению длины митохондрий и повышению их плотности [24].

2. *Синдром MERRF (миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами) и MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия, лактатацидоз, инсультоподобные эпизоды).* Немецкие ученые в своей работе создали rho0-линии из клеток HeLa от пациентов с митохондриальной энцефалопатией и синдромом MERRF, обладающие сниженной активностью цитохрома С-оксидазой. Полученные rho0-клетки были слиты с безъядерными клетками HeLaCOT. В результате были получены гибриды с восстановленной оксидазной деятельностью цитохрома С [11].

Исследователи из Японии определяли митохондриальную дисфункцию в гибридных линиях на основе клеточной линии 143В, несущих мутантные митохондрии пациентов с митохондриальной миопатией, энцефалопатией, молочнокислым ацидозом и инсультоподобными эпизодами (MELAS). В данной работе использовался радиоактивный Cu-диацетил-бис (Н4-метилтиосемикарбазон) (Cu-ATSM), который является потенциальным маркером визуализации гипоксических опухолей для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Гибридные клетки с MELAS имели повышенное поглощение Cu-ATSM при нормоксии по сравнению с клетками дикого типа. Также было показано, что поглощение Cu-ATSM коррелирует с изменением уровня НАДН и НАДФН [25].

3. *Атрофия зрительного нерва Лебера.* Группа ученых из Испании создала цитоплазматические гибриды на основе клеточной линии 143В. Данные гибриды имели мутации митохондриального генома «с различной степенью патогенности»: одна линия с тяжелой патогенностью (мутация m.8363G>A в гене tRNALys) и 3 линии с легкой патогенностью, а именно атрофией зрительного нерва Лебера (LHON).

Последние клеточные линии несли по одной мутации мтДНК в каждой цибридной культуре (мутации m.3460G> A гена MT-ND1, m.11778G> A гена MT-ND4 и m.14484T> C гена MT-ND6). Результаты исследования показали, что цибридные линии с легкой патогенностью несут OXPHOS дисфункции. Однако они не связаны с опухоленностью и не вызывают опухоли при введении «голым» мышам [26].

4. **Болезнь Паркинсона.** В исследовании американских ученых была оценена роль митохондриального метаболизма в регуляции аутофагии лизосомального пути на цибридной культуре, где в качестве донора митохондрий были выбраны пациенты с болезнью Паркинсона. Донором безмитохондриальных клеток для создания цибридов служила клеточная линия NT2. Было показано, что перенос митохондрий от этих пациентов в безмитохондриальные клетки позволяет воспроизвести изменения в аутофагической системе, наблюдаемые в мозге пациента с болезнью Паркинсона. Происходило повышенное накопление аутофагосом, связанное с их дисфункцией. Авторами было показано, что уменьшение активности аутофагосом связано с их недостаточной подвижностью при перемещении по направлению к лизосомам, возникающей из-за нарушения в микротрубочеч-зависимом транспорте. Было обнаружено, что в цибридах, созданных на основе митохондрий пациентов с болезнью Паркинсона, наблюдается удлинение митохондрий и структурные изменения митохондриального матрикса и крист. Кроме того, при индицировании аутофагии в культуре клеток выявлены отклонения от нормы белкового профиля, в частности, уровня белка Беклин-1 [27].

Цибриды — потенциальная модель для исследования возможностей терапии

Ученые из США создали цибридные нейробластомы с митохондриями от лиц с болезнью Паркинсона. В цибридных клетках обнаружено увеличение уровня окислительного стресса и частоты апоптоза по сравнению с нормальными клетками. При применении световой терапии, характерной для лечения неврологических заболеваний, наблюдалась нормализация функции дыхания митохондрий в цибридных клетках, созданных на основе культур SH-SY5Y и NT2 [28].

Заключение

Проанализированные в обзоре rho0-клеточные культуры и цибридные линии, содержащие мутации мтДНК, могут служить моделями для изучения дис-

функции митохондриального генома, биохимических и молекулярно-клеточных патологических процессов. Следует отметить, что в различных культурах клеток наблюдаются похожие тенденции в изменениях функциональной активности rho0-клеток и цибридов по сравнению с нативными клеточными линиями. Например, такие тенденции, как снижение уровня потребления кислорода, морфологические изменения структуры митохондрий, устойчивость к апоптозу, снижение уровня потребления АТФ, повышение потребления глюкозы, ухудшение активности некоторых комплексов дыхательной цепи.

Настоящий обзор литературы, посвященный изучению митохондриальной дисфункции с помощью цибридных клеточных культур, может быть полезен специалистам в области молекулярной и клеточной биологии, а также врачам для разработки подходов к терапии различных заболеваний человека.

References

1. Raap A.K., Jahangir Tafrechi R.S., van de Rijke F.M., Pyle A., Wahlby C., Szuhai K., et al. Non-random mtDNA segregation patterns indicate a metastable heteroplasmic segregation unit in m.3243A>G cybrid cells. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52080.
2. Gamba J., Gamba L.T., Rodrigues G.S., Kiyomoto B.H., Moraes C.T., Tengan C.H. Nitric oxide synthesis is increased in cybrid cells with m.3243A>G mutation. *Int J Mol Sci*. 2012; 14(1): 394-410.
3. Ma Y., Bai R-K., Trieu R., Wong L-J.C. Mitochondrial dysfunction in human breast cancer cells and their transmitochondrial cybrids. *Biochim Biophys Acta — Bioenerg*. 2010; 1797(1): 29-37.
4. Bellizzi D., Taverna D., D'Aquila P., De Blasi S., De Benedictis G. Mitochondrial DNA variability modulates mRNA and intra-mitochondrial protein levels of HSP60 and HSP75: experimental evidence from cybrid lines. *Cell Stress Chaperones*. 2009; 14(3): 265-71.
5. Pye D., Kyriakouli D.S., Taylor G.A., Johnson R., Elstner M., Meunier B., et al. Production of transmitochondrial cybrids containing naturally occurring pathogenic mtDNA variants. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(13):e95.
6. Pallotti F., Baracca A., Hernandez-Rosa E., Walker W.F., Solaini G., Lenaz G., et al. Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *Biochem J*. 2004;384(Pt2):287-293.
7. Gustafson E.A., Schinazi R.F., Fingerth J.D. Human herpesvirus 8 open reading frame 21 is a thymidine and thymidylate kinase of narrow substrate specificity that efficiently phosphorylates zidovudine but not ganciclovir. *J Virol*. 2000; 74(2): 684-92.
8. Trounce I., Neill S., Wallace D.C. Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T>G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNA-less cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 91(18):8334-8.
9. Mueller E.E., Brunner S.M., Mayr J.A., Stanger O., Sperl W., Kofler B. Functional differences between mitochondrial haplogroup T and haplogroup H in HEK293 cybrid cells. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52367.

10. Mueller E.E., Mayr J.A., Zimmermann F.A., Feichtinger R.G., Stanger O., Sperl W., et al. Reduction of nuclear encoded enzymes of mitochondrial energy metabolism in cells devoid of mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(3):1052-1057.
11. Williams A.J., Murrell M., Brammah S., Minchenko J., Christodoulou J. A novel system for assigning the mode of inheritance in mitochondrial disorders using cybrids and rhodamine 6G. *Hum Mol Genet.* 1999; 8(9): 1691-7.
12. Hayashi J., Ohta S., Kikuchi A., Takemitsu M., Goto Y., Nonaka I. Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88(23):10614-10618.
13. Herst P.M., Hesketh E.L., Ritchie D.S., Berridge M.V. Glycolytic metabolism confers resistance to combined all-trans retinoic acid and arsenic trioxide-induced apoptosis in HL60p0 cells. *Leuk Res.* 2008; 32(2): 327-33.
14. King M.P., Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.* 1996; 264: 304-13.
15. Jun A.S., Trounce I.A., Brown M.D., Shoffner J.M., Wallace D.C. Use of transmitochondrial cybrids to assign a complex I defect to the mitochondrial DNA-encoded NADH dehydrogenase subunit 6 gene mutation at nucleotide pair 14459 that causes Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Mol Cell Biol.* 1996;16(3):771-777.
16. Chomyn A., Lai S.T., Shakeley R., Bresolin N., Scarlato G., Attardi G. Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals—and complementation behavior of the tRNALys mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet.* 1994;54(6):966-974.
17. Chomyn A. Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells. *Methods Enzymol.* 1996; 264: 334-9.
18. Shen J., Khan N., Lewis L.D., Armand R., Grinberg O., Demidenko E., et al. Oxygen consumption rates and oxygen concentration in molt-4 cells and their mtDNA depleted (rho0) mutants. *Biophys J.* 2003; 84(2Pt1): 1291-8.
19. Brar S.S., Meyer J.N., Bortner C.D., Van Houten B., Martin W.J 2nd. Mitochondrial DNA-depleted A549 cells are resistant to bleomycin. *AJP Lung Cell Mol Physiol.* 2012; 303(5): 413-24.
20. Nunes J.B., Peixoto J., Soares P., Maximo V., Carvalho S., Pinho S.S., et al. OXPHOS dysfunction regulates integrin-β1 modifications and enhances cell motility and migration. *Hum Mol Genet.* 2015; 24(7): 1977-90.
21. Li W., Wen C., Li W., Wang H., Guan X., Zhang W., et al. The tRNA(Gly) T10003C mutation in mitochondrial haplogroup M11b in a Chinese family with diabetes decreases the steady-state level of tRNA(Gly), increases aberrant reactive oxygen species production, and reduces mitochondrial membrane potential. *Mol Cell Biochem.* 2015; 408(1-2): 171-9.
22. Kenney M.C., Chwa M., Atilano S.R., Falatoonzadeh P., Ramirez C., Malik D. et al. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases. *Biochim Biophys Acta — Mol Basis Dis.* 2014; 1842(2): 208-19.
23. Silva D.F., Selfridge J.E., Lu J., Lezi E., Roy N., Hutfles L. et al. Bioenergetic flux, mitochondrial mass and mitochondrial morphology dynamics in AD and MCI cybrid cell lines. *Hum Mol Genet.* 2013; 22(19): 3931-46.
24. Gan X., Wu L., Huang S., Zhong C., Shi H., Li G. et al. Oxidative stress-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase contributes to mild cognitive impairment-related mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2014; 75: 230-40.
25. Yoshii Y., Yoneda M., Ikawa M., Furukawa T., Kiyono Y., Mori T. et al. Radiolabeled Cu-ATSM as a novel indicator of overreduced intracellular state due to mitochondrial dysfunction: studies with mitochondrial DNA-less ρ0 cells and cybrids carrying MELAS mitochondrial DNA mutation. *Nucl Med Biol.* 2012; 39(2): 177-85.
26. Cruz-Bermudez A., Vallejo C.G., Vicente-Blanco R.J., Gallardo M.E., Fernandez-Moreno M.A., Quintanilla M. et al. Enhanced tumorigenicity by mitochondrial DNA mild mutations. *Oncotarget.* 2015; 6(15): 13628-43.
27. Arduino D.M., Esteves A.R., Cortes L., Silva D.F., Patel B., Grazina M. et al. Mitochondrial metabolism in Parkinson's disease impairs quality control autophagy by hampering microtubule-dependent traffic. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(21): 4680-702.
28. Trimmer P.A., Bennett J.P.Jr. The cybrid model of sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2009; 218(2): 320-5.

Сведения об авторах:

- Сазонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. ангиопатологии НИИ ОПП;
- Карагодин Василий Петрович, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии НИИ ОПП;
- Рыжкова Анастасия Игоревна, аспирант МГАВМиБ — МВА им. К. И. Скрябина;
- Галицына Елена Валерьевна, мл. науч. сотр. каф. генетики ЮФУ;
- Мельниченко Александра Александровна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии НИИ ОПП;
- Демакова Наталья Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. биологии развития и организации генома каф. генетики Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ;
- Шкурат Татьяна Павловна, доктор биол. наук, проф., зав. каф. генетики Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ;
- Собенин Игорь Александрович, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. медицинской генетики РКНПК;
- Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. ангиопатологии НИИ ОПП.

© Коллектив авторов, 2017
УДК 618.145-002-036.12-092

Самоделкин Е.И.¹, Меркучева Н.Г.², Косарева П.В.¹, Нестерова Л.Ю.³

Роль простагландинов и циклооксигеназы в патогенезе хронического эндометрита

¹ ГБОУ ВПО ПГМА им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, 614990, г. Пермь, Россия, ул. Петропавловская, д. 26

² ГБУЗ ПК Ордена «Знак Почёта» Пермская краевая клиническая больница, 614990, г. Пермь, Россия, ул. Пушкина, д. 85

³ ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» РАН, 614081, г. Пермь, Россия, ул. Голева, д. 13

Цель обзора — представить современные данные о роли циклооксигеназ (COX) в развитии хронического эндометрита. Проанализировано 106 источников литературы, посвященных роли COX-1 и COX-2 в развитии хронического эндометрита у пациенток репродуктивного возраста, опубликованных в базах данных Medline, Pubmed, Scopus, из них 14 включены в настоящий обзор. В поддержании воспалительного процесса в эндометрии важная роль отводится простагландинам (PG). Тем не менее, продукция PG и лейкотриенов (LTS) — липидных медиаторов, которые наряду с PG играют основную роль в воспалительном процессе, в воспаленной матке до конца не изучена. Циклооксигеназа-2 — фермент, обладающий разнообразными физиологическими функциями, участвует и в репродукции, роль его в которой многогранна. К настоящему времени установлено, что ингибирование циклооксигеназных путей, блокирующее синтез простагландинов, нивелирует эффекты многих провоспалительных цитокинов, участвующих в патогенезе хронического эндометрита. **Заключение.** Вопрос о роли циклооксигеназ в развитии хронического эндометрита интересен тем, что на основании полученных знаний можно планировать применение препаратов, ингибирующих циклооксигеназные пути (нестероидных противовоспалительных препаратов) при лечении хронического эндометрита — как способа патогенетически обоснованной терапии. Вопрос до конца не изучен. Необходимы дальнейшие исследования в этой области.

Ключевые слова: хронический эндометрит, циклооксигеназа.

Для цитирования: Самоделкин Е.И., Меркучева Н.Г., Косарева П.В., Нестерова Л.Ю. Роль простагландинов и циклооксигеназы в патогенезе хронического эндометрита. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 98—100. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.98-100

Для корреспонденции: Самоделкин Евгений Иванович, e-mail: sei-p@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.04.2016

Samodelkin E.I.¹, Mercucueva N.G.², Kosareva P.V.¹, Nesterova L.Y.³

The role of prostaglandins and Cyclooxygenase in pathogenesis of chronic endometritis

¹ State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Perm State Medical University named after EA Wagner of Ministry of Health of Russian Federation, 614990 Perm, Petropaulovskaya street, 26; psma@mail.ru, Russia

² State Organization of Health Perm Region «Perm Regional Clinical Hospital of Order The Title of Honor»; 614990 Perm, Pushkina street, 85; prh@permonline.ru, Russia

³ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation (IEGM UB RAS), Goleva ul., 13, 614081 Perm, Russia

The purpose: to present the modern data of cyclooxygenase role (COX) in the development of chronic endometritis. 106 references on the role of COX-1 and COX-2 in the development of chronic endometritis in patients of reproductive age, published in the Medline database, Pubmed, Scopus were analyzed; 14 sources are included in this review. Prostaglandins (PG) play an important role in maintaining inflammatory process in the endometrium. Nevertheless, the production of PG and leukotrienes (LTS) — lipid mediators, which, along with PG, play a major role in the inflammatory process of the inflamed uterus, is not fully understood. Cyclooxygenase-2, the enzyme having various physiological functions, is involved in reproduction, where its role is polyfunctional. It has been established that the inhibition of cyclooxygenase pathways, blocking the synthesis of prostaglandins, eliminates the effects of many pro-inflammatory cytokine involved in the pathogenesis of chronic endometritis. **Conclusion.** The role of cyclooxygenase in the development of chronic endometritis is interesting; on the basis of the acquired knowledge, we can plan the use of drugs that inhibit the cyclooxygenase pathway (NSAIDs) in the treatment of chronic endometritis — as a method of pathogenetic therapy. The issue is not fully understood. Further research is needed in this sphere.

Keywords: chronic endometritis; cyclooxygenase.

For citation: Samodelkin E.I., Mercucheva N.G., Kosareva P.V., Nesterova L.Y. The role of prostaglandins and cyclooxygenase in the pathogenesis of chronic endometritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(2): 98–100. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.98-100

For correspondence: Eugeny I. Samodelkin, Doctor of Medical Sciences, Professor of Department of Pathological Physiology «Federal State Budgetary Scientific Institution» Institute of Experimental Medicine»; State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Perm State Medical University named after EA Wagner «of Ministry of Health of Russian Federation, 26, ul. Petropaulovskaya, Perm, 614990, psma@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kosareva P.V., <https://orcid.org/0000-0002-0853-925X>

Received 04.04.2016

Введение

Цель обзора — представить современные данные о роли циклооксигеназ (COX) в развитии хронического эндометрита (ХЭ). Проанализировано 106 источников литературы, посвященных роли COX-1 и COX-2 в развитии хронического эндометрита у пациенток репродуктивного возраста, опубликованных в базах данных Medline, Pubmed, Scopus, из них 14 включены в настоящий обзор.

Известно, что в поддержании воспалительного процесса в эндометрии значительная роль отводится простагландинам. Открытые в 1935 г. фон Эйлером эти вещества были названы простагландинами, поскольку считалось, что они продуцируются предстательной железой [1]. Простагландины (PG) являются мощными медиаторами иммунокомпетентных клеток, поэтому по уровню их продукции можно судить о функциональной активности клеток иммунной системы [2]. Некоторые PG, в частности, PGF₂α, регулируют процессы овуляции и осуществляют контроль иммунных реакций при беременности — хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), эстрадиол и прогестерон в концентрациях, соответствующих его уровню в I—III триместрах, активируют продукцию PGF₂α иммунокомпетентными клетками селезенки, то есть, эти гормоны способны модулировать функцию иммунокомпетентных клеток при беременности посредством активации продукции PGF₂α и, таким образом, «включать» альтернативные иммуносупрессивные механизмы, необходимые для развития плода [2]. Известно, что PGE₂ с целью сохранения беременности продуцируется и плодными оболочками [3].

Образование PG в самом эндометрии контролируется эстрогенами и прогестероном: прогестерон ингибирует синтез PGF в эндометрии человека в условиях *in vitro*; эстроген способствует синтезу PGF в этой системе [4]. Установлено, что в условиях *in vivo* эстрадиол существенно стимулирует продукцию PGF₂α железами секреторного эндометрия [5]. У многих видов млекопитающих циклический регресс желтого тела (лютеолиз) обусловлен

периодической секрецией маткой PGF, который действует на желтое тело локально или, у некоторых видов, через большой круг кровообращения; гистерэктомию у приматов не влияет на циклический регресс желтого тела; у неprimатов секреция маткой PGF находится под косвенным контролем стероидных гормонов яичников — эстрадиола-17β и прогестерона [6]. Предполагается, что у человека продукция маткой простагландинов может отражать рудиментарный механизм лютеолиза, который был сохранен в процессе эволюции [6].

Макрофаги матки являются важным источником простагландинов, обладающих местным действием — PG предотвращают сокращения матки, некоторые PG и их предшественники используются в качестве терапевтических агентов при беременности, PGE₂ играет значительную роль при ингибировании иммунного ответа, существенно уменьшая уровень антител в маточном секрете [7]. Однако LPS-индуцированная активация может увеличивать уровень провоспалительных цитокинов и PGE₂, при этом облегчается микробная контаминация матки вследствие ингибирования секреции TNF-α и дефенсина децидуальными макрофагами и эпителиальными клетками матки, что немаловажно для патогенеза ХЭ [7].

Продукция PG и лейкотриенов (LTS) — липидных медиаторов, которые, наряду с PG, играют основную роль в воспалительном процессе — в воспаленной матке до конца не изучена; недавно в условиях эксперимента установлено, что продукция лейкотриенов вносит существенный вклад в патогенез острого эндометрита [8]. Доказано *in vivo*, что провоспалительные (TNF-α, IL-1β) и противовоспалительные медиаторы (IL-4, IL-10) принимают участие в синтезе и секреции лейкотриенов (A4 гидролазы и LTC₄ синтазы) при воспалении эндометрия [9]. Согласно последним данным, именно субклинически протекающий ХЭ у животных связан с повышенной продукцией PGE₂ и лейкотриенов клетками эндометрия, что коррелирует с большим количеством полиморфноядерных лейкоцитов в соскобах эндометрия [10].

Циклооксигеназа (COX) является ферментом с двумя изоформами (COX-1, COX-2), который катализирует реакцию превращения арахидоновой кислоты в простагландин H₂ (предшественник остальных простагландинов, простациклина и тромбксана A₂) [11]. COX-1 является конститутивной изоформой, то есть обладает функциональной активностью структурного фермента, экспрессируется в большинстве клеток, регулирует продукцию PG, участвующих в обеспечении нормальной (физиологической) функциональной активности клеток [12]. COX-2, в свою очередь, является индуцибельной изоформой, то есть в норме отсутствует в большинстве тканей, однако ее экспрессия существенно увеличивается на фоне воспаления, главным образом, под влиянием «провоспалительных» цитокинов, митогенов, опухолевых промоторов и подавляется «антивоспалительными» медиаторами (кортизол) и цитокинами (интерлейкин-4) [11, 12]. COX-2 имеет более широкий спектр биологических эффектов — принимает участие в ответе на некоторые виды стресса, а также играет заметную роль при различных патологических состояниях [12].

Некоторые данные свидетельствуют о том, что циклооксигеназа-2 — фермент, обладающий разнообразными физиологическими функциями, участвует и в репродукции, роль его в которой многогранна [12]. В опытах на крысах селективное ингибирование COX-2 способствовало овуляции, прикреплению яйцеклетки и уменьшению сокращений беременной матки в ранние сроки, то есть оказывало благотворное влияние на фертильность женской репродуктивной системы [12].

Недавние исследования обозначили важность циклооксигеназы в регуляции функции яичек и мужской фертильности [13].

Заключение

К настоящему времени установлено, что ингибирование циклооксигеназных путей, блокирующее синтез простагландинов, нивелирует эффекты многих провоспалительных цитокинов, участвующих в патогенезе ХЭ [14]. В связи с этими данными изучение роли циклооксигеназы в воспалительном процессе репродуктивных органов и возможности ингибирования циклооксигеназных путей представляют несомненный интерес.

Сведения об авторах:

Самоделкин Евгений Иванович, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии; e-mail: sei-p@mail.ru

Косарева Полина Владимировна, доктор мед. наук, проф., рук. лаб. химии и фармакологии лекарственных веществ; e-mail: perm-bagira@yandex.ru;

Меркучева Наталья Геннадьевна, врач акушер-гинеколог, e-mail: gynvec@rambler.ru;

Нестерова Лариса Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., e-mail: larisa.nesterova@bk.ru

References

1. Clark K.E., Myatt L. *Prostaglandins and the Reproductive Cycle*. Glob. libr. women's med. (ISSN: 1756-2228) 2008; DOI 10.3843/GLOWM.10314.
2. Fattahi M.J. and Mirshafiey A. *Prostaglandins and Rheumatoid Arthritis*. Arthritis. Volume 2012 (2012), Article ID 239310, 7 pages: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/239310>.
3. Kota S.K., Gayatri K., Jammula S., Kota Siva K., Krishna S.V.S., Meher L.K., and Modi K.D. Endocrinology of parturition. *Indian J Endocrinol Metab*. 2013 Jan-Feb; 17(1): 50-59
4. Al-Asmakh M. Reproductive functions of progesterone. *Middle East Fertility Society Journal*. 2007; 12(3): 147-150.
5. Membrive C.M.B., da Cunha P.M., Meirelles F.V., and Binelli M. Calcium potentiates the effect of estradiol on PGF₂ α production in the bovine endometrium. *J Anim Sci Biotechnol*. 2014; 5(1): 25.
6. McCracken J.A., Custer E.E., Lamsa J.C. *Physiological Reviews*. 2014; <http://physrev.physiology.org/content/79/2/263.full.print>
7. Medeiros A., Peres-Buzalaf C., Verdan F.F., Sereznani C.H. *Prostaglandin E2 and the Suppression of Phagocyte Innate Immune Responses in Different Organs*. 2012;2012:327568, 13 pages. doi:10.1155/2012/327568 .
8. Jana B.A.C., Czarzasta J.A., Jaroszewski J. *Synthesis of leukotrienes in porcine uteri with endometritis induced by infection with Escherichia coli*. Reproduction, Fertility and Development. 2013: .
9. Czarzasta J, Andronowska A, Jana B. *Pro- and anti-inflammatory mediators change leukotriene B4 and leukotriene C4 synthesis and secretion in an inflamed porcine endometrium*. Domestic animal endocrinology. 2014; May 21: 49-59.
10. Baranski W., Lukasik K., Skarzynski D., Sztachanska M., Zdunczyk S., Janowski T. Secretion of prostaglandins and leukotrienes by endometrial cells in cows with subclinical and clinical endometritis. *Theriogenology*. 2013; 80(7): 766-772.
11. Nasonov E.L. The modern doctrine of selective COX-2 inhibitors, new aspects of the use of meloxicam (Movalis). *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2003; 4 (68): <http://medi.ru/doc/250716.htm>. (in Russian)
12. Takahashi T., Morrow J.D., Wang H. and Dey S.K. *Cyclooxygenase-2-derived Prostaglandin E2 Directs Oocyte Maturation by Differentially Influencing Multiple Signaling Pathways. The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 37117-37129.
13. Perrotta I., Santoro M., Guido C., Avena P., Tripepi S., De Amicis F., Gervasi M.C., Aquila S. Expression of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 in human male gametes from normal patients, and those with varicocele and diabetes: a potential molecular marker for diagnosing male infertility disorders. *J Anat*. 2012; 221(3): 209-220.
14. Danilova G.A. *Influence of pro-inflammatory cytokines in the respiratory effects of the action of prostaglandins. Medic Academ journal. Prilog. Materiali II Vseross Nauch Conferenc Molodih Uchenih «Problemi biomedic nauki tretiego tisyacheletia» on November 12-14, 2012: 33.* (in Russian)

МЕТОДИКА

© Коллектив авторов, 2016

УДК: 616-092

Иванов Ю.Д.¹, Козлов А.Ф.¹, Галиуллин Р.А.¹, Татур В.Ю.²,
Веснин С.Г.³, Зиборов В.С.⁴, Иванова Н.Д.⁵, Плешакова Т.О.¹**Мониторинг флуктуаций яркостной температуры воды в СВЧ-диапазоне**¹ Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», 119121, Москва, Погодинская ул. 10² Фонд перспективных технологий и новаций, 115682, Москва, Шипиловская ул., 64, 1, 147³ ООО «Фирма РЭС», Москва, 105082, Москва, Большая Почтовая ул., 22⁴ Объединенный институт высоких температур РАН, 125412, г. Москва, ул. Ижорская, д. 13, строение 2⁵ ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», 109472, г. Москва ул. Академика Скрябина, 23

Цель исследования — в мониторинге флуктуаций $T_{\text{СВЧ}}$ воды в процессе ее испарения при температуре $t = 42^\circ\text{C}$, критической для человека, с помощью СВЧ-радиометрии. **Методика:** проводился мониторинг изменения яркостной температуры $T_{\text{СВЧ}}$ воды в СВЧ-диапазоне частот 3,8—4,2 ГГц в процессе ее испарения при температуре в измерительной конусной полипропиленовой кювете $t = 42^\circ\text{C}$. Измерения яркостной температуры проводились при помощи радиотермометра. **Результаты.** Обнаружено появление скачка яркостной температуры $T_{\text{СВЧ}}$ при температуре в измерительной конусной полипропиленовой кювете $= 42^\circ\text{C}$. Скачок $T_{\text{СВЧ}}$ характеризовался фронтом нарастания яркостной температуры в этом диапазоне частот в диапазоне $\sim 4^\circ\text{C}$ с градиентом $\sim 0,05^\circ\text{C}/\text{мин}$ — $15^\circ\text{C}/\text{мин}$ в зависимости от условий организации процесса испарения и резким спадом в течение 10 с, после чего наблюдалась следующая серия менее интенсивных флуктуаций. При этом температура воды оставалась постоянной. **Заключение.** Выявлены существенные изменения яркостной температуры воды в СВЧ-диапазоне при ее испарении при температуре воды в конусной измерительной кювете $t = 42^\circ\text{C}$, наблюдается флуктуация в виде скачка $T_{\text{СВЧ}}$ порядка $\Delta T_{\text{СВЧ}} \sim 4^\circ\text{C}$ в исследуемой области температуры флуктуаций. При этом термодинамическая температура практически не изменяется. Наблюдаемые эффекты должны учитываться при разработке диагностических систем патологического состояния человека и при создании аналитических устройств.

Ключевые слова: кластеры воды; СВЧ-излучение, флуктуации.

Для цитирования: Иванов Ю.Д., Козлов А.Ф., Галиуллин Р.А., Татур В.Ю., Веснин С.Г., Зиборов В.С., Иванова Н.Д., Плешакова Т.О. Мониторинг флуктуаций яркостной температуры воды в СВЧ-диапазоне. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 101—107. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.101-107

Для корреспонденции: Иванов Юрий Дмитриевич, e-mail: yurii.ivanov@ Rambler.ru.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы при поддержке гранта РФФИ 15-04-08368а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.11.2016

Ivanov Yu.D.¹, Kozlov A.F.¹, Galiullin R.A.¹, Tatur V.Yu.²,
Vesnin S.G.³, Ziborov V.S.⁴, Ivanova N.D.⁵, Pleshakova T.O.¹**Monitoring of brightness temperature fluctuation of water in SHF range**¹ Institute of Biomedical Chemistry, 10, ul. Pogodinskaya, Moscow, 119121, Russia² Foundation of Perspective Technologies and Novations, 64 build. 1, ul. Shipilovskaya, Moscow, 115682, Russia³ RES Ltd., 22, ul. B. Pochtovaya, Moscow, 105082, Russia⁴ Joint Institute for High Temperatures of Russian Academy of Sciences, 13 build. 2, ul. Izhorskaya, Moscow, 125412, Russia⁵ Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I., Moscow, Russia. Academician Skryabin st., 23, 109472

The purpose of the research consisted in detection of fluctuation of brightness temperature (T_{SHF}) of water in the area of the temperature $T = 42^\circ\text{C}$ (that is critical for human) during its evaporation by SHF radiometry. **Methods:** Monitoring of the changes in brightness temperature of water in superhigh frequency (SHF) range (3.8-4.2 GHz) near the phase transition temperature of water $T = 42^\circ\text{C}$ during its evaporation in the cone dielectric cell. The brightness temperature measurements were carried out using radiometer. **Results:** Fluctuation with maximum of brightness temperature was detected in

3.8-4.2 GHz frequency range near at the temperature of water $T = 42^\circ\text{C}$. It was characteristic for these T_{SHF} fluctuations that brightness temperature rise time in this range of frequencies in $\sim 4^\circ\text{C}$ temperature range with $0.05\text{-}15^\circ\text{C}/\text{min}$ gradient and a sharp decrease during 10 s connected with measuring vapor conditions. Then nonintensive fluctuation series was observed. At that, the environment temperature remained constant. **Conclusion:** The significant increasing in brightness temperature of water during its evaporation in SHF range near the temperature of $T \sim 42^\circ\text{C}$ were detected. It was shown that for water, T_{SHF} pull with the amplitude $\Delta T_{\text{SHF}} \sim 4^\circ\text{C}$ are observed. At the same time, thermodynamic temperature virtually does not change. The observed effects can be used in the development of the systems for diagnostics of pathologies in human and analytical system.

Keywords: water clusters, SHF emission, fluctuation.

For citation: Ivanov Yu.D., Kozlov A.F., Galiullin R.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ziborov V.S., Pleshakova T.O. Monitoring of fluctuation of brightness temperature of water in SHF range. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (2): 101–107. (in Russ.) DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.101-107

For correspondence: Yuri D. Ivanov, Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory, Institute of Biomedical Chemistry; 10, ul. Pogodinskaya, Moscow, 119121, Russia, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

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

Acknowledgement. The work was performed in the framework of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013-2020. This work was supported by RFBR Grant No. 15-04-08368 A.

Information about authors

Ivanov Yu.D., <http://orcid.org/0000-0001-5041-1914>

Pleshakova T.O., <http://orcid.org/0000-0003-3217-9095>

Received 01.11.2016

Введение

Функционирование живых систем обусловлено физико-химическими свойствами воды — основного компонента многоклеточного организмом, в том числе и человека. Вода характеризуется рядом аномальных свойств, таких, как наличие флуктуаций ее состояний, аномальные температурные зависимости. Так, в работах [1, 2] обсуждалось, что в водном растворе наблюдаются флуктуации ENOX1-фермента поверхности эукариотической клетки, которые в свою очередь определяются периодическими изменениями отношения орто/пара-изомеров воды. Воде присуще существование экстремальных точек в окрестностях нескольких температурных диапазонов $t_3 \sim 4^\circ\text{C}$, 35°C , 45°C и 75°C [3]. Вода представляет собой сложную среду, в которой формируются устойчивые молекулярные кластеры, характеризующиеся частотами массивного льда, тетрамерных и димерных кластеров наряду с короткоживущими комплексами [4]. Очевидно, что структура воды и изменения этой структуры влияют на свойства растворов, в которых водная среда является основным компонентом. Интерес к исследованию физико-химических свойств воды, водных растворов ферментов связанных с флуктуациями воды и ее аномальными свойствами, в последнее время возрастает [5—11].

В последнее время, появились новые аналитические методы на основе прямой СВЧ-радиотермометрии, которая интересна тем, что этот диапазон соответствует частотному диапазону вращательных спектров воды и гидроксила [4, 5]. Этими методами были исследованы свойства функционирующих ферментных систем [10, 11]. Наиболее интересным является диапазон вблизи экстремальной температуры $t_3 \sim 45^\circ\text{C}$. В окрестности этой температуры происходят процессы денатурации белков, нарушается обмен веществ в тканях мозга, и эта температура является критической для человека. Кроме того, отметим, что эта температура находится вблизи $t_3 = 45^\circ\text{C}$, в области которой происходят изменения, связанные с динамической вязкостью, сжимаемостью и удельной электропроводностью. В свою очередь, изменение электропроводности напрямую связано со свойствами СВЧ-резонансных структур, что особенно важно учитывать при проведении биоаналитических и диагностических исследований с помощью радиотермометрии [10]. Поэтому, представляет интерес исследовать физико-химические свойства воды в температурном диапазоне, который может определять особенности течения патологических процессов в организме.

Цель — исследование методом СВЧ-радиотермометрии свойств воды при критической для организма человека температуре 42°C .

Методика

Деионизованная, ультрачистая вода была получена на установке Milli-Q System (Millipore, USA). Удельное сопротивление воды составляло 18,2 МОм·см.

Измерение яркостной температуры в СВЧ-диапазоне

Используемый в нашей работе радиотермометр RTM-01 RES (Россия) измеряет электромагнитное излучение среды в микроволновом (СВЧ) диапазоне. Мощность электромагнитного излучения в области частот Δf среды пропорциональна радиометрической (яркостной) температуре среды T_{rad} [12]. Для СВЧ-диапазона мощность СВЧ-сигнала можно представить в виде:

$$P = kT_{rad} \Delta f (1 - R), \quad (1)$$

где P — мощность шумового сигнала на выходе антенны, Вт;

$k = 1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К;

Δf — полоса частот радиотермометра, ГГц;

R — коэффициент отражения.

Таким образом, в соответствии с (1), измеряя мощность собственного излучения среды в микроволновом диапазоне, можно получать информацию о яркостной температуре T_{rad} , которая будет характеризовать излучательную способность исследуемой среды.

T_{rad} — яркостная температура, измеряемая с помощью радиотермометра. T_{rad} связана с «обычной» физической температурой среды $T(r)$ соотношением (2):

$$T_{rad} = \int_{-\infty}^{\infty} T(r) * C(r) dV$$

$$C(r) = \frac{\frac{\sigma}{2} |\overline{E}(r)|^2}{\int_{-\infty}^{\infty} \frac{\sigma}{2} |\overline{E}(r)|^2 dV} \quad (2)$$

где $T(r)$ — термодинамическая температура,

r — текущая координата,

$C(r)$ — весовая радиометрическая функция,

$\overline{E}(r)$ — вектор электрического поля создаваемого антенной в исследуемом объеме,

σ — электропроводность среды.

Если температура исследуемой среды постоянна и равна T_0 , то из (2) следует, что $T_{rad} = T_0$, т. е. яркостная температура совпадает с термодинамической. В нашей работе проводились измерения яркостной температуры воды в СВЧ-диапазоне частот 3,4—4,2 ГГц.

Погрешность измерения яркостной температуры $T_{СВЧ}$ радиотермометром RTM-01 RES (Россия) составляла $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Для регистрации излучения в СВЧ-диапазоне использовалась штыревая антенна, соединенная с радиотермометром.

Процедура подготовки воды для измерения

Вода нагревалась в термостате (Т-24, БИС, Россия) до температуры 42°C , после чего отбиралась пипеткой объемом 1 мл. Измерения $T_{СВЧ}$ воды были проведены после инъекции воды в коническую полипропиленовую измерительную кювету с диаметром основания конуса 25 мм и высотой 17 мм. Измерительная кювета вставлялась в термостат Eppendorf (модель Thermomixer Comfort, Германия), температура которого поддерживалась в окрестности температуры 42°C . Измерение проводилось в измерительной кювете в двух вариантах: 1-я схема — верхняя часть кюветы, выступающая из термостата и не содержащая воду, в которую погружалась штыревая антенна, находилась на воздухе; 2-я схема — верхняя часть кюветы, выступающая из термостата и не содержащая воду, в которую погружалась штыревая антенна, дополнительно изолировалась от окружающей среды термооболочкой из пенопласта для того, чтобы уменьшить теплообмен измерительной системы с внешней средой.

Измерения проводились в течение 250 мин, за это время наблюдения испарялось 400 мкл воды. Измерения проводились с двукратным повторением.

Результаты и обсуждение

Известно, что в состоянии термодинамического равновесия любая среда излучает сплошной спектр, в том числе в СВЧ-диапазоне. Интенсивность излучения выражается через величину яркостной температуры — фотометрической величины, характеризующей излучения. В состоянии равновесия яркостная температура ($T_{СВЧ}$), измеренная в СВЧ-диапазоне равна термодинамической температуре излучающей среды (T_0).

При выведении среды из равновесия она стремится вернуться в равновесное состояние, при этом может возникать излучение, связанное с этим переходом.

В работе проводился мониторинг изменения соотношения яркостной температуры ($T_{СВЧ}$) и термодинамической температуры (T) воды после ее нагрева до температуры воды $t = 42^\circ\text{C}$. Эта температура находится в области температурного экстремума $t_3 = 45^\circ\text{C}$, связанного с динамической вязкостью, сжимаемостью и удельной электропроводностью. Основные результаты этих экспериментов приведены на рис. 1 и описаны ниже.

Результаты измерений при 42°C

На рис. 1 (а, б) представлены результаты эксперимента по измерению яркостной температуры $T_{СВЧ}$ при температуре воды в измерительной кювете при температуре воды $t = 42^\circ\text{C}$ в измерении 1, когда часть антенны над поверхностью жидкости в кювете не изолировалась термооболочкой.

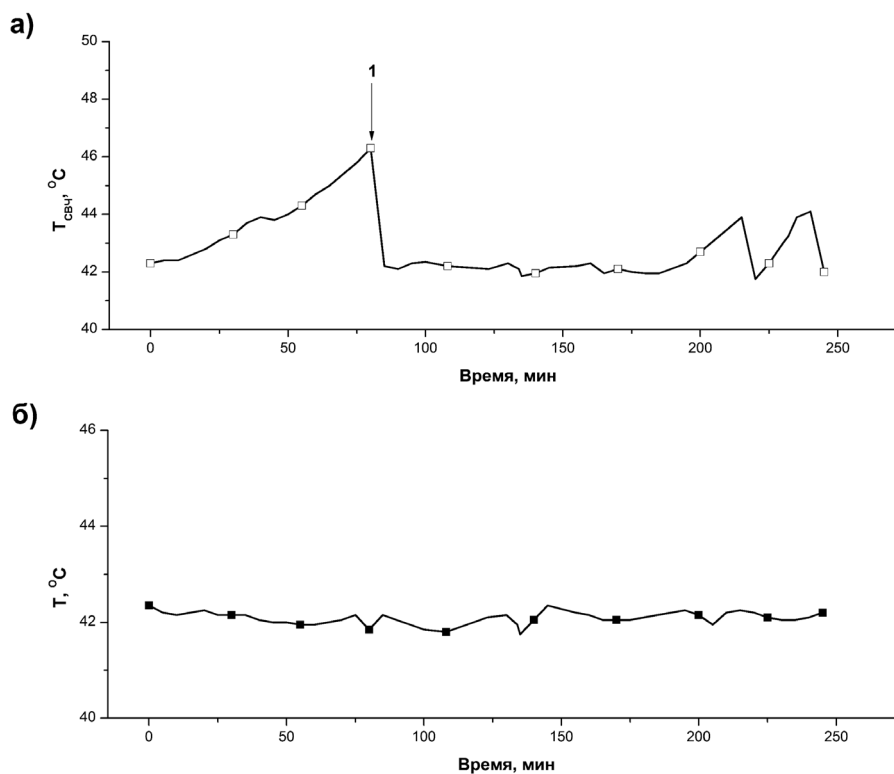


Рис. 1. Результаты измерения яркостной температуры в СВЧ-диапазоне $T_{свч}$ (а) и термодинамической температуры T (б) в воде. По оси X — время измерений, минуты; по оси Y — величина яркостной температуры (а) и температуры воды в кювете (б) градусы Цельсия. Условия эксперимента по схеме 1-й: верхняя часть измерительной кюветы без термооболочки.

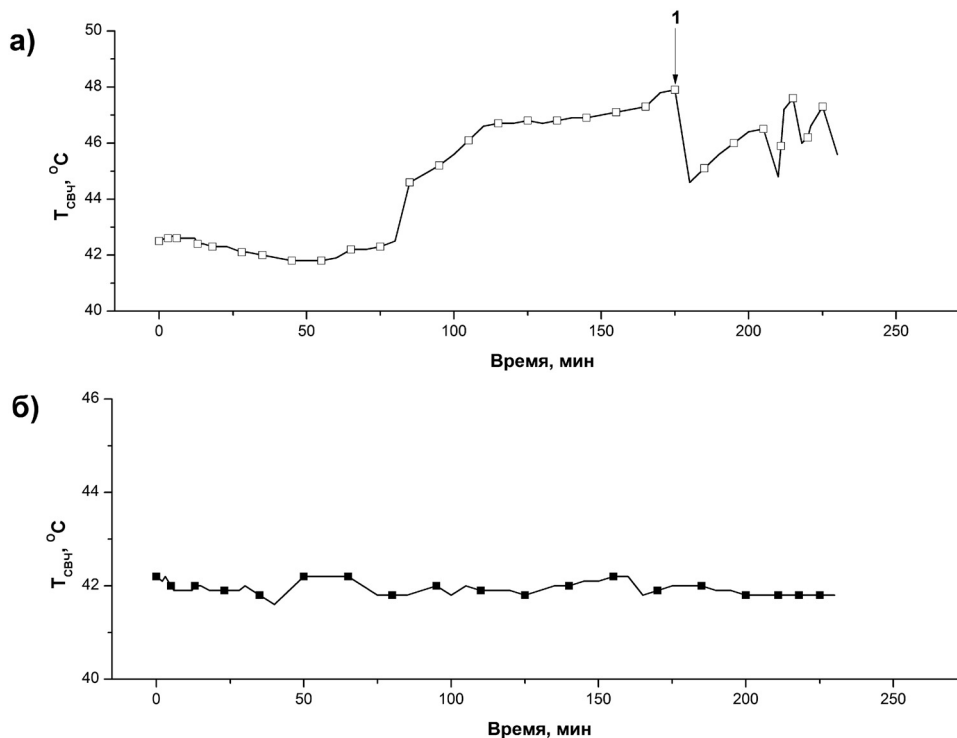


Рис. 2. Результаты измерения яркостной температуры в СВЧ-диапазоне $T_{свч}$ (а) и термодинамической температуры T (б) в воде. По оси X — время измерений, минуты; по оси Y — величина яркостной температуры (а) и температуры воды в кювете (б) градусы Цельсия. Условия эксперимента по 2-й схеме: верхняя часть измерительной кюветы с термооболочкой.

Как видно из рис. 1, на графике $T_{\text{СВЧ}}(t)$ наблюдалось появление сильной флуктуации (обозначенной на рисунке цифрой 1): $T_{\text{СВЧ}}$ воды резко увеличивалась до 46°C ($\Delta T_{\text{СВЧ}} \sim 4^\circ\text{C}$ в течение 78 мин с градиентом нарастания $\Delta T_{\text{СВЧ}}/\Delta t \sim 0,05^\circ\text{C}/\text{мин}$). После чего наблюдался резкий обратный скачок на $\Delta T_{\text{СВЧ}} \sim 4^\circ\text{C}$ за 10 с. При этом температура T воды практически не изменилась.

Начало следующего — второго резкого подъема $T_{\text{СВЧ}}$ наблюдалось через 189 мин после начала первого импульса СВЧ. Изменение температуры $\Delta T_{\text{СВЧ}} = 2,2^\circ\text{C}$ за 27 мин, то есть градиент увеличения $\Delta T_{\text{СВЧ}}/\Delta t \sim 0,05^\circ\text{C}/\text{мин}$. Затем $T_{\text{СВЧ}}$ опять резко спадала на $2,2^\circ\text{C}$ за 10 с. При этом T воды практически не менялась. Далее, наблюдался третий подъем $T_{\text{СВЧ}}$ за 34 мин с $\Delta T_{\text{СВЧ}} = 2,2^\circ\text{C}$ ($\Delta T_{\text{СВЧ}}/\Delta t \sim 0,08^\circ\text{C}/\text{мин}$), с последующим резким спадом в течение 10 с на $2,2^\circ\text{C}$. При этом температура воды практически не менялась.

Были проведены эксперименты по мониторингу $T_{\text{СВЧ}}$ в измерительной ячейке по 2-й схеме (рис. 2 а,б).

Как видно из рис. 2, а наблюдался резкий градиент пика 1 (на $\sim 3^\circ\text{C}$ за 10 с) с более высокой скоростью по сравнению с 1-й схемой измерения — до $\sim 15^\circ\text{C}/\text{мин}$. После чего наблюдалось дальнейшее повышение $T_{\text{СВЧ}}$ с более низкой скоростью ($\sim 0,06^\circ\text{C}/\text{мин}$) в течение 90 мин, а затем наблюдалось резкое падение на $\sim 3^\circ\text{C}$. Далее наблюдалась серия трех небольших импульсов. Начало первого из них наблюдалось через ~ 90 мин.

Таким образом, показано, что при температуре $t = 42^\circ\text{C}$, находящейся вблизи фазового перехода воды $t_3 = 45^\circ\text{C}$, наблюдается существенная флуктуация, представленная в виде скачка температуры $\Delta T_{\text{СВЧ}} \sim 3-4^\circ\text{C}$ (в зависимости от схемы измерения), в то время как термодинамическая температура воды практически не изменялась (в пределах $\pm 0,2^\circ\text{C}$). Такой процесс может быть связан с изменениями резонансных свойств измерительной кюветной системы, в которой в процессе измерения меняется объем воды, и, возможно, ее кластерная структура. В процессе изменений резонансных свойств измерительной кюветной системы: вода — антенна (с соединительным кабелем) — диэлектрик конуса измерительной ячейки выделяют резонансные частоты, на которых наблюдается усиление СВЧ-сигнала, (при этом, возможно, при определенных частотах имеет место излучение среды, — что похоже на организацию оптически активной среды), а при определенных частотах, возможно, и поглощение СВЧ-сигнала. Этот вопрос требует дальнейших исследований.

Отметим, что резонансные свойства измерительной кюветной системы, определяемые не только диэлектрической проницаемостью стенок кюветы, но

в том числе и диэлектрической постоянной воды, связанной, в свою очередь, со структурными перестройками воды, должны зависеть от температуры. Действительно, изменение температуры воды в измерительной кювете до $t_3 = 45^\circ\text{C}$ (температура фазового перехода, связанная с динамической вязкостью, сжимаемостью и удельной электропроводностью) при данной геометрии (в тех же условиях использования термоизоляции верхней части измерительной кюветы, как и в случае 2-й измерительной схемы) приводили к дальнейшему небольшому увеличению градиента скачка; фронт нарастания $T_{\text{СВЧ}}$ достигает скорости $4^\circ\text{C}/10 \text{ с} \sim 24^\circ\text{C}/\text{мин}$. При большей отстройке температуры воды в кювете от $t_3 = 45^\circ\text{C}$ в область $t = 56^\circ\text{C}$ (в тех же условиях использования термоизоляции верхней части измерительной кюветы, как и во 2-й схеме) наблюдалось значительное снижение фронта нарастания температуры $T_{\text{СВЧ}}$ до величины $0,05^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Так как резонансные свойства измерительной системы зависят от взаимного расположения ее конструктивных элементов, то зависимость $T_{\text{СВЧ}}$ в процессе испарения жидкости от температуры также может зависеть от их взаимного расположения, что необходимо учитывать при разработке систем мониторинга $T_{\text{СВЧ}}$ в диагностических и аналитических системах.

Данные, полученные по флуктуациям $T_{\text{СВЧ}}$ воды, позволят в дальнейшем разрабатывать новые методы и новые системы на их основе для СВЧ-диагностики и лечения патологических состояний человека. В настоящее время метод на базе мониторинга $T_{\text{СВЧ}}$ человека уже нашел применение в диагностике заболеваний человека [<http://www.freepatent.ru/imagenes/patents/53/2407429/patent-2407429.pdf>].

Отметим, что биологические аналитические системы традиционно основаны на использовании водных растворов с целью дальнейшего анализа их характеристик. В биологических, протеомных и медицинских исследованиях, при использовании водных растворов аналитов, могут происходить изменения структуры водного раствора, сопровождающиеся проявлением СВЧ-излучения [13, 14]. Это касается любых нано- и микрофлюидных систем, а также и обычных лабораторных систем, в том числе высокочувствительных, таких как оптические биосенсоры [15-19], нанопроводные детекторы [20-23], АСМ-фишинг системы [24—27].

Таким образом, обнаружены изменения яркостной температуры воды в СВЧ-диапазоне при термодинамической температуре воды $t \sim 42^\circ\text{C}$, находящейся в окрестности $t_3 \sim 45^\circ\text{C}$. Показано, что для воды наблюдаются флуктуации с амплитудой $\Delta T_{\text{СВЧ}} \sim 4-5^\circ\text{C}$ в виде неэквидистантных скачков $T_{\text{СВЧ}}$ с градиентом нарастания $0,05-0,2^\circ\text{C}/\text{мин}$ исследуемой области температуры вблизи фазового перехода. В то

же время, термодинамическая температура воды практически не изменяется. Наблюдаемые эффекты должны быть учтены при разработке диагностических систем патологического состояния человека.

References

- Morre D.J., Morre D.M. ENOX proteins, copper hexahydrate-based ultradian oscillators of the cells' biological clock. In: *Ultradian Rhythms from Molecules to Mind*. Lloyd D., Rossi E. (eds.). Springer Science, Business Media B.V., 2008. 43-84.
- Morre D.J., Orczyk J., Hignite H., Kim C. Regular oscillatory behavior of aqueous solutions of CuII salts related to effects on equilibrium dynamics of ortho/para hydrogen spin isomers of water. *J. Inorg. Biochem.* 2008; 102: 260-67.
- Kholmanskiy A.S. Two types of anomalous thermodynamics of water. *Apriori. Series: Iestestvennye I tekhnicheskije nauki*. 2015; 1: 1-17. (in Russian)
- Pershin S.M. Ortho-Para Conversion of H₂O in Water and a Jump in Erythrocyte Fluidity Through a Microcapillary at a Temperature of 36.6±0.3°C. In: *V International Congress «Weak and Ultra-Weak Fields and Emissions in Biology and Medicine». Conference Proceedings*. 2009; St.-Petersburg: 87-97.
- Bunkin A.F., Pershin S.M., Gorchakov A.P., Nurmatov A.A. Four Photon Spectroscopy of coherent rotation of molecules in liquid in 0-3 THz range. *Pis'ma v ZhTKh*. 2006; 32(8): 20-9. (in Russian)
- Tanaka H. Importance of many-body orientational correlations in the physical description of liquids. *Faraday Discuss.* 2013; 167: 9-76.
- Huang C., Wikfeldt K., Tokushima T., Nordlund D., Harada Y., Bergmann U., Niebuhr M., Weiss T., Horikawa Y., Leetmaa M., Ljungberg M.P., Takahashi O., Lenz A., Ojamae L., Lyubartsev A.P., Shin S., Pettersson L.G.M., Nilsson A. The inhomogeneous structure of water at ambient conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106: 15214-18.
- Fesenko E., Terpugov E. About 5 unusual spectral properties of water in a thin layer. *Biofizika*. 1999; 44: 5-9. (in Russian)
- Pershin. Two Liquid Water. *Phys. Wave Phenom.* 2005; 13: 192-208.
- Ivanov Y.D., Malsagova K.A., Izotov A.A., Pleshakova T.O., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Usanov S.A., Archakov A.I. Detection of microwave radiation of cytochrome CYP102A1 solution during the enzyme reaction. *Biochem. Biophys. Reports*. 2016; 5: 285-9.
- Ivanov Yu.D., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Vesnin S.G., Tatur V.Yu., Ivanova N.D., Ziborov V.S. Monitoring of microwave emission of HRP system during the enzyme functioning. *Biochem. Biophys. Reports*. 2016; 7: 20-5.
- Vaisblat A.V. *Radiothermography as a method of diagnostics in medicine. [Radiotermografiya kak metod diagnostiki v meditsine]*. Moscow: NTsZD RAMN: 2003. (in Russian)
- Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S. Microwave emission from water in bioanalytical systems. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59(4): 78-81. (in Russian)
- Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S. SHF radiation from albumin solution upon external excitation. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(3): 101-4. (in Russian)
- Day E., Capili A., Borysenko Ch., Zafari M., Whitty A. Determining the affinity and stoichiometry of interactions between unmodified proteins in solution using Biacore. *Anal. Biochem.* 2013; 440: 96-107.
- Ivanov Yu., Kanaeva I., Eldarov M., Skryabin K., Lehnerer M., Schulze J., Hlavica P., Archakov A. An optical biosensor study of the parameters and role of hydrophobic tails of cytochrome P450 cytochromes P450B4, b5 and NADPH15 flavoprotein in complex. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997; 42: 731-7.
- Ivanov Yu., Kanaeva I., Karuzina I., Archakov A., Hui Bon Hoa G., Sligar S. Molecular recognition in the P450cam monooxygenase system: direct monitoring of protein-protein 20 interaction by using optical biosensor. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 391: 255-64.
- Ivanov Yu., Kanaeva I., Karyzina I., Usanov S., Hui Bon Hoa G., Sligar S., Archakov A. Revelation of ternary complexes between redox partners in cytochrome P450-25 containing monooxygenase systems by the optical biosensor method. *J. Inorg. Biochem.* 2001; 87: 175-84.
- Ivanov Yu., Kanaeva I., Gnedenko O., Pozdnev V., Shumyantseva V., Samenkova N., Kuznetsova G., Tereza A., Schmid R., Archakov A. Optical Biosensor 30 investigation of interactions of biomembrane and water-soluble cytochromes P450 and their redox partners with covalently immobilized phosphatidylethanolamine layers. *J. Mol. Recognit.* 2001; 14: 185-96.
- Patolsky F., Zheng G., Hayden O., Lakadamyali M., Zhuang X., Lieber C. Electrical detection of single viruses. *Proc Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 14017-22.
- Zheng G., Gao X., Lieber C. Subthreshold regime has the optimal sensitivity for nanowire FET biosensors. *Nano Lett.* 2010; 10: 547-52.
- Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Krohin N.V., Shumyantseva V.V., Shumov I.D., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Aseev A.L., Archakov A.I. SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBsAg and a-fetoprotein. *Lab Chip*. 2012; 12: 5104-11.
- Malsagova K.A., Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Kozlov A.F., Archakov A.I., Popov V.P., Fomin B.I., Latyshev A.V., A SOI-nanowire biosensor for the multiple detection of D-NFATc1 protein in the serum. *Anal. Methods*. 2015; 7: 8078-85.
- Archakov A, Ivanov Yu, Lisitsa A, Zgoda V. AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics. *Proteomics*. 2007; 7: 4-9.
- Archakov A, Ivanov Y, Lisitsa A, Zgoda V. Biospecific irreversible fishing coupled with atomic force microscopy for detection of extremely low-abundant proteins. *Proteomics*. 2009; 9: 1326-43.
- Ivanov Yu., Pleshakova T., Malsagova K., Kozlov A., Kaysheva A., Kopylov A., Izotov A., Andreeva E., Kanasenko S., Usanov S., Archakov A. Highly sensitive protein detection by combination of atomic force microscopy fishing with charge generation and mass spectrometry analysis. *FEBS*. 2014; 20: 4705-17.
- Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Izotov A.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S., Archakov A.I. AFM-based protein fishing in the pulsed electric field. *Bio-meditsinskaya Khimiya*. 2016; 62: 439-46.

Сведения об авторах:

Иванов Юрий Дмитриевич (Ivanov Yu.D.) — доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

Козлов Андрей Федорович (Kozlov A.F.) — ведущий инженер лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ

Галиуллин Р.А., ведущий программист, ИБМХ

Татур Вадим Юрьевич (Tatur V.Yu.) — исполнительный директор, Фонд перспективных технологий и новаций

Веснин Сергей Георгиевич (Vesnin S.G.) — кандидат технических наук, доцент, генеральный директор ООО «Фирма РЭС»

Зиборов Вадим Серафимович (Ziborov V.S.) — кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории ударно-волновых воздействий ОИВТ РАН

Иванова Нина Дмитриевна (Ivanova N.D.) — преподаватель ФГБОУ ВПО «МГАВМиБ

Плешакова Татьяна Олеговна (Pleshakova T.O.) — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ

Требования к рукописям, направляемым в журнал «Патологическая физиология и экспериментальная терапия»

(составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ

и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы»,
разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов)

1. ОБЩИЕ ПРАВИЛА. Статья должна иметь визу руководителя и сопровождаться официальным направлением от учреждения, из которого выходит статья, в необходимых случаях — экспертным заключением. В направлении следует указать, является ли статья диссертационной.

Статья должна быть подписана всеми авторами, что дает право журналу на ее публикацию в бумажном и (или) электронном формате и размещение на сайте журнала (издательства).

Нельзя направлять в редакцию работы, напечатанные в иных изданиях или отправленные в иные издания.

Редакция оставляет за собой право на сокращение и редактирование присланных статей. Датой поступления статьи считается время поступления окончательного (переработанного) варианта статьи.

2. Плата за публикацию рукописей с аспирантов не взимается.

3. Статья присылается в редакцию в распечатке (1 экз.) с обязательным приложением электронной версии или по электронной почте.

4. Статья должна быть напечатана шрифтом Times New Roman, размер шрифта 14, с двойным интервалом между строками, все поля, кроме левого, шириной 2 см, левое поле 3 см. Все страницы должны быть пронумерованы. Автоматический перенос слов использовать нельзя.

5. ОБЪЕМ статей не должен превышать 18 страниц (включая иллюстрации, таблицы, резюме и список литературы), рецензий и информационных сообщений — 3 с.

6. ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ должен содержать:

- 1) фамилию и инициалы автора (авторов);
- 2) название статьи;
- 3) полное наименование учреждения, в котором работает автор, в именительном падеже с обязательным указанием статуса организации (аббревиатура перед названием) и ведомственной принадлежности;
- 4) полный почтовый адрес учреждения;
- 5) контактную информацию: Ф.И.О. полностью и адрес электронной почты автора, ответственного за переписку и номер телефона.

Если авторов несколько, после каждой фамилии и соответствующего учреждения проставляется цифровой индекс. Если все авторы статьи работают в одном учреждении, указывать место работы каждого автора отдельно не нужно, достаточно указать учреждение один раз.

Образец титульного листа:

Рахманин Ю.А.¹, Зыкова И.Е.¹, Федичкина Т.П.¹, Соленова Л.Г.²

Подходы к изучению роли водного фактора в распространности инфекции *Helicobacter pylori*

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина Минздрава России, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10/15, стр. 1

² — ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАН, 119992, Москва, Каширское ш., 24

Для корреспонденции: Соленова Лия Геннадьевна, (указать должность, ученую степень и звание, место работы — отдел, лаб.), e-mail: lsolenova@mail.ru

7. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ РИНЦ

На отдельной странице указываются дополнительные сведения о каждом авторе, необходимые для обработки журнала в Российском индексе научного цитирования: Ф.И.О. полностью на русском языке и в транслитерации, ученая степень, ученое звание, должность, e-mail для контактов с авторами статьи (можно один на всех авторов).

Образец:

Рахманин Юрий Анатольевич (Rakhmanin Yu.A.), доктор мед. наук, проф., акад. РАН, директор института;

Зыкова Ирина Евгеньевна (Zykova I.E.), доктор мед. наук, рук. лаб. диагностики экологически зависимой патологии с группой гигиенической экспертизы;

Федичкина Татьяна Павловна (Fedichkina T.P.), канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. диагностики экологически зависимой патологии с группой гигиенической экспертизы, e-mail: fedichkina@yandex.ru

Соленова Лия Геннадьевна (Solenova L.G.), доктор биол. наук, ст. науч. сотр., e-mail: lsolenova@mail.ru

8. Дальнейший ПЛАН ПОСТРОЕНИЯ оригинальных статей должен быть следующим: подробное резюме (180-200 слов), ключевые слова, краткое введение, отражающее состояние вопроса к моменту написания статьи и задачи настоящего исследования, материалы и методы, ре-

зультаты и обсуждение, выводы по пунктам или заключение, список цитированной литературы.

Изложение статьи должно быть ясным, сжатым, без длинных исторических введений и повторений. Предпочтение следует отдавать новым и проверенным фактам, результатам длительных исследований, важных для решения практических вопросов.

Методика исследований должна быть описана очень четко, так чтобы ее легко можно было воспроизвести.

При представлении в печать экспериментальных работ следует руководствоваться «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Помимо вида, пола и количества использованных животных, авторы обязательно должны указывать применявшиеся при проведении болезненных процедур методы обезболивания и методы умерщвления животных.

Нужно указать, являются ли приводимые числовые значения первичными или производными, привести пределы точности, надёжности, интервалы достоверности, оценки, рекомендации, принятые или отвергнутые гипотезы, обсуждаемые в статье.

9. СТАНДАРТЫ. Все термины и определения должны быть научно достоверны, их написание (как русское, так и латинское) должно соответствовать «Энциклопедическому словарю медицинских терминов» (в 3-х томах, под ред. акад. Б.В. Петровского).

Лекарственные препараты должны быть приведены только в международных непатентованных названиях, которые употребляются первыми, затем в случае необходимости приводится несколько торговых названий препаратов, зарегистрированных в России (в соответствии с информационно-поисковой системой «Клифар-Госреестр» [Государственный реестр лекарственных средств]).

Желательно, чтобы написание ферментов соответствовало стандарту Enzyme Classification.

Желательно, чтобы наследуемые или семейные заболевания соответствовали международной классификации наследуемых состояний у человека (Mendelian Inheritance in Man [<http://ncbi.nlm.nih.gov/Omim>]).

Названия микроорганизмов должны быть выверены в соответствии с «Энциклопедическим словарём медицинских терминов» (в 3-х томах, под ред. акад. Б.В. Петровского) или по изданию «Медицинская микробиология» (под ред. В.И. Покровского).

Написание Ф.И.О., упоминаемых в тексте, должно соответствовать списку литературы.

Рукопись может сопровождать словарь терминов (неясных, способных вызвать у читателя затруднения при прочтении).

Помимо общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, ДНК), допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте. Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте при их

первом упоминании. Не допускаются сокращения простых слов, даже если они часто повторяются.

Дозы лекарственных средств, единицы измерения и другие численные величины должны быть указаны в системе СИ.

10. АВТОРСКИЕ РЕЗЮМЕ

Авторское резюме к статье является основным источником информации в отечественных и зарубежных информационных системах и базах данных, индексирующих журнал. Резюме доступно на сайте журнала, на сайте Научной электронной библиотеки и индексируется сетевыми поисковыми системами.

По аннотации к статье читателю должна быть понятна суть исследования. По аннотации читатель должен определить, стоит ли обращаться к полному тексту статьи для получения более подробной, интересующей его информации. Резюме должно излагать только существенные факты работы. Приветствуется структура аннотации, повторяющая структуру статьи и включающая введение, цели и задачи, методы, результаты, заключение (выводы). Однако: предмет, тема, цель работы указываются в том случае, если они не ясны из заглавия статьи; метод или методологию проведения работы целесообразно описывать в том случае, если они отличаются новизной или представляют интерес с точки зрения данной работы.

Резюме должно начинаться с информации, содержащейся на титульном листе. Объем текста авторского резюме определяется содержанием публикации (объемом сведений, их научной ценностью и/или практическим значением) и должен быть в пределах 150-250 слов.

Резюме должно сопровождаться несколькими **КЛЮЧЕВЫМИ СЛОВАМИ** или словосочетаниями, отражающими основную тематику статьи и облегчающими классификацию работы в компьютерных поисковых системах. Ключевые слова перечисляются через точку с запятой. В конце перечисления точка не ставится.

Резюме и ключевые слова должны быть представлены как на русском, так и на английском языках. При переводе фамилии авторов рекомендуется транслитерировать так же, как в предыдущих публикациях или по системе BGN (Board of Geographic Names), см. сайт <http://www.translit.ru>.

В отношении организации(ий) важно, чтобы был указан официально принятый английский вариант наименования.

11. ТРЕБОВАНИЯ К РИСУНКАМ,

представленным на электронных носителях. Черно-белые штриховые рисунки: формат файла — TIFF (расширение *.tiff), любая программа, поддерживающая этот формат (Adobe PhotoShop, Adobe Illustrator и т.п.); режим — bitmap (битовая карта); разрешение 600 dpi (пиксели на дюйм); возможно использование сжатия LZW или другого; носители CD-R, CD-RW; обязательно наличие распечатки, причем каждая иллюстрация должна

быть распечатана на отдельном листе. Текст на иллюстрациях должен быть четким.

12. ПОДПИСИ К РИСУНКАМ И ФОТОГРАФИЯМ группируются вместе и даются на отдельном листе. Каждый рисунок должен иметь общий заголовок и расшифровку всех сокращений. В подписях к графикам указываются обозначения по осям абсцисс и ординат и единицы измерения, приводятся пояснения по каждой кривой. В подписях к микрофотографиям указываются метод окраски и увеличение.

13. ОФОРМЛЕНИЕ ТАБЛИЦ: сверху справа необходимо обозначить номер таблицы (если таблиц больше, чем одна), ниже дается ее название. Сокращения слов в таблицах не допускаются. Все цифры в таблицах должны соответствовать цифрам в тексте и обязательно должны быть обработаны статистически. Таблицы можно давать в тексте, не вынося на отдельные страницы.

14. БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ СПИСКИ. Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, в которых они работают.

В оригинальных статьях допускается цитировать не более 30 источников, в обзорах литературы — не более 60, в лекциях и других материалах — до 15. Библиография должна содержать, помимо основополагающих работ, публикации за последние 5 лет.

В списке литературы все работы перечисляются в порядке их цитирования. Библиографические ссылки в тексте статьи даются цифрой в квадратных скобках.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Библиографическое описание книги (после ее названия): город (где издана); после двоеточия название издательства; после точки с запятой год издания. Если ссылка дается на главу книги: (авторы); название главы; после точки ставится «В кн.:» или «In:» и фамилия(и) автора(ов) или редактора(ов), затем название книги и выходные данные.

Библиографическое описание статьи из журнала: автор(ы); название статьи; название журнала; год; том; в скобках номер журнала, после двоеточия цифры первой и последней страниц.

При авторском коллективе до 6 человек включительно упоминаются все, при больших авторских коллективах 6 первых авторов «и др.», в иностранных «et al.»; если в качестве авторов книг выступают редакторы, после фамилии, после запятой, следует ставить «ред.», в иностранных «ed.»

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи — References — и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в латинице (романским алфавитом). Поэтому авторы статей должны давать список литера-

туры в двух вариантах: один на языке оригинала (русскоязычные источники кириллицей, англоязычные латиницей), и отдельным блоком тот же список литературы (References) в романском алфавите для международных баз данных, повторяя в нем все источники литературы, независимо от того, имеются ли среди них иностранные. Если в списке есть ссылки на иностранные публикации, они полностью повторяются в списке, готовящемся в романском алфавите.

Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников. Переводятся названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных, которые даются в цифровом формате, его языка (in Russian). Название источника выделяется курсивом.

Список литературы в латинице может готовиться с помощью систем транслитерации свободного доступа (<http://www.translit.ru>) и переводчика Google. Вручную делать транслитерацию не допускается в целях избежания ошибок.

Поскольку возможны различные варианты транслитерации фамилий, при приготовлении ссылок на статьи, опубликованные в журналах, рекомендуется использование данных с сайтов www.medlit.ru или www.elibrary.ru.

Технология подготовки ссылок с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика

На сайте <http://www.translit.ru> можно воспользоваться программой транслитерации русского текста в латиницу.

1. Входим в программу Translit.ru. В окошке «варианты» выбираем систему транслитерации **BGN (Board of Geographic Names)**. Вставляем в специальное поле весь текст библиографии, кроме названия статьи, на русском языке и нажимаем кнопку «в транслит».

2. Копируем транслитерированный текст в готовящийся список References.

3. Переводим с помощью переводчика Google название статьи, монографии, сборника, конференции и т.д. на английский язык, переносим его в готовящийся список. **Перевод, безусловно, требует редактирования.**

4. Объединяем описания в транслите и переводное, оформляя в соответствии с принятыми правилами. При этом необходимо раскрыть место издания (Moscow) и, возможно, внести небольшие технические поправки.

5. В конце ссылки в круглых скобках указывается (in Russian). Ссылка готова.

Примеры транслитерации русскоязычных источников литературы для англоязычного блока статьи

Описание статьи из журнала
Krasovsky G.N., Yegorova N.A., Bykov I.I. Methodology of harmonizing

hygienic standards for water substances, and its application to improving sanitary water legislation. *Vestnik Rossiyskoy AMN*. 2006; 4: 32-6. (in Russian)

Описание статьи из электронного журнала

Белозеров Ю.М., Довгань М.И., Османов И.М., Шабельникова Е.И., Магомедова Ш.М. Трофотропное влияние карнитена у подростков с пролапсом митрального клапана и повышенной утомляемостью. 2011. Available at: http://www.rosmedportal.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1388:2011-10-04-02-23-15&catid=25:the-project (Accessed 31 October 2013).

Описание книги (монографии, сборника):

Pokrovskiy V.M., Korot'ko G.F., eds. *Human physiology*. 3rd ed. Moscow: Meditsina; 2013. (in Russian)

From disaster to rebirth: the causes and consequences of the destruction of the Soviet Union. Moscow: HSE Publ.; 1999. (in Russian)

Latyshev V.N. *Tribology of cutting. v.1: Frictional processes in metal cutting*. Ivanovo: Ivanovo St. Univ.; 2009. (in Russian)

Описание материалов конференций

Usmanov T.S., Gusmanov A.A., Mullagalin I.Z., Muhametshina R.Ju., Chervyakova A.N., Sveshnikov A.V. Features of the design of field development with the use of hydraulic fracturing. In: *New energy saving subsoil technologies and the increasing of the oil and gas impact: Proceedings of the 6th International symposium*. Moscow; 2007: 267-72. (in Russian)

Описание Интернет-ресурса:

APA Style (2011). Available at: <http://www.apastyle.org/apa-style-help.aspx> (accessed 5 February 2011).

Описание диссертации:

Semenov V.I. *Mathematical modeling of the plasma in the compact torus*: diss. Moscow; 2003. 300 p. (in Russian)

Описание ГОСТа:

State Standard 8.586.5-2005. Method of measurement. Measurement of flow rate and volume of liquids and gases by means of orifice devices. Moscow: Standartinform Publ.; 2007. (in Russian)

Описание патента:

Palkin M.V. *The way to orient on the roll of aircraft with optical homing head*. Patent 2280590, RF; 2006. (in Russian)

Примеры оформления ссылок на литературу для русскоязычной части статьи**Журнальные статьи:**

Веркина Л.М., Телесманич Н.Р., Мишин Д.В., Ботиков А.Г., Ломов Ю.М., Дерябин П.Г. и др. Конструирование полимерного препарата для серологической диагностики гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2012; 1: 45-8.

Чучалин А.Г. Грипп: уроки пандемии (клинические аспекты). *Пульмонология*. 2010; Прил. 1: 3-8.

Aiuti A., Cattaneo F., Galimberti S., Benninghoff U., Cassani B., Callegaro L. et al. Gene therapy for immuno-

deficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(5): 447-58.

Glauser T.A. Integrating clinical trial data into clinical practice. *Neurology*. 2002; 58(12, Suppl. 7): S6-12.

Книги:

Медик В.А. *Заболеемость населения: история, современное состояние и методология изучения*. М.: Медицина; 2003. 512 с.

Воробьев А.И., ред. *Руководство по гематологии*. 3-е изд. т. 3. М.: Ньюдиамед; 2005. 416 с.

Радзинский В.Е., ред. *Перионеология: Учебное пособие*. М.: РУДН; 2008.

Beck S., Klobes F., Scherrer C., eds. *Surviving globalization? Perspective for the German economic model*. Berlin: Springer; 2005.

Michelson A.D., ed. *Platelets*. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2007. 1398 p.

Mestecky J., Lamm M.E., Strober W., eds. *Mucosal immunology*. 3rd ed. New York: Academic Press; 2005. 2064 p.

Главы в книге:

Иванова А.Е. Тенденции и причины смерти населения России. В кн.: Осипов В.Г., Рыбаковский Л.Л., ред. *Демографическое развитие России в XXI веке*. М.: Экон-Информ; 2009: 110-31.

Silver R.M., Peltier M.R., Branch D.W. The immunology of pregnancy. In: Creasey R.K., Resnik R., eds. *Maternal-fetal medicine: Principles and practices*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2004: 89-109.

Материалы научных конференций, авторефераты:

Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии: Материалы научно-практической конференции. Санкт-Петербург, 8 июля 2009 г. СПб.; 2009.

Салов И.А., Маринушкин Д.Н. Акушерская тактика при внутриутробной гибели плода. В кн.: *Материалы IV Российского форума «Мать и дитя»*. М.; 2000; ч. 1: 516-9.

European meeting on hypertension. Milan, June 15-19, 2007. Milan; 2007.

Harnden P., Joffe J.K., Jones W.G., eds. Germ cell tumours V: Proceedings of the 5th Germ cell tumour conference. 2001, Sept. 13-15; Leeds; UK. New York: Springer; 2001.

Мельникова Н.В. *Клинико-биохимические и морфологические изменения печени у больных с атерогенной дислипидемией: Дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук*. М.; 2008.

Borkowski M.M. *Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans*: diss. Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002.

Электронные источники:

Резолюция, принятая Генеральной Ассамблеей Организации Объединенных Наций №66/288. Будущее, которого мы хотим. 27 июля 2012 года. Available at: <http://www.uncsd2012.org/thefuturewewant.html>;

<http://daccess-dds-ny.un.org/doc/UNDOC/GEN/N11/476/12/PDF/N1147612.pdf?OpenElement>.

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am. J. Nurs.* 2002; 102 (6). Available at: <http://www.psvedu.ru/journal/2011/4/2560.phtml>.

Названия журналов и книг даются курсивом.

Автор несет ответственность за правильность библиографических данных.

15. РЕДАКЦИОННАЯ ЭТИКА

Достоверность данных. Согласно этическим обязательствам ученые должны представлять достоверные результаты научной работы для публикации.

Авторство. Все лица, обозначенные как «авторы», должны соответствовать критериям этого понятия. Участие каждого автора в работе должно быть достаточным для того, чтобы принять на себя ответственность за ее содержание. Право называться автором основывается на следующих фактах:

- 1) значительном вкладе в концепцию исследования или анализ и интерпретацию данных;
- 2) подготовке текста статьи или внесении принципиальных изменений;
- 3) окончательном утверждении версии, которая сдается в печать.

Участие, заключающееся только в обеспечении финансирования или подборе материала для статьи, не оправдывает включения в состав авторской группы. Общее руководство исследовательским коллективом также не признается достаточным для авторства.

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия в разделе «Выражение признательности».

Порядок, в котором будут указаны авторы, определяется их совместным решением.

Конфликт интересов. Конфликт интересов, касающийся конкретной рукописи, возникает в том случае, если один из участников процесса рецензирования или публикации — автор, рецензент или редактор — имеет обязательства, которые могли бы повлиять на его мнение.

Наиболее частая причина возникновения конфликта интересов — финансовые отношения. Возможны и другие причины — личные отношения, научное соперничество.

Участники процесса рецензирования и публикации должны сообщать о наличии конфликта интересов.

Соблюдение прав больных и конфиденциальность. Больные имеют право на сохранение конфиденциальности, которую нельзя нарушать без их согласия. Позволяющая установить личность информация, включая имена больных, инициалы, номера больниц и историй болезни, не должна публиковаться в виде письменных описаний, фотографий и родословных, если только эта информация не представляет большую научную ценность или если больной не предоставит письменное согласие на публикацию. Авторы должны предоставить в редакцию письменное информированное согласие больного на распространение информации и сообщить об этом в статье.

Защита человека и животных при проведении научного исследования. Если в статье имеются описания экспериментов с участием человека/людей, авторы должны указать, проводились ли они в соответствии с этическими стандартами комитета, ответственного за эксперименты с участием человека/людей (входящего в состав учреждения или национального) и Хельсинкской декларации 1975 г. и ее пересмотренного варианта 2008 г. При изложении экспериментов с участием животных авторы должны указать, выполнялись ли требования национального руководства и руководства учреждения по содержанию и использованию лабораторных животных.

Множественные публикации. Редакция не рассматривает рукописи, одновременно представленные для публикации в другие журналы, а также работы, которые в большей части уже были опубликованы в виде статьи или стали частью другой работы, представленной или принятой для публикации каким-либо другим печатным изданием или электронными средствами массовой информации. Эта политика не исключает рассмотрение статьи, не принятой к публикации другим журналом, или полного описания, представленного после публикации предварительных результатов (тезисов), представленных на профессиональных конференциях.

Статьи, оформление которых не соответствует настоящим требованиям, рассматриваться не будут. Присланные рукописи, которым отказано в публикации, обратно не возвращаются.

Авторские экземпляры не предусмотрены; журнал можно получить только по подписке.

С подробным изложением пунктов «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанными Международным комитетом редакторов медицинских журналов, в частности этических вопросов, можно ознакомиться на нашем сайте (в переводе от 2006 года), оригинальную версию (на английском языке, 2010 год) можно посмотреть на сайте www.ICMJE.org.

Статьи направляются по адресу: 125315, Москва, ул.Балтийская, 8. НИИ общей патологии и патофизиологии. Редакция журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия».
E-mail: path.physiol@yandex.ru